

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μελέτη μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από αρωματικά φυτά

Διπλωματική εργασία



Γούσιος Γεώργιος

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Βασιλική Ωραιοπούλου

Αθήνα, 2017

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Βασιλικής Ωραιοπούλου.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Βασιλική Ωραιοπούλου για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διδάκτορα κ. Δημήτρη Τσιμογιάννη, για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η συμβολή του ήταν καθοριστική στην πραγματοποίηση της εργασίας, καθώς η εργαστηριακή του εμπειρία βοηθούσε πολλές φορές στη λύση των προβλημάτων που προέκυπταν.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Χουλιτούδη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε στην εκμάθηση ορισμένων αναλυτικών μεθόδων, καθώς και γενικότερα το προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π., που ήταν διαθέσιμο ανά πάσα στιγμή να προσφέρει την οποιαδήποτε βοήθεια.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους, που με υποστήριξαν και στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή μου την προσπάθεια.

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση με εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *O. Vulgare ssp. hirtum* (ρίγανη) της οικογένειας Lamiales και η προσπάθεια εύρεσης των καταλληλότερων συνθηκών για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της εκχύλισης.

Χρησιμοποιήθηκε αποξηραμένη ρίγανη που παραλήφθηκε από το τμήμα αρωματικών φαρμακευτικών φυτών του κέντρου γεωργικής έρευνας βορείου Ελλάδας, το οποίο είναι μέλος του οργανισμού Δήμητρα. Η συγκομιδή της έγινε το 2015. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε υδρο-ατμοαπόσταξη των αποξηραμένων φύλλων ρίγανης με σκοπό την παραλαβή του αιθέριου ελαίου της. Η απόδοση αιθέριου ελαίου ανήλθε σε 3,71 mL/ 100 g ξηρού φυτού. Ταυτόχρονα, διερευνήθηκε η δυνατότητα κλασμάτωσης του αιθέριου ελαίου σε ένα κλάσμα φτωχό και σε ένα πλούσιο σε καρβακρόλη. Με αναλύσεις GC-MS, προσδιορίστηκαν τα συστατικά του αιθέριου ελαίου, με τα βασικά να είναι η καρβακρόλη με ποσοστό 64,45% και το γ-τερπινένιο με ποσοστό 16,17% επί του συνολικού αιθέριου ελαίου. Δευτερεύουσες ουσίες χαρακτηρίστηκαν το trans-καρνοφυλλένιο και το π-κυμένιο με περιεκτικότητες στο συνολικό έλαιο 6,69% και 5,30% αντίστοιχα. Από την κλασμάτωση του αιθέριου ελαίου κατέστη δυνατή η παραλαβή κλάσματος περιεκτικότητας 82,45% σε καρβακρόλη.

Μέρος της απειαιωμένης φυτόμαζας εκχυλίστηκε, αφού πρώτα ξηράνθηκε και κονιοποιήθηκε, σε συσκευή Soxhlet με οξικό αιθυλεστέρα αρχικά και στη συνέχεια διαδοχικά με αιθανόλη, ώστε να ανακτηθούν και να ταυτοποιηθούν τα άπολα και τα πολικά συστατικά, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE, g/kg ξηρού φυτού). Ακόμη μετρήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση μελετώντας την ικανότητά τους για δέσμευση της ρίζας DPPH και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα trolox (TE, g/kg ξηρού φυτού) και βρέθηκε επίσης η τιμή της παραμέτρου EC₅₀, δηλαδή της ποσότητας εκχυλίσματος που απαιτείται για να δεσμεύσει το 50% της ελεύθερης ρίζας κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Το εκχύλισμα αιθανόλης παρουσίασε μεγαλύτερη απόδοση τόσο σε ολικά φαινολικά, όσο και σε αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Τα κυριότερα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ήταν το ροσμαρινικό οξύ στο εκχύλισμα της αιθανόλης και η καρβακρόλη στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, καθώς και πολλά φλαβονοειδή και στις 2 περιπτώσεις.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η εκχύλιση της ρίγανης σε εκχυλιστήρα διαλείποντος έργου με ανάδευση χρησιμοποιώντας μίγματα αιθανόλης-νερού και ελέγχθηκε η

επίδραση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη (0%, 60%, 80% και 96%), της θερμοκρασίας (22°C, 40°C και 60°C), της αναλογίας στερεού:υγρού (1:20 και 1:40) και των διαδοχικών εκχυλίσεων. Η μέγιστη ανάκτηση ολικών φαινόλων και αντιοξειδωτική δράση, παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα περιεκτικότητας 60% σε αιθανόλη με ολικές φαινόλες 54 g GAE/kg ξηρού φυτού και ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH 91,46 g TE/kg ξηρού φυτού. Πολύ κοντά ήταν και τα αποτελέσματα της εκχύλισης με καθαρό νερό. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με HPLC και ως κύριο συστατικό τους ταυτοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ, ενώ βρέθηκαν ακόμη φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

Η επίδραση της αναλογίας στερεού:υγρού εξετάστηκε με διαλύτη καθαρό νερό και δεν βρέθηκε σημαντική, ενώ της θερμοκρασίας σε καθαρό νερό και αιθανολικό διάλυμα 96%. Όσον αφορά στο νερό, παρουσιάστηκε βελτίωση στο χρόνο εκχύλισης αλλά όχι την απόδοση, ενώ στο αιθανολικό διάλυμα βελτιώθηκε τόσο ο χρόνος, όσο και η απόδοση της εκχύλισης.

Ακόμη μελετήθηκε η εκχύλιση σε υδατικά διαλύματα KOH (pH=13,3) και Ca(OH)₂ (pH=12). Το υδατικό διάλυμα Ca(OH)₂, παρουσίασε αντίστοιχη απόδοση με το καθαρό νερό σε ολικές φαινόλες. Αντίθετα, το διάλυμα KOH παρουσίασε σχεδόν διπλάσια απόδοση σε φαινολικά συστατικά φτάνοντας τα 105,68 g GAE/kg ξηρού φυτού. Η αντιοξειδωτική του δράση μετρήθηκε μετά από οξίνισή του με κιτρικό οξύ και βρέθηκε μειωμένη συγκριτικά με αυτή του καθαρού νερού. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην κατακρήμνιση τμήματος των ουσιών με αντιοξειδωτική δράση κατά την οξίνιση.

Η τελευταία εκχύλιση που μελετήθηκε ήταν η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό, η οποία ενώ είχε αντίστοιχη απόδοση σε ολικές φαινόλες με την αντίστοιχη εκχύλιση διαλείποντος έργου αλλά επέτρεψε την παραλαβή πυκνότερου εκχυλίσματος.

Τέλος βρέθηκε ο συντελεστής διάχυσης D_{eff} για τις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου θεωρώντας τη ρίγανη ως σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 500 μm. Από τις εκχυλίσεις στις οποίες κατέστη εφικτός ο προσδιορισμός του, μεγαλύτερο D_{eff} παρουσιάστηκε με χρήση υδατικού διαλύματος KOH ως διαλύτη στους 22°C και ήταν $208,34 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, ενώ το μικρότερο παρουσιάστηκε στο διάλυμα 96% αιθανόλης στους 22°C και ήταν $1,16 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. Για τους συντελεστές διάχυσης στην αιθανόλη περιεκτικότητας 96% στους 22°C, τους 40°C και τους 60°C, υπολογίστηκε με βάση τη σχέση Arrhenius η ενέργεια ενεργοποίησης της διάχυσης και προέκυψε $E_a=54,98 \text{ kJ/mol}$.

Abstract

The aim of this study was the isolation by extraction of bioactive compounds from the plant *O. Vulgare* ssp. *hirtum* (oregano) of the Lamiaceae family and finding the most suitable conditions to optimize the extraction efficiency.

Dried oregano which was received by the department of aromatic medicinal plants in northern Greece of the agricultural research center, which is a member of Dimitra organization. The harvest was in 2015. Initially, a hydro-distillation of the oregano dried leafs was carried out in order to receive the essential oil. The essential oil yield was 3,71 mL / 100 g dry plant. Simultaneously, the possibility of fractionation of the essential oil was investigated in a fraction poor and in a fraction rich in carvacrol. By GC-MS analysis the components of the essential oil were identified, the essential being carvacrol with a percentage of 64.45% and γ -terpinene with a percentage of 16.17% of the total essential oil. Secondary substances characterized in trans-caryophyllene and p-cymene with levels in the total oil 6.69% and 5.30% respectively. By fractionating the essential oil, carvacrol reached 82.45% of the total content.

Part of the plant which was de-oiled was extracted, after being dried and pulverized, in a Soxhlet extractor with ethyl acetate initially and then successively with ethanol to recover and identify the apolar and polar components, respectively. The extracts were analyzed for their content of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method and results were expressed in gallic acid equivalents (GAE, g / kg dry plant). Furthermore, antioxidant activity was measured by studying their ability to bind the DPPH radical and the results were expressed in trolox equivalents (TE, g / kg dry plant) and also the EC₅₀ parameter was found, i.e. the extract amount required to bind 50% of free radical under certain experimental conditions. The ethanol extract showed higher performance both in total phenolics, and in antioxidant activity compared to the ethyl acetate extract. The major components that were identified by high performance liquid chromatography, were rosmarinic acid in the ethanol extract and carvacrol in the ethyl acetate extract, and several flavonoids on both occasions.

Then the extraction of oregano was studied in a batch extractor with stirring, using ethanol-water mixtures, and the effect of the solvent content in ethanol (0%, 60%, 80% and 96%), temperature (22°C, 40°C and 60°C), ratio of solid: liquid (1:20 and 1:40) and successive extractions were studied. Maximum recovery of total phenols and antioxidant activity was observed in the extract containing 60% ethanol with total phenols reaching 54 g GAE / kg dry plant and ability to bind the DPPH radical 91,46 g TE / kg dry plant. Very close were the results of extraction with pure water. The extracts were analyzed by HPLC and the major component that was identified was rosmarinic acid, and there even were flavonoids and phenolic acids.

The effect of the ratio of solid:liquid was tested with pure water as solvent and was not found significant, while the temperature effect was tested in pure water and an ethanol solution of 96%. Regarding the water, there was improvement in the extraction time, but not the performance while the ethanolic solution improved both time and efficiency of the extraction.

In addition, extraction in KOH (pH=13,3) and Ca(OH)₂ (pH=12) aqueous solutions was studied. The aqueous solution of Ca(OH)₂, showed similar performance with pure water to total phenols. In contrast, the KOH solution showed almost twice the yield of phenolic compounds, reaching 105,68 g GAE / kg dry plant. The antioxidant activity was measured after acidifying with citric acid and was reduced compared to that of pure water. This is due to the precipitation of a portion of substances with antioxidant action because of acidification.

The last extraction studied was the fed-batch extraction with water, and which had a corresponding yield of total phenols to the batch extraction batch but allowed the receipt of denser extract.

Finally, the D_{eff} diffusion coefficient was calculated for batch extractions considering oregano as spherical particles of 500 μm diameter. In the extractions in which its determination was made possible, the greatest D_{eff} was presented with use of KOH aqueous solution at 22°C and was $208,34 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, while the smallest was presented in 96% ethanol solution at 22°C and was $1,16 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. For the diffusion coefficients calculated in different temperatures (22°C, 40°C, 60°C) for the 96% ethanol solution, the activation energy of diffusion was calculated using the Arrhenius equation and was found $E_a=54,98 \text{ kJ/mol}$.

Περιεχόμενα

1. Η ρίγανη (<i>Origanum Vulgare</i> ssp. <i>Hirtum</i>) και η οικογένεια <i>Lamiaceae</i>	15
1.1 Η οικογένεια <i>Lamiaceae</i>	15
1.1.1 Γενικά για την οικογένεια <i>Lamiaceae</i>	15
1.1.2 Η οικογένεια <i>Lamiaceae</i> στην Ελλάδα.....	15
1.2 Το φυτό <i>Origanum Vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	17
1.3 Αιθήρια έλαια	18
1.3.1 Γενικά για αιθήρια έλαια	18
1.3.2 Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Origanum Vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	18
1.4 Φαινολικές ενώσεις στα φυτά της οικογένειας <i>Lamiaceae</i>	20
2. Τεχνικές εκχύλισης	22
2.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.....	23
2.1.1 Συμβατική εκχύλιση Soxhlet.....	23
2.1.2 Υδρο-ατμοαπόσταξη	25
2.1.3 Διαβροχή.....	25
2.1.4 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες.....	26
2.2 Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης	35
2.2.1 Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE).....	35
2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)	41
2.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE).....	43
2.2.4 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)	45
2.2.5 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF).....	46
3. Πειραματικό μέρος	49
3.1 Στόχος-σχεδιασμός πειραμάτων.....	49
3.2 Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια - Συσκευές	52
3.2.1 Πρώτες ύλες.....	52
3.2.2 Αντιδραστήρια.....	52
3.3.3 Συσκευές.....	52
3.3 Πειραματικές τεχνικές.....	55
3.3.1 Υδρο-ατμοαπόσταξη	55
3.3.2 Κλασμάτωση αιθέριου ελαίου	55
3.3.3 Εκχυλίσεις Soxhlet	55

3.3.4 Εκχυλίσεις υπό ανάδευση με μίγματα αιθανόλης-νερού.....	56
3.3.5 Εκχυλίσεις υπό ανάδευση σε αλκαλικό περιβάλλον	57
3.3.6 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό.....	57
3.4 Αναλυτικές μέθοδοι	58
3.4.1 GC-MS για ανάλυση αιθέριου ελαίου.....	58
3.4.2 HPLC για ανάλυση φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα.....	58
3.4.3 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα	58
3.4.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	59
3.4.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση της ρίζας DPPH.....	60
4. Αποτελέσματα και σχολιασμός	63
4.1 Παραλαβή αιθέριου ελαίου	63
4.2 Καμπύλες αναφοράς.....	69
4.3 Αποτελέσματα εκχυλίσεων Soxhlet.....	71
4.3.1 Αποδόσεις εκχυλίσεων	71
4.3.2 Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων	72
4.4 Εκχυλίσεις διαλείποντος έργου με αιθανολικά διαλύματα	74
4.4.1 Αποδόσεις σε ολικά φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική δράση.....	74
4.4.2 Αναλύσεις των εκχυλισμάτων με HPLC	76
4.4.3 Επίδραση της αναλογίας υγρού-στερεού.....	79
4.4.4 Επίδραση της θερμοκρασίας	80
4.5 Εκχυλίσεις σε αλκαλικά διαλύματα	84
4.6 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό.....	87
4.7 Εκτίμηση συντελεστών διάχυσης (D_{eff}) για τις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου	89
5. Συμπεράσματα-Προτάσεις.....	93
6. Βιβλιογραφία	96

Εισαγωγή

Η Ελλάδα είναι μία χώρα της οποίας το εύκρατο κλίμα έχει συμβάλει στην ύπαρξη μίας πολύ πλούσιας χλωρίδας. Σημαντικό μέρος της χλωρίδας αυτής αποτελούν τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (χειλανθή). Στην παρούσα εργασία μελετάται η ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών του φυτού της οικογένειας *Lamiaceae* *Origanum Vulgare* ssp. *hirtum*. Όπως δηλώνει και η κοινή του ονομασία (ελληνική ρίγανη), το φυτό αυτό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ελλάδα.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρουσιάζει σημαντικό βιομηχανικό ενδιαφέρον, λόγω της ύπαρξης της καρβακρόλης, ουσίας με ισχυρή αντιμικροβιακή και αντικτική δράση. Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια απομόνωσης ενός κλάσματος αιθέριου ελαίου πλούσιου σε καρβακρόλη, ώστε να παραληφθεί ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας, καθώς η τιμή του αιθέριου ελαίου της ρίγανης καθορίζεται από την περιεκτικότητά του σε καρβακρόλη.

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει μία στροφή της επιστημονικής κοινότητας προς την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από φυτικές πηγές, καθώς πρόκειται για μία σχετικά ανέξοδη διεργασία, που οδηγεί στην παραλαβή ενός προϊόντος υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* διαθέτουν πλήθος βιοδραστικών συστατικών με το κυριότερο από αυτά να είναι το ροσμαρινικό οξύ, ουσία με ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντικτική δράση. Ακόμη διαθέτουν πλήθος άλλων φαινολικών οξέων όπως το καφεϊκό οξύ και σαλβιανολικά οξέα, καθώς επίσης και φλαβονοειδή συστατικά. Όπως και τα υπόλοιπα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, η ρίγανη είναι ένα φυτό πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ρίγανη αφορούν την παραλαβή του αιθέριου ελαίου της, αδιαφορώντας για τον πλούτο βιοδραστικών συστατικών τα οποία αυτή διαθέτει. Επιπλέον, σχετικά πρόσφατα έχουν δημιουργηθεί στην Ελλάδα αρκετές μονάδες απόσταξης του αιθέριου ελαίου διαφόρων αρωματικών φυτών, συμπεριλαμβανομένης της ρίγανης. Η φυτόμαζα που απομένει ως παραπροϊόν αυτής της παραγωγικής διαδικασίας, αντιμετωπίζεται ως στερεό απόβλητο και η εναπόθεσή της, συνήθως στους γύρω χώρους δημιουργεί περιβαλλοντικά προβλήματα. Το παραπροϊόν αυτό όμως είναι πολύ πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Με βάση τα ανωτέρω, πέραν της παραλαβής αιθέριου ελαίου πλούσιου σε καρβακρόλη, σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η αξιοποίηση της απειλωμένης ρίγανης για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών που διαθέτει. Πιο συγκεκριμένα, η εργασία αποσκοπεί στην εύρεση των κατάλληλων συνθηκών εκχύλισης για την μεγιστοποίηση της απόδοσης της ρίγανης σε βιοδραστικά συστατικά με χρήση συμβατικής εκχύλισης με ανάδευση και υδραλκοολικά διαλύματα. Η χρήση υδραλκοολικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε καθώς η

αιθανόλη είναι μία μη τοξική ουσία. Μελετώνται διάφορες παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν τόσο την απόδοση όσο και το χρόνο της εκχύλισης. Επιπλέον, μελετώνται εναλλακτικοί τρόποι εκχύλισης με χρήση αλκαλικών διαλυμάτων για τη μείωση της χρήσης οργανικών διαλυτών, καθώς και εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου, διεργασίας που δεν έχει μελετηθεί σε αρωματικά φυτά, ώστε να συγκριθεί με την αντίστοιχη διεργασία διαλείποντος έργου.

1. Η ρίγανη (*Origanum Vulgare* ssp. *Hirtum*) και η οικογένεια **Lamiaceae**

1.1 Η οικογένεια **Lamiaceae**

1.1.1 Γενικά για την οικογένεια **Lamiaceae**

Η οικογένεια των χειλανθών (**Lamiaceae**) είναι μία οικογένεια ανθοφόρων φυτών και είναι διεσπαρμένη παγκοσμίως. Διαθέτει 236 γένη και 6.900-7.200 είδη. Τα μεγαλύτερα γένη είναι τα *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) και *Nepeta* (200). Το γένος *Clorodendrum* διέθετε πάνω από 400 είδη, αλλά μέχρι το 2010 αυτά περιορίστηκαν σε 150. Τα φυτά είναι συνήθως αρωματικά σε όλα τα μέρη τους και πολλά από αυτά είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη μαγειρική βότανα, όπως ο βασιλικός, η μέντα, το δενδρολίβανο, το φασκόμηλο, το θρούμπι, η μαντζουράνα, η ρίγανη, το θυμάρι και η λεβάντα. Πολλά από τα φυτά αυτά είναι θάμνοι ή δέντρα και σπανιότερα αμπέλια. Η καλλιέργειά τους πραγματοποιείται ευρέως, όχι μόνο λόγω των αρωματικών τους ιδιοτήτων, αλλά κυρίως λόγω της ευκολίας της.

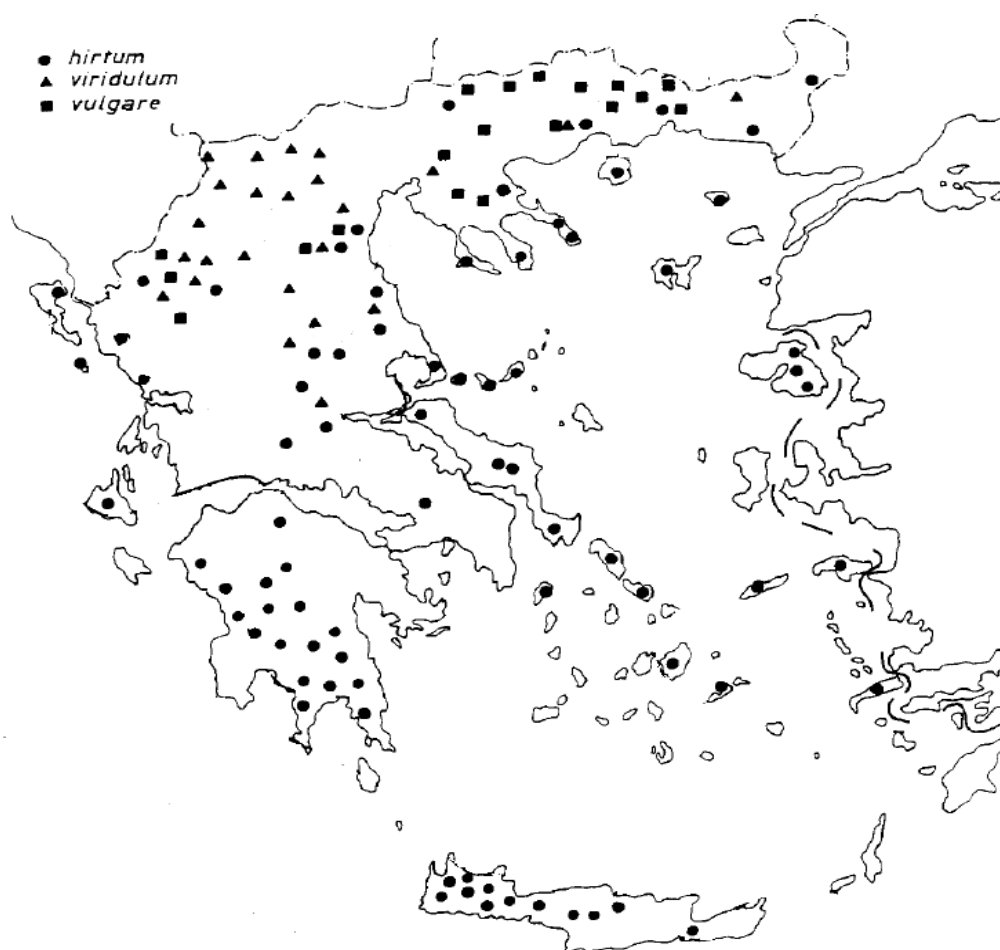
Τα φυτά της οικογένειας των χειλανθών είναι ευρέως διαδεδομένα στις Μεσογειακές χώρες, καθώς μερικά από αυτά παράγουν υψηλή ποσότητα αιθέριου ελαίου το οποίο τα καθιστά ικανά να επιβιώνουν κατά τη θερμή καλοκαιρινή περίοδο. Εκτός από τη μαγειρική και τις αρωματικές τους ιδιότητες, τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνται και για φαρμακευτικούς σκοπούς αλλά ακόμη και για διακοσμητικούς. Τα συστατικά τους με φαρμακευτικές ιδιότητες περιλαμβάνουν το αιθέριο έλαιο, ταννίνες, σαπωνίνες και οργανικά οξέα. Τα φυτά έχουν καταπραϋντικές, διουρητικές, τονωτικές, αντισπασμωδικές και αντισηπτικές ιδιότητες. (Raja, 2012)

1.1.2 Η οικογένεια **Lamiaceae** στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, η οικογένεια των χειλανθών αποτελείται από 320 είδη τα οποία ανήκουν σε 35 γένη. Το 50% του συνολικού αριθμού των ειδών ανταποκρίνονται σε μόλις 5 γένη, τα *Stachys* (58 είδη), *Thymus* (34), *Teucrium* (25), *Salvia* (24) και *Scutellaria* (20). Αντίθετα, 6 γένη, τα *Coridothymus*, *Melittis*, *Melissa*, *Moluccella*, *Prasium* και *Rosmarinus* αντιπροσωπεύονται μόνο από 1 είδος και άλλα 8 γένη, τα *Clinopodium*, *Galeobdolon*, *Glechoma*, *Hyssopus*, *Lavandula*, *Leonurus*, *Lycopus* και *Thymbra* αντιπροσωπεύονται από 2 είδη.

Η διασπορά των φυτών της οικογένειας των χειλανθών στην Ελλάδα ακολουθεί ένα αρκετά μεταβλητό μοτίβο. Κάποια από αυτά είναι περιορισμένα μόνο στη βόρεια Ελλάδα, όπως τα *Galeopsis*, *Galeobdolon*, *Glechoma*, *Hyssopus*. Άλλα εμφανίζονται κυρίως στη Νότια Ελλάδα, όπως τα *Coridothymus*, *Origanum*, *Molucella* και *Thymbra* και άλλα που παρουσιάζουν πιο ευρεία διασπορά τόσο στη βόρεια όσο και στη νότια Ελλάδα, είναι παραδόξως απόντα από νησιωτικές περιοχές όπως η Κρήτη και οι Κυκλάδες. Τέτοια είδη ανήκουν στα γένη *Leonurus*, *Lycopus*, *Melittis* και *Thymus*. Οι πιο πλούσιες περιοχές σε χειλανθή φυτά είναι η Πελοπόννησος, η Στερεά Ελλάδα και τα Επτάνησα, καθώς διαθέτουν το 44,3% των συνολικών ειδών έχοντας 143 και ακολουθεί η Μακεδονία με 132 είδη (41,2%). Οι φτωχότερες περιοχές είναι η Λήμνος και ο Άγιος Ευστράτιος με μόλις 11 είδη (3,5%). (Kokkini et al., 1988)

Επειδή στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *Origanum Vulgare* ssp. *hirtum*, παρακάτω παρουσιάζεται στην εικόνα 1.1 η γεωγραφική κατανομή στην Ελλάδα τριών υποειδών του είδους *Origanum Vulgare*.



Εικόνα 1.1: Γεωγραφική κατανομή των υποειδών *hirtum*, *viridulum* και *vulgare* του είδους *Origanum Vulgare* (Kokkini et al. 1994)

1.2 Το φυτό *Origanum Vulgare ssp. hirtum*

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη που είναι κοινώς γνωστά ως ρίγανη, παρά το γεγονός ότι ανήκουν σε διαφορετικές βοτανολογικές οικογένειες και γένη, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικό οικονομικό ενδιαφέρον. Μπορούν να διαχωριστούν 4 κατηγορίες οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για μαγειρικούς σκοπούς: η Ελληνική ρίγανη (*Origanum Vulgare ssp. hirtum*), η Ισπανική ρίγανη (*Coridothymus capitatus*), η Τούρκικη ρίγανη (*Origanum onites*) και η Μεξικάνικη ρίγανη (*Lipia graveolens*).

Στην Ευρώπη αλλά και παγκοσμίως γενικότερα, τα πιο κοινά είδη ρίγανης ανήκουν στο βοτανικό γένος *Origanum*. Ο Ietswaart (1980) βασιζόμενος σε μορφολογικά κριτήρια, αναγνώρισε μέσα σε αυτό το γένος, 3 ομάδες, 10 τομείς, 38 είδη, 10 υποείδη και 17 υβρίδια. Πριν από το 1980, το είδος *O. Vulgare* αναφερόταν ανεξαρτήτως του υποείδους, τα οποία ο Ietswaart αναγνώρισε αργότερα ως *O. Vulgare ssp. hirtum*, *O. Vulgare ssp. gracile*, *O. Vulgare ssp. vulgare* και *O. Vulgare ssp. viride*. Τα υποείδη του είδους *O. Vulgare* δεν είναι εύκολα διαχωρίσιμα από τις μορφολογικές τους παραμέτρους μόνο. Χαρακτηριστικά όπως η απόδοση σε αιθέριο έλαιο και η σύνθεσή του είναι χρήσιμα για την αναγνώριση του υποείδους.

Το φυτό *O. Vulgare ssp. hirtum* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι ένα τυπικό είδος της Ανατολικής Μεσογείου. Κλιματολογικά, αυτό το είδος προτιμά θερμά και ηλιόλουστα περιβάλλοντα και συχνά βραχώδη, ασβεστολιθικά εδάφη χαμηλής υγρασίας. Ενώ ποικίλει ως προς τις μορφολογικές του παραμέτρους, μπορεί να διαχωριστεί από τα άλλα υποείδη λόγω των τριχωτών στελεχών του, της πυκνής ταξιανθίας του, των τριχοειδών δομών που καλύπτουν τα φύλλα και τα μπουμπούκια του, και από τα λευκά άνθη του. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum*, είναι σύμφωνα με πολλές μελέτες το π-κυμένιο, το γ-τερπινένιο και η καρβακρόλη. (De Martino et al., 2009)



Εικόνα 1.2: Το φυτό *O. Vulgare ssp. hirtum*

1.3 Αιθέρια έλαια

1.3.1 Γενικά για αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι λιπαρά αρωματικά υγρά που μπορούν να ανακτηθούν από φυτικά υλικά (λουλούδια, μπουμπούκια, σπόρους, φύλλα, κλαδιά, φλοιούς, βότανα, ξύλα, φρούτα και ρίζες). Ο κύριος τρόπος με τον οποίο γίνεται βιομηχανικά η παραλαβή των αιθέριων ελαίων είναι με τη μέθοδο της υδρο-ατμοαπόσταξης. Περίπου 3000 αιθέρια έλαια είναι γνωστά, εκ των οποίων περίπου 300 είναι πολύ σημαντικά εμπορικά (προορίζονται κυρίως για την αγορά γεύσεων και αρωμάτων). Είναι γνωστό από παλιά ότι πολλά αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, αλλά η σχετικά πρόσφατη αναθέρμανση του ενδιαφέροντος για την οικιακή κατανάλωση, οδήγησε στη στροφή του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας προς αυτές τις ουσίες. Εκτός από αντιβακτηριακές ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια ή μεμονωμένα συστατικά τους, έχουν να επιδείξουν αντικές, αντιμυκητιασικές, αντιτοξινογονικές, αντιπαρασιτικές και εντομοκτόνες ιδιότητες. Αυτά τα χαρακτηριστικά, συνδέονται κατά πάσα πιθανότητα με το ρόλο που διενεργούν αυτές οι ουσίες στα φυτά.

Η ανάλυση των επιμέρους συστατικών των αιθέριων ελαίων, πραγματοποιείται με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να αποτελούνται μέχρι και παραπάνω από 60 συστατικά. Τα κύρια συστατικά μπορούν να αποτελούν μέχρι και το 85% του αιθέριου ελαίου, ενώ άλλα συστατικά μπορεί να βρίσκονται σε ίχνη. Τα φαινολικά συστατικά του αιθέριου ελαίου είναι κυρίως υπεύθυνα για τις αντιμικροβιακές ιδιότητές του.

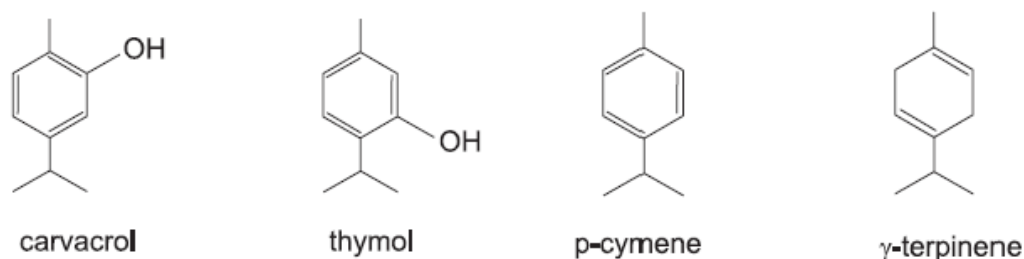
1.3.2 Αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum Vulgare ssp. hirtum*

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν ταυτοποιηθεί τα βασικά συστατικά που αποτελούν το αιθέριο έλαιο του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum*. Πιο συγκεκριμένα οι Lagouri et al. (1993), μελέτησαν τα αιθέρια έλαια 4 φυτών, των *Origanum Vulgare ssp. hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum onites* και *Satureja thymbra*. Και στα 4 φυτά το βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου ήταν η καρβακρόλη με περιεκτικότητα στο έλαιο από 53% και άνω. Στο φυτό *Origanum Vulgare ssp. hirtum*, η καρβακρόλη αποτέλεσε το 59,7% του ελαίου και ακολούθησαν η θυμόλη με 13,7%, το γ-τερπινένιο με 11% και το π-κυμένιο με 7,6%.

Στην έρευνα των Sivropoulou et al. (1996), η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο ήταν τα βασικά του αιθέριου ελαίου του φυτού *Origanum Vulgare ssp. hirtum* αλλά σε διαφορετικές περιεκτικότητες συγκριτικά με την έρευνα των Lagouri et al. (1993), γεγονός που υποδεικνύει ότι η περιεκτικότητά των συστατικών αυτών στο αιθέριο έλαιο διαφέρει από φυτό σε φυτό. Πάντως η

καρβακρόλη αποτέλεσε και σε αυτή την περίπτωση το βασικό συστατικό, αποτελώντας το 79,58% του αιθέριου ελαίου.

Μεταξύ των αιθέριων ελαίων των υποειδών του είδους *Origanum Vulgare*, οι Kokkini και Vokou (1989), αναφέρουν ότι το υποείδος *Origanum Vulgare* ssp. *hirtum* είναι το πιο πλούσιο σε καρβακρόλη καθώς μπορεί να φτάσει μέχρι 95%, ενώ η απόδοση σε αιθέριο έλαιο του φυτού μπορεί να φτάσει σε μερικές περιπτώσεις και το 8%, το οποίο είναι μία από τις υψηλότερες τιμές που έχουν αναφερθεί ποτέ για αρωματικά φυτά. Αξίζει να σημειωθεί πως 4 πληθυσμοί του συγκεκριμένου φυτού έδωσαν τόσο υψηλές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου: από την Κρήτη, τη χερσόνησο του Άθω, την Αμοργό και το Γύθειο.



Εικόνα 1.3: Δομή των βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου του φυτού *O. Vulgare* ssp. *hirtum*

Η καρβακρόλη που αποτελεί το βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου του φυτού *O. Vulgare* ssp. *hirtum* είναι μία ουσία με ισχυρή αντιβιοτική δράση. Από μελέτες που έχουν γίνει και συνοψίζονται από την Burt (2004), η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωσή της (MIC) κυμαίνεται από 0,225 έως 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *E. coli*, από 0,225 έως 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *S. typhimurium*, από 0,175 έως 0,450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *Staph. aureus* και από 0,375 έως 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *L. monocytogenes*.

Η θυμόλη που αποτελεί και αυτή ένα από τα βασικά συστατικά του προαναφερθέντος αιθέριου ελαίου, έδειξε και αυτή ισχυρή αντιβιοτική δράση. Σύμφωνα με τη μελέτη των Consentino et al. (1999) η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωσή της (MIC) κυμαίνεται από 0,225 έως 0,45 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *E. coli*, από 0,140 έως 0,225 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *Staph. aureus* και είναι 0,56 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή του *S. typhimurium* και 0,450 $\mu\text{L}/\text{mL}$ για την αναστολή των *L. monocytogenes* και *B. cereus*.

1.4 Φαινολικές ενώσεις στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*

Ως φαινολική ένωση, χαρακτηρίζεται η ένωση η οποία διαθέτει ένα ή παραπάνω υδροξύλια άμεσα συνδεδεμένα με έναν αρωματικό δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, δρώντας ως εσωτερικός φυσιολογικός ρυθμιστής ή ως εξωτερικός αγγελιοφόρος. Είναι επίσης υπεύθυνες για την προστασία των φυτών από το ηλιακό φως, απορροφώντας ακτινοβολίες μικρού μήκους κύματος και συνεπώς υψηλής ενέργειας, χάρη στα μέρη τους που διαθέτουν ελεύθερα ηλεκτρόνια, όπως οι π-δεσμοί των αρωματικών δακτυλίων, συντελώντας έτσι στη μειωμένη οξειδωτική δράση του. Επίσης μπορούν να προστατεύσουν το φυτό από τα έντομα καθώς παρουσιάζουν τοξικές ιδιότητες προς αυτά και ακόμη να προσελκύσουν επικονιαστές, συμβάλλοντας έτσι στην αναπαραγωγή του. (Shahidi and Yeo, 2016)

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πολλές ομάδες, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια, τις κουμαρίνες, τις λιγνίνες και τις ταννίνες. Τα φαινολικά οξέα περιλαμβάνουν τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C_6-C_1), όπως το γαλλικό, το π-υδροβενζοϊκό, το βανιλικό, το συριγικό, το πρωτοκατεχικό και το ελλαγικό οξύ, καθώς επίσης και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (C_6-C_3), όπως το π-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπικό, το ροσμαρινικό και το χλωρογενικό οξύ. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από μία δομή 3 δακτυλίων στη μορφή $C_6-C_3-C_6$ και χωρίζονται σε διαφορετικές ομάδες συστατικών όπως οι φλαβόνες, οι φλαβονόνες, οι φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες, ανάλογα τους υποκαταστάτες που συναντώνται στους δακτυλίους (π.χ. υδροξύλια και μεθύλια). Τα στιλβένια είναι μία ακόμη ομάδα φαινολικών με πιο γνωστή ουσία που να ανήκει σε αυτά, τη ρεσερβατρόλη. Οι κουμαρίνες ανήκουν στην ομάδα των βενζοπυρονών και υπάρχουν σε διαφορετικές τροφές. Επιπροσθέτως, τα φαινολικά συστατικά είναι παρόντα στα φυτά σε πολυμερικές μορφές. Οι λιγνίνες είναι τα πολυμερή των μονολιγνολών, όπως το π-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ. Ακόμη, οι ταννίνες είναι πολυμερή φαινολικά. Οι ταννίνες εμφανίζονται ως υδρολύμενες ταννίνες και ως συμπυκνωμένες ταννίνες, γνωστές ως προανθοκυανιδίνες, οι οποίες είναι τα πολυμερή της κατεχίνης και της επικατεχίνης. (Shahidi and Yeo, 2016)

Τα φαινολικά συστατικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της αποτελεσματικής αντιοξειδωτικής τους δράσης τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Τα φαινολικά συστατικά που συναντώνται στα φυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως ελεύθερα, εστεροποιημένα και αδιάλυτα-δεσμευμένα ανάλογα με το αν υπάρχουν στην ελεύθερη μορφή τους ή αν είναι ομοιοπολικά δεσμευμένα με άλλα μόρια όπως λιπαρά οξέα (εστεροποιημένα) ή αδιάλυτα μακρομόρια (αδιάλυτα-δεσμευμένα). Τα περισσότερα αδιάλυτα-δεσμευμένα φαινολικά συστατικά, σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η

πηκτίνη, η κυτταρίνη, η αραβινοξυλάνη και δομικές πρωτεΐνες. (Shahidi and Yeo, 2016)

Μία πολύ σημαντική μελέτη που αφορά τη σύσταση των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* σε φαινολικά, πραγματοποιήθηκε από τους Zgorzka and Glowniak (2001). Σε αυτή τη μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εκχυλισμάτων 10 φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* και πιο συγκεκριμένα των *Salvia officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris* L., *Lavandula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L., *Hyssopus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L. και *Satureja hortensis* L. Τα οξέα που ταυτοποιήθηκαν ήταν το πρωτοκατεχικό, το π-υδροβενζοϊκό, το γεντισικό, το χλωρογενικό, το συριγγικό, το καφεϊκό, το βανιλλικό, το π-κουμαρικό, το φερουλικό και το ροσμαρινικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι το κυρίαρχο οξύ που βρέθηκε σε όλα σχεδόν τα εκχυλίσματα ήταν το ροσμαρινικό.

Οι Fecka and Turek (2008) ταυτοποίησαν τα συστατικά των θυμαριού, άγριου θυμαριού και γλυκιάς μαντζουράνας, 3 φυτών δηλαδή της οικογένειας *Lamiaceae*, χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές. Στα εξεταζόμενα βότανα, τα βασικά συστατικά που βρέθηκαν ήταν η αρβουτίνη, το ροσμαρινικό οξύ, το λιθοσπερμικό οξύ και το 7-O-b-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης.

Στο φυτό το οποίο αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας, δηλαδή το φυτό *O. Vulgare* ssp. *hirtum*, οι Koukoulitsa et al. (2006) ταυτοποίησαν 19 συστατικά. Πιο συγκεκριμένα από εκχύλισμα μεθανόλης, απομόνωσαν 8 φλαβονοειδή: την απιγενίνη, τη χρυσοεριόλη, τη διοσμετίνη, την εριοδικτυόλη, την κερκετίνη, την κοσμοσίδη και τη βισενίνη-2. Επίσης βρέθηκε καφεϊκό, ροσμαρινικό και λιθοσπερμικό οξύ B, καθώς και διάφοροι φαινολικοί γλυκοζίτες και υδροξυγιασμονικά οξέα.

Το ροσμαρινικό οξύ, αποτελεί ένα από τα βασικότερα συστατικά των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, καθώς και το κυριότερο συστατικό του φυτού *O. Vulgare* ssp. *virens*, (Goncalves et. al, 2016). Είναι γνωστό για την αντική, αντιβακτηριδιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και την ανοσοδιεγερτική δράση του. Επίσης από τη μελέτη των Hossain et al. (2008), προκύπτει ότι το ροσμαρινικό οξύ έχει σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από το ισχυρότερο συνθετικό αντιοξειδωτικό, το γαλλικό προπύλιο (PG). Στην ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του ροσμαρινικού οξέος, είναι πιθανό να συμβάλει η παρουσία 4 ομάδων υδροξυλίων στο μόριό του. Τέλος, τα φλαβονοειδή τα οποία είναι επίσης παρόντα στο φυτό που εξετάζεται, αποτελούν επίσης σημαντικά βιοδραστικά συστατικά. Έρευνες έχουν δείξει ότι η λήψη τους μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για εμφάνιση χρόνιων παθήσεων ενώ είναι πιθανό να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου και καρδιαγγειακών νόσων.

2. Τεχνικές εκχύλισης

Οι ποσοτικές και ποιοτικές μελέτες βιοδραστικών συστατικών που προέρχονται από φυτά, βασίζονται κυρίως στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης. Η εκχύλιση είναι το πρώτο βήμα οποιασδήποτε φαρμακευτικής έρευνας που εμπλέκει φυτά και παίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα. Η ανάπτυξη των μοντέρνων χρωματογραφικών και φωτομετρικών τεχνικών, έχει διευκολύνει την ανάλυση των βιοδραστικών συστατικών, αλλά η επιτυχία τους βασίζεται στις μεθόδους εκχύλισης με τις οποίες αυτά θα παραληφθούν.

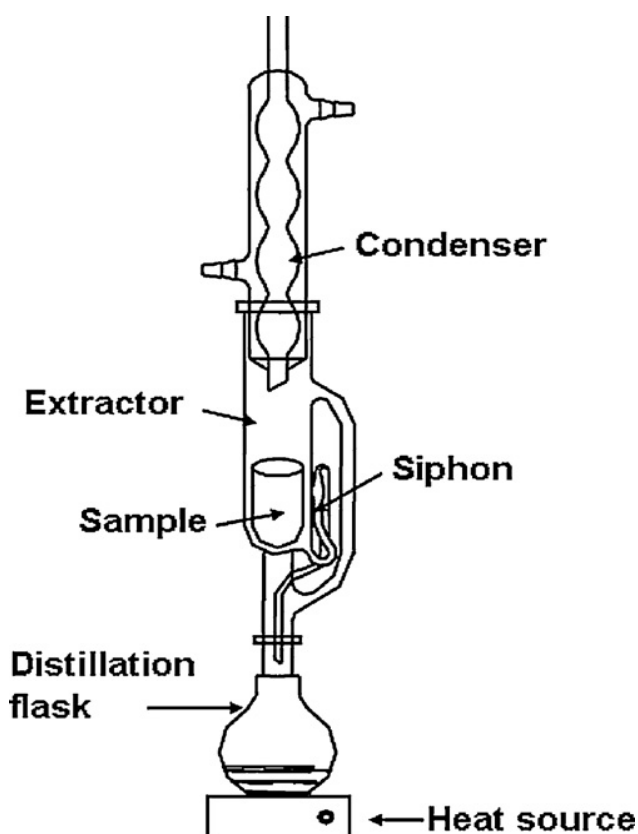
Οι πιο κοινοί παράγοντες που επηρεάζουν τις διεργασίες εκχύλισης είναι οι ιδιότητες της μήτρας του μέρους του φυτού το οποίο εκχυλίζεται, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος. Η αυξημένη κατανόηση της φύσης των βιοδραστικών συστατικών κατά τις τελευταίες δεκαετίες, έχει οδηγήσει τους εμπλεκόμενους στους τομείς της φαρμακευτικής, των πρόσθετων τροφίμων, ακόμη και των φυσικών εντομοκτόνων, να αποκτήσουν μεγάλο ενδιαφέρον για βιοδραστικά συστατικά προερχόμενα από φυσικές πηγές.

Η εκχύλιση των φυτικών υλικών, μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους. Οι μη συμβατικές μέθοδοι οι οποίες είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης χρήσης συνθετικών και οργανικών χημικών, μικρότερου χρόνου λειτουργίας και καλύτερης απόδοσης και ποιότητας εκχυλίσματος, έχουν αναπτυχθεί κατά τα τελευταία 50 χρόνια. Για την ενίσχυση της συνολικής απόδοσης και της επιλεκτικότητας βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά, έχουν μελετηθεί ως μη συμβατικές τεχνικές η χρήση υπερήχων, παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, μικροκυμάτων, υπερκρίσιμων ρευστών και πεπιεσμένων υγρών. Ταυτόχρονα, συμβατικές τεχνικές, όπως η Soxhlet, θεωρούνται ακόμη μέθοδοι αναφοράς για σύγκριση με τις καινοτόμες τεχνικές και μέτρο της επιτυχίας τους. Παρακάτω, θα αναπτυχθούν οι κυριότερες συμβατικές και μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από φυτά που είναι γνωστές μέχρι σήμερα.

2.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

2.1.1 Συμβατική εκχύλιση Soxhlet

Το 1877, ο von Soxhlet ανέπτυξε ένα νέο σύστημα εκχύλισης (εκχυλιστήρας Soxhlet), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πολύ καιρό ευρέως ως η πιο διαδεδομένη τεχνική έκπλυσης. Στην πραγματικότητα η εκχύλιση Soxhlet χρησιμοποιήθηκε για πάνω από έναν αιώνα και οι μέθοδοι που βασίζονται σε αυτή παραμένουν οι πρωταρχικές αναφορές ως προς την απόδοση των νέων τεχνικών έκπλυσης. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για την ανάπτυξη μιας ποικιλίας τροποποιήσεων που προορίζονται για την εξέλιξή της, διατηρώντας παράλληλα τα πλεονεκτήματά της ή ακόμη και βελτιώνοντάς τα. Οι περισσότερες από τις τροποποιήσεις που αναφέρθηκαν κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν στόχο να φέρουν τη Soxhlet πλησιέστερα προς τις νέες τεχνικές για την εκχύλιση στερεών δειγμάτων, συντομεύοντας το χρόνο έκπλυσης με τη χρήση βοηθητικών πηγών ενέργειας και την αυτοματοποίηση της εκχύλισης.



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet

Στην κλασική της εφαρμογή που ήταν ο προσδιορισμός του λίπους στο γάλα, το στερεό δείγμα τοποθετείται σε μία φύσιγγα και γεμίζει σταδιακά με το συμπύκνωμα φρέσκου διαλύτη ο οποίος προέρχεται από μία φιάλη στην οποία βράζει. Όταν ο διαλύτης υπερχειλίζει από τον εκχυλιστήρα, αναρροφάται από ένα σифώνιο,

απομακρύνεται από τη φύσιγγα και αδειάζεται στη φιάλη στην οποία γίνεται ο βρασμός. Ο διαλύτης που υπέστη αναρρόφηση, περιέχει τα στερεά συστατικά που έχουν εκχυλιστεί και έτσι τα μεταφέρει στον κύριο όγκο του διαλύτη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η εκχύλιση, μέχρι δηλαδή ο διαλύτης που βρίσκεται μέσα στη φύσιγγα να είναι άχρωμος.

Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet παρουσιάζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, το δείγμα έρχεται συνεχώς σε επαφή με φρέσκο διαλύτη και με αυτό τον τρόπο υπάρχει συνεχώς υψηλό δυναμικό μεταφοράς των εκχυλίσιμων στερεών στο διαλύτη. Επιπλέον, το σύστημα παραμένει σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία λόγω της παροχής θερμότητας για την επίτευξη του βρασμού του διαλύτη και ως αποτέλεσμα η θερμοκρασία στην περιοχή που πραγματοποιείται η εκχύλιση είναι σχετικά υψηλή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας των εκχυλιζόμενων συστατικών στο διαλύτη. Επιπροσθέτως, μετά το πέρας τη εκχύλισης δεν απαιτείται διήθηση του τελικού εκχυλίσματος καθώς τα στερεά παραμένουν μέσα στη φύσιγγα και δεν παρασύρονται με το διαλύτη και ακόμη δεν φαίνεται να παρουσιάζεται επίδραση τη μήτρας στην εκχύλιση. Τέλος, η συμβατική εκχύλιση Soxhlet είναι μία απλή τεχνική που δεν απαιτεί μεγάλο χρόνο εκπαίδευσης και μπορεί να εκχυλίσει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος συγκριτικά με νεότερες εναλλακτικές μεθόδους (εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού κλπ.).

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματά της, η συμβατική εκχύλιση Soxhlet παρουσιάζει ορισμένα σοβαρά μειονεκτήματα συγκρινόμενη με άλλες συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Καταρχάς, ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εκχύλισης είναι πολύ μεγάλος και ακόμη είναι πολύ μεγάλες και οι ποσότητες των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, γεγονός που εκτός από το υψηλό κόστος συνεπάγεται και περιβαλλοντικά προβλήματα κατά την απόρριψή τους. Τα δείγματα συνήθως εκχυλίζονται στο σημείο βρασμού του εκάστοτε διαλύτη, συνεπώς δεν μπορεί να αγνοηθεί πιθανή θερμική αποσύνθεση των εκχυλίσιμων συστατικών, ειδικά όταν πρόκειται για θερμοευαίσθητα συστατικά. Ακόμη η συσκευή της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet δεν είναι δυνατό να παρέχει ανάδευση, η οποία θα επιτάχυνε τη διαδικασία εκχύλισης. Επίσης λόγω των μεγάλων όγκων διαλύτη που χρησιμοποιείται, μετά το πέρας της εκχύλισης είναι απαραίτητο να ακολουθήσει ένα στάδιο που θα περιλαμβάνει εξάτμιση του διαλύτη για συμπύκνωση των εκχυλισμένων συστατικών. Τέλος, η τεχνική βασίζεται στην εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη και δε μπορεί να αυτοματοποιηθεί εύκολα.

2.1.2 Υδρο-ατμοαπόσταξη

Η υδρο-ατμοαπόσταξη είναι μία παραδοσιακή τεχνική για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών, κυρίως αιθέριων ελαίων από φυτά. Στην υδρο-ατμοαπόσταξη δεν εμπλέκονται οργανικοί διαλύτες και είναι μία τεχνική που μπορεί να προηγηθεί της ξήρανσης των φυτών. Υπάρχουν τρεις τύποι υδρο-ατμοαπόσταξης:

1. Απόσταξη με νερό
2. Απόσταξη με νερό και ατμό
3. Απευθείας απόσταξη με ατμό

Στην υδρο-ατμοαπόσταξη, αρχικά το φυτό τοποθετείται σε ένα ακίνητο διαμέρισμα μέσα στον αποστακτήρα και στη συνέχεια προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού η οποία με πρόσδοση θερμότητας έρχεται σε βρασμό. Εναλλακτικά, εγχέεται ατμός απευθείας στο δείγμα του φυτού. Το θερμό νερό και ο ατμός δρουν ως οι κύριοι παράγοντες για την απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών από τον ιστό του φυτού. Στη συνέχεια, το μίγμα υδρατμών και αιθέριου ελαίου του φυτού, ψύχονται με χρήση ψυχρού ρεύματος νερού και συμπυκνώνονται. Το συμπυκνωμένο δείγμα ρέει από το συμπυκνωτή σε ένα διαχωριστή, όπου πραγματοποιείται αυτόματα ο διαχωρισμός του αιθέριου ελαίου και των βιοδραστικών συστατικών από το νερό. Η υδρο-ατμοαπόσταξη εμπλέκει δύο βασικές φυσικοχημικές διεργασίες, τη διάχυση του νερού και την υδρόλυση. Σε υψηλή θερμοκρασία εκχύλισης, είναι πιθανό κάποια από τα πτητικά συστατικά να χαθούν. Αυτό το μειονέκτημα, περιορίζει τη χρήση της υδρο-ατμοαπόσταξης για εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών.

2.1.3 Διαβροχή

Η εκχύλιση με διαβροχή χρησιμοποιούταν στη σπιτική παραγωγή τονωτικών φαρμάκων για πολύ καιρό. Έγινε στη συνέχεια μια πολύ δημοφιλής και φτηνή μέθοδος για την παραλαβή αιθέριων ελαίων και βιοδραστικών συστατικών. Για εκχυλίσεις μικρή κλίμακας, η διαβροχή αποτελείται γενικά από αρκετά βήματα. Αρχικά, γίνεται η άλεση του φυτού σε μικρά σωματίδια ώστε να αυξηθεί το εμβαδό της επιφάνειάς του για την αποτελεσματικότερη ανάμιξη και εκχύλιση με το διαλύτη. Κατά δεύτερον, στη διεργασία της διαβροχής, προστίθεται κατάλληλος διαλύτης σε ένα κλειστό, συνήθως αναδευόμενο δοχείο. Στην τρίτη φάση, το υγρό διηθείται αλλά το στερεό υπόλειμμα της διεργασίας της εκχύλισης συμπιέζεται ούτως ώστε να ανακτηθεί ένα μεγάλο μέρος από το προσροφημένο στην φυτόμαζα διάλυμα. Τα υγρά που συλλέχθηκαν από τη διήθηση και το στράγγισμα της φυτόμαζας, αναμιγνύονται και διαχωρίζονται από πιθανές ακαθαρσίες με διήθηση. Η ανάδευση κατά τη διαβροχή μπορεί να βοηθήσει με δύο τρόπους:

- αύξηση της διάχυσης
- απομάκρυνση του διαλύματος από την επιφάνεια του δείγματος και επαφή φρέσκου διαλύτη με τη φυτόμαζα για αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης.

2.1.4 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

Η εκχύλιση με χρήση οργανικών διαλυτών είναι μία διεργασία σχεδιασμένη για να διαχωρίσει τα διαλυτά συστατικά, με τη διάχυσή τους από μία στερεή μήτρα (φυτόμαζα) σε μία υγρή (διαλύτη). Οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται συχνά για εκχύλιση φαινολικών συστατικών και στη συνέχεια θα αναφερθούμε σε αυτά, καθώς αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Η διεργασία χωρίζεται σε δύο στάδια:

1. **Αρχικό στάδιο.** Κατά το αρχικό στάδιο παρατηρείται διόγκωση των στερεών σωματιδίων του φυτού, λόγω της ρόφησης του διαλύτη από τη στερεή φάση. Η ρόφηση προκαλείται από οσμωτικές δυνάμεις, από τριχοειδή φαινόμενα και από τη διάλυση των ιόντων στα κύτταρα. Σε αυτό το στάδιο, ένα ποσοστό των πολυφαινολών στα κύτταρα που υπέστησαν φθορά από την προεπεξεργασία του φυτού, δηλαδή το κόψιμο, την άλεση ή την κατάψυξη, εκχυλίζονται απευθείας με έκπλυση. Ταυτόχρονα, τα διαλυτά συστατικά, διαλύονται στο διαλύτη. Σε κάποιες εκχυλίσεις μπορεί επίσης να συμβεί διάλυση μέσω υδρόλυσης ενός κλάσματος που μπορεί να είναι φυσικά αδιάλυτο.
2. **Στάδιο της διάχυσης.** Η διάχυση λαμβάνει μέρος σε δύο στάδια. Σε ένα εσωτερικό στάδιο μέσα στη στερεή φάση και σε ένα εξωτερικό στάδιο, μέσω των εξωτερικών στρωμάτων των στερεών σωματιδίων. Στην εκχύλιση χρωματισμένων φαινολικών συστατικών, όπως οι ανθοκυανίνες, αυτό το στάδιο γίνεται άμεσα αντιληπτό από την αλλαγή χρώματος του διαλύματος.

Οι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο για να επιτευχθεί υψηλή απόδοση σε μία εκχύλιση με διαλύτη είναι η φύση του διαλύτη, το pH, η θερμοκρασία, ο αριθμός των βημάτων κατά την εκχύλιση, ο όγκος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και τέλος, το μέγεθος των σωματιδίων του φυτού.

- **Φύση του διαλύτη.** Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη και τα μίγματά τους με νερό. Άλλοι διαλύτες όπως ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας και μίγματα διαλυτών έχουν χρησιμοποιηθεί αλλά παρουσιάζουν συνήθως χαμηλότερες αποδόσεις.

- **pH του μέσου εκχύλισης.** Το pH, καθορίζει το βαθμό διάλυσης των διαλυτών συστατικών και επίσης επηρεάζει την πιθανή διαλυτοποίηση του κλάσματος που μπορεί να υδρολυθεί.
- **Θερμοκρασία.** Οι υψηλές θερμοκρασίες, αυξάνουν την αποδοτικότητα της εκχύλισης, καθώς η θερμότητα καθιστά τα κυτταρικά τοιχώματα διαπερατά, αυξάνει τους συντελεστές διαλυτότητας και διάχυσης των επιθυμητών προς εκχύλιση συστατικών και μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, καθιστώντας τον ικανό να διεισδύσει ευκολότερα στο στερεό υπόστρωμα και να παραλάβει τις εκχυλιζόμενες ουσίες. Παρόλα αυτά, η θερμοκρασία δεν μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλές τιμές, καθώς μπορεί να υποβαθμίσει τα φαινολικά συστατικά.
- **Αριθμός βημάτων και όγκος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.** Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αυξάνεται όσο αυξάνονται και τα βήματα από τα οποία αυτή αποτελείται. Για να είναι ικανοποιητική η απόδοση, απαιτούνται 3-5 εκχυλίσεις της φυτόμαζας.
- **Μέγεθος σωματιδίων του φυτού.** Η ομογενοποίηση της φυτόμαζας και ο υψηλός βαθμός κατάτμησής της, δρουν υπέρ της εκχύλισης, αυξάνοντας την επιφάνεια επαφής των στερεών με το διαλύτη.

Η διαλυτότητα των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από τη χημική φύση τους που μπορεί να ποικίλει από απλές ουσίες μέχρι ουσίες με υψηλό βαθμό πολυμερισμού. Τα φυτικά υλικά μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες φαινολικών οξέων, φαινυλπροπανοειδών, ανθοκυανινών και ταννινών, μεταξύ άλλων. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα της αλληλεπίδρασης των φαινολικών συστατικών με άλλα συστατικά του φυτού, όπως οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να οδηγήσουν στην δημιουργία συμπλόκων που μπορεί να είναι πρακτικά αδιάλυτα. Η διαλυτότητα των φαινολικών συστατικών, επηρεάζεται επίσης και από την πολικότητα του διαλύτη ή των διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Συνεπώς, είναι πολύ δύσκολη η ανάπτυξη μίας μεθόδου εκχύλισης που να μπορεί να εκχυλίσει όλα τα φαινολικά συστατικά που συναντώνται στα φυτά. Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από φυτικά υλικά, αποτελούν ένα πολύπλοκο μίγμα φαινολικών τα οποία είναι διαλυμένα στο σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται.

Διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η προπανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας, καθώς και συνδυασμοί τους, έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φυτά, συνήθως σε μίγματά τους με νερό. Για παράδειγμα, η ρουτίνη και το γλωρογενικό οξύ εκχυλίστηκαν επαρκώς από φαγόπυρα βότανα με εκχύλιση υπό ανάδευση με 30% αιθανόλη στους 60°C για 2

ώρες (Hinneburg et al., 2005). Η εκχύλιση πολυφαινολών από φυτικά υλικά όμως, επηρεάζεται ακόμη από το χρόνο εκχύλισης και άλλους παράγοντες. Έχουν αναφερθεί χρόνοι εκχύλισης από 1 min (Price and Butler, 1977) μέχρι 24 h (Burns, 1971). Υψηλότεροι χρόνοι εκχύλισης δεν ενδείκνυνται, καθώς είναι πολύ πιθανή η πρόκληση οξείδωσης των φαινολικών συστατικών. Ακόμη οι Naczk and Shahidi (1992) βρήκαν ότι μία εκχύλιση δύο σταδίων με 70% ακετόνη v/v, με διάρκεια κάθε σταδίου 1 min σε έναν ομογενοποιητή στα 10.000 rpm, ήταν επαρκής για την εκχύλιση ταννινών από εμπορικά υπολείμματα απελαίωσης canola (ποικιλία ελαιοκράμβης). Επιπλέον στάδια εκχύλισης (μέχρι 6), βελτίωσαν μόνο οριακά την εκχύλιση άλλων φαινολικών συστατικών. Οι Deshpande et al. (1985), καταδεικνύουν ότι ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης που απαιτείται για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από ξηρά φασόλια είναι 50-60 min.

Η εκχύλιση των πολυφαινολών από φυτικό υλικό μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την αναλογία του διαλύτη προς δείγμα (R). Οι Naczk and Shahidi (1992) διαπίστωσαν ότι αλλάζοντας το R από 1: 5 σε 1:10, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης σε ταννίνες από υπολείμματα απελαίωσης canola, από 257,3 σε 321,3 mg / 100 g υπολείμματος και σε ολικές φαινόλες από 773,5 έως 805,8 mg / 100 g υπολείμματος, χρησιμοποιώντας 70% ακετόνη.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών για την εύρεση του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης. Οι Li et al. (2006) για την εκχύλιση φυσικών φλαβονοειδών και φαινολικών συστατικών τα οποία συναντώνται σε αφθονία στις φλούδες εσπεριδοειδών, πραγματοποίησαν εκχύλιση με αιθανόλη και μίγματά της με νερό, αφού πρώτα βρήκαν παρόμοιες αποδόσεις στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών με χρήση μεθανόλης και αιθανόλης. Η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης χαμηλότερης τοξικότητας. Η φλούδα των εσπεριδοειδών πολτοποιήθηκε ώστε να παραληφθεί σκόνη και 2 g της σκόνης αυτής παρέμειναν σε ηρεμία για 3 ώρες σε δοχείο με 16 ml του διαλύτη που όπως προαναφέρθηκε ήταν είτε αιθανόλη είτε νερό είτε μίγματά τους σε διάφορες αναλογίες. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 20°C έως 80°C. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και ακολούθως διήθηση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Με βάση τα προκύπτοντα αποτελέσματα, η ανάκτηση φαινολικών συστατικών ήταν βέλτιστη στην περιοχή 72-85% v/v αιθανόλης, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας έδρασε θετικά στην απόδοση της εκχύλισης.

Οι De Leonardis et al. (2005), μελέτησαν την εκχύλιση φαινολών από απελαιωμένους ηλιόσπορους χρησιμοποιώντας ως διαλύτες νερό και μίγματα αιθανόλης, ακετόνης και μεθανόλης με το νερό, σε αναλογία 60%-40%. Χρησιμοποιήθηκαν 4 g απελαιωμένων ηλιόσπορων, τα οποία αναμίχθηκαν με 100 ml του εκάστοτε διαλύτη και εκχυλίστηκαν υπό ανάδευση για μία ώρα στους 25°C. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές τιμές pH (5,7 και 9). Τελικά προέκυψε ότι η φύση του διαλύτη έπαιξε πολύ μεγαλύτερο ρόλο από το pH της

εκχύλισης. Τα μίγματα αιθανόλης-νερού και ακετόνης-νερού είχαν παρόμοιες αποδόσεις σε φαινόλες και σημαντικά υψηλότερες από το νερό και το μίγμα μεθανόλης-νερού.

Οι Stoica et al. (2013), πραγματοποίησαν εκχυλίσεις με υπερήχους σε μαύρη σταφίδα, χρησιμοποιώντας μίγματα αιθανόλης-νερού σε αναλογίες από 40% έως 80%. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε 1 g μαύρης σταφίδας χρησιμοποιώντας 10 ml διαλύτη και η διάρκειά τους ήταν 0,5 h. Στο τέλος, τα εκχυλίσματα περνούσαν από φυγοκέντρηση και τα υπολείμματα εκχυλίζονταν με την ίδια διαδικασία. Το μίγμα αιθανόλης-νερού 70%-30%, παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά, καθώς και την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Οι Abaza et al. (2011) εκχύλισαν φύλλα ελιάς της ποικιλίας Chetoui χρησιμοποιώντας ως διαλύτες 80% μεθανόλη, 70% αιθανόλη, 80% ακετόνη και απιονισμένο νερό. 1 g φύλλων ελιάς αλέστηκε με γουδί και γουδοχέρι και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml διαλύτη. Το μίγμα παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 24 h, στη συνέχεια το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε. Οι μετρήσεις των ολικών φαινολών, έδειξαν ότι τα μίγματα οργανικών διαλυτών με το νερό είχαν παρόμοια απόδοση στην εκχύλιση ενώ το απιονισμένο νερό χαμηλότερη. Οι μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης έδειξαν ότι το εκχύλισμα της μεθανόλης είχε την υψηλότερη, τα εκχυλίσματα αιθανόλης και ακετόνης είχαν παρόμοια αλλά χαμηλότερη από της μεθανόλης και το εκχύλισμα με απιονισμένο νερό είχε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών τα οποία είναι συνδεδεμένα στα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού, περιπλέκεται από την ποικιλία τους και την ευαισθησία τους στην οξείδωση και την υδρόλυση, συνεπώς καθίσταται αναγκαία η εύρεση μίας μεθόδου ποσοτικής απομόνωσής τους. Είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι η διαφορά στη σταθερότητα στο pH των αιθερικών και των εστερικών δεσμών, μπορούν να καταστήσουν εφικτό το διαχωρισμό των φαινολικών οξέων που είναι συνδεδεμένα με αυτούς τους δεσμούς στα κυτταρικά τοιχώματα της μήτρας στην οποία ανήκουν. Πιο συγκεκριμένα, ο αλκυλ-αρυλ-αιθερικός δεσμός αντιστέκεται στην ήπια αλκαλική υδρόλυση αλλά είναι ευαίσθητος στην όξινη. Συνεπώς σε μία διαδοχική επεξεργασία, η ήπια αλκαλική υδρόλυση βοηθά στην απελευθέρωση των δεσμευμένων με εστερικούς δεσμούς φαινολικών συστατικών και στη συνέχεια η όξινη υδρόλυση διασπά τον αλκυλ-αρυλ-αιθερικό δεσμό για να ελευθερώσει το υπόλοιπο.

Οι Krygier et al. (1982) εκχύλισαν ελεύθερα και εστεροποιημένα φαινολικά οξέα από σπόρους ελαιοκράμβης, χρησιμοποιώντας μίγμα μεθανόλης-ακετόνης-νερού (7:7:6, v/v/v) σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, εκχύλισαν με διεθυλαιθέρα τα ελεύθερα φαινολικά από το εκχύλισμα και στη συνέχεια το επεξεργάστηκαν με NaOH 4M, σε περιβάλλον αζώτου για την απελευθέρωση των εστεροποιημένων φαινολικών οξέων. Το διάλυμα αφού υπέστη την αλκαλική υδρόλυση, οξινίστηκε και

τα απελευθερωμένα φαινολικά οξέα εκχυλίστηκαν με διεθυλαιθέρα. Το δείγμα που απέμεινε, μετά από εξαντλητική εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης-ακετόνης-νερού, επεξεργάστηκε ξανά με NaOH 4M σε περιβάλλον αζώτου για την απελευθέρωση των αδιάλυτων δεσμευμένων φαινολικών οξέων. Διαπιστώθηκε, ότι η αλκαλική υδρόλυση μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία παραγώγων του υδροκινναμικού οξέος.

Οι Rajha et al. (2014), εκχύλισαν βλαστούς αμπέλου με αιθανόλη 50% αφού πρώτα κατέστησαν βασικό το διαλύτη (0,1 M NaOH), καθώς όπως αναφέρουν, η αλκαλική υδρόλυση ελευθερώνει τις πολυφαινόλες που είναι συνδεδεμένες με εστερικούς δεσμούς. Αναφέρουν επιπλέον, ότι το NaOH αυξάνει την προσβασιμότητα στο στερεό υπόλειμμα, απομακρύνοντας το φυσικό εμπόδιο της λιγνίνης. Εξετάστηκε η εκχύλιση με τρία διαφορετικά διαλύματα:

1. 50% αιθανόλη χωρίς NaOH
2. 50% αιθανόλη παρουσία 0,1M NaOH
3. Νερό παρουσία 0,1M NaOH

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υψηλότερη απόδοση λήφθηκε στο διάλυμα του νερού παρουσία NaOH, ενώ η παρουσία NaOH στο αιθανολικό διάλυμα, μείωσε την απόδοση της εκχύλισης συγκριτικά με το αιθανολικό διάλυμα απουσία NaOH. Εξήχθη τελικά το συμπέρασμα πως αυτό συμβαίνει, καθώς τα φαινολικά συστατικά έχουν σε αφθονία τη χαρακτηριστική ομάδα του καρβοξυλικού οξέος. Στο αλκαλικό διάλυμα, η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος μετατρέπεται στο αντίστοιχο ανιόν, το οποίο είναι διαλυτό στο νερό αλλά όχι στην αιθανόλη.

Παρακάτω, στον πίνακα 1, παρατίθενται οι σημαντικότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών με διαλύτες.

Πίνακας 1: Κυριότερες μελέτες πάνω στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών με διαλύτες

Πρώτη ύλη	Προσδιοριζόμενα συστατικά	Συνθήκες εκχύλισης	Σχόλια	Αναφορά
Ύνες καλαμποκιού και πίτουρο σιταριού	Δεσμευμένο φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ	1, 2, 4 M NaOH/ 24, 48, 96 h/ οξίνιση σε pH 2 και εκχύλιση με EtOAc	Εκχύλιση με MeOH έδειξε απουσία ελεύθερων φαινολών Με NaOH καμία επίδραση της συγκέντρωσης και του χρόνου στην ανάκτηση των μονομερών Υψηλότερη ανάκτηση διμερών για 4M NaOH και 96 h	Bauer et al. / LWT - Food Science and Technology 47 (2012) 246-254
Υπολείμματα από λαχανάκια Βρυξελλών και κόκκινο λάχανο	Δεσμευμένες φαινόλες	Εκχύλιση ελεύθερων φαινολών με MeOH και αλκαλική υδρόλυση μετά με 1, 2, 4 M NaOH/ 15, 30, 45 min / 40-80 °C /UAE	Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης 4M NaOH, 60-80°C ανάλογα με τα υπολείμματα Ταυτοποίηση πολλών συστατικών	Gonzales et al. / J. Chromatogr. A 1402 (2015) 60–70
Βλαστοί αμπέλου	Υδροξυκιναμωμικά οξέα (φερουλικό, π-κουμαρικό κ.λ.π.)	Όξινη προ-υδρόλυση για απομάκρυνση της ημικυτταρίνης 1, 2, 3 M NaOH/30-120 min/50-130 °C	Βέλτιστες συνθήκες για ανάκτηση ολικών φαινολών 3 M NaOH και 130°C	Max et al. /J. Agric. Food Chem., Vol. 58, No. 3, (2010) 1909-1917

Σπόροι ελαιοκράμβης	Συρινγικό, σιναπικό, φερουλικό, βανιλικό, κουμαρικό και υδροβενζοϊκό οξύ	Εκχύλιση με EtOH 70%/Acetone 70% και αλκαλική υδρόλυση 1:1 με NaOH 4M	Δημιουργία παραγώγων του υδροκινναμικού οξέος	Krygier et al./ J. Agric. Food Chem. 1982,30, 330- 334
Φλοιοί λιναρόσπορου	Πολυφαινόλες	NaOH 0.05-0.3 M ή κιτρικό οξύ 0.05-0.3 M σε μίγμα EtOH-νερό 50- 50%, 120 min	Σύγκριση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων και άλεσης πριν από την εκχύλιση με ανάδευση και προσδιορισμός D_{eff}	Boussetta et al. / Industrial Crops and Products 52 (2014) 347–353
Φλοιοί σπόρων ηλίανθου	Ολικές φαινόλες, καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ	Μίγματα MeOH, EtOH ή ακετόνης με το νερό (60%) ή σκέτο νερό. pH 5, 7, 9.	Υδόλυση του χλωρογενικού οξέος στο εκχύλισμα σε καφεϊκό οξύ με 1.25 N NaOH	De Leonardis et al./Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107 (2005) 220–227
Μήλα	Πολυφαινόλες Φλαβονοειδή	MeOH ή ακετόνη με σχεδιασμό Box Behnken 10-20 min/ 10-40 °C/ συγκέντρωση διαλύτη στο νερό, 70-100% για τη MeOH, 50-80% για την ακετόνη	Διαφορετικές επιδράσεις και βέλτιστες συνθήκες για κάθε μεταβλητή	Alberti et al. / Food Chemistry 149 (2014) 151–158
Στέμφυλα	Ολικές φαινόλες	Ημιδιαλείποντος έργου με νερό ή EtOH	Μοντελοποίηση (κινητική διάχυσης και D_{eff}) και βελτιστοποίηση με σχεδιασμό Box Behnken	Guerrero et al. / Bioresource Technology 99 (2008) 1311–1318

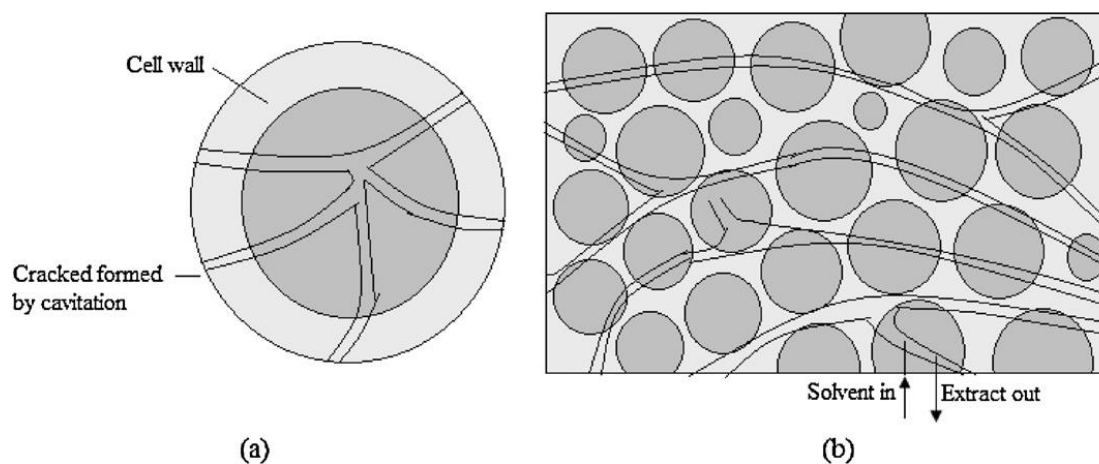
Υπολείμματα σταφυλιών	Ολικές φαινόλες Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης	EtOH ή ακετόνη με νερό (9:1), ανάδευση 5/24 h, 28/60 °C	Υψηλότερες αποδόσεις με EtOH στους 60°C Σύγκριση με βιβλιογραφία	Spigno, De Faveri / J Food Eng 78 (2007) 793–801
Φλούδες εσπεριδοειδών	Ολικά φαινολικά	EtOH:Νερό 0-95%. Ανάδευση 3h, 19-80°C	Απλές ή διαδοχικές εκχυλίσεις Επίδραση προεπεξεργασίας	Li et al. / Separation and Purification Technology 48 (2006) 182–188
Καπνός και φλοιός Βρώμης	Ολικά στερεά	Δοχείο με νερό υπό ανάδευση	Μοντέλο εκχύλισης στερεού-υγρού για τον υπολογισμό του D_{eff} και του πορώδους	Simeonov et al. / Chemical Engineering Journal 73 (1999) 255-259
<i>Eleusine coracana</i>	Πολυφαινόλες Φαινολικά οξέα με HPLC	Δοχείο υπό ανάδευση με νερό, ακετόνη, προπανόλη, αιθανόλη, μεθανόλη, καθαρά ή οξινισμένα με 1% HCl	Μέγιστη απόδοση από την οξινισμένη μεθανόλη Οι πολυφαινόλες ήταν σταθερές κατά την αποθήκευση αλλά όχι σε αλκαλικές συνθήκες (pH=10)	Chethan, Malleshi / Food Chemistry 105 (2007) 862–870
Φύλλα ελιάς	Ολικές φαινόλες Ολικά φλαβονοειδή Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης	Ανάδευση των αλεσμένων φύλλων για 24h με 80% MeOH, 70% EtOH, 80% ακετόνη και απιονισμένο νερό	Καλύτερα αποτελέσματα στη ανάκτηση φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής δράσης από MeOH 80%	Abaza et al., Grasas y aceites, 62 (1), enero-marzo, 96-104, 2011

Κράνμπερι και φαρμακευτικά φυτά	Ολικά στερεά	Εκχυλίσαις (απλές ή διαδοχικές) με πολλούς διαλύτες	Soxhlet	Η αιθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα	Bazykina et al. Pharmaceutical Chemistry Journal 36, 2,46-49, 2002
Τσάι	Ολικά στερεά Ανάλυση HPLC για επιμέρους συστατικά	Ανάμιξη με νερό που βράζει σε pH 1,2-13 (HCl ή NaOH)		Καλύτερα αποτελέσματα για pH 1,2 Οι φλαβόνες και οι κατεχίνες του τσαγιού διασπάστηκαν ή υποβαθμίστηκαν σε αλκαλικές συνθήκες	Liang, Xu / Food Chemistry 74 (2001) 155- 160

2.2 Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

2.2.1 Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE)

Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή τεχνικών με υπέρηχους σε εκχυλίσεις που χρησιμοποιούνται διαλύτες, έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον. Η χρήση υπέρηχων έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιαστεί το φαινόμενο της σπηλαίωσης, το οποίο περιγράφεται ως ο σχηματισμός, η ανάπτυξη και η διάλυση φυσαλίδων αποτελούμενων από μίγμα αερίου-ατμού. Μεταξύ των διαφόρων τρόπων που χρησιμοποιούνται για να προκαλέσουν σπηλαίωση, η υδροδυναμική και η ακουστική σπηλαίωση χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της ευκολίας λειτουργίας. Επίσης προκαλούν εύκολα τις απαιτούμενες εντάσεις που μπορούν να οδηγήσουν σε συνθήκες σπηλαίωσης κατάλληλες για την πρόκληση των επιθυμητών φυσικών και χημικών μεταβολών. Ο μηχανισμός που ελέγχει την εκχύλιση με υπέρηχους αποδίδεται στις μηχανικές και θερμικές επιδράσεις, καθώς και στις επιδράσεις της σπηλαίωσης, οι οποίες βοηθούν τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του εκχυλιζόμενου δείγματος και την καλύτερη μεταφορά μάζας μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του διαλύτη της εκχύλισης.



Εικόνα 2.5: Μηχανισμός της διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματος (a) σπάσιμο του κυτταρικού τοιχώματος λόγω σπηλαίωσης (b) διάχυση του διαλύτη στην κυτταρική δομή

Οι υπέρηχοι είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία πολλών φυσικών και χημικών φαινομένων, όπως είναι οι δονήσεις, η ανάδευση, η αλλαγή πίεσης, η παρουσίαση δυνάμεων διάτμησης, μικρο-δινών και ωστικού κύματος, η συμπύκνωση, η αραίωση και ο σχηματισμός ριζών. Οι φυσικές και βιοχημικές επιδράσεις των υπέρηχων σχετίζονται με τη συχνότητά τους. Τα υπερηχητικά κύματα έχουν συχνότητες πάνω από το εύρος συχνοτήτων που μπορούν να συλληφθούν από το ανθρώπινο αυτί (>20 kHz) και μικρότερες από αυτές των μικροκυμάτων (έως 10 MHz). Η δυνατότητα των υπέρηχων να προκαλέσουν σπηλαίωση εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά τους (π.χ. συχνότητα και ένταση), από τις ιδιότητες του μέσου εκχύλισης (π.χ. ιξώδες και

επιφανειακή τάση) και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος της εκχύλισης (π.χ. θερμοκρασία και πίεση).

Όταν οι φυσαλίδες που προκαλούνται από του υπέρηχους αναπτύσσονται και διαλύονται, λαμβάνουν χώρα τα διάφορα φυσικά και χημικά φαινόμενα που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων μιας μήτρας που έχει υποστεί εκχύλιση σε υπέρηχους, είναι ορατή σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Έτσι τα μηχανικά φαινόμενα και το φαινόμενο της σπηλαίωσης που προκαλούνται από τη χρήση υπερήχων οδηγούν στην εκχύλιση των συστατικών της μήτρας μέσω μίας διαδικασίας δύο σταδίων που περιλαμβάνει:

- είσοδο του διαλύτη στη μήτρα ως αποτέλεσμα της διάρρηξης του κυτταρικού τοιχώματός της, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της μήτρας και μηχανικές επιδράσεις που επιτρέπουν ακόμη μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη και
- παράσυρση των εκχυλιζόμενων συστατικών από τη μήτρα λόγω της αύξησης της επιφάνειας επαφής μεταξύ της υγρής και της στερεάς φάσης.

Ως αποτέλεσμα, οι διαλυτές ουσίες διαχέονται γρήγορα από τη μήτρα στο διαλύτη με αυξημένη ταχύτητα μεταφοράς μάζας μεταξύ των μεμβρανών. Η διαδικασία εισόδου του διαλύματος και έκπλυσης των εκχυλιζόμενων συστατικών συνεχίζεται μέχρι την επίτευξη ισορροπίας. Η εκχύλιση λοιπόν με υπέρηχους χρησιμοποιώντας διαλύτη και στερεή μήτρα, μπορεί να συνοψιστεί ως εξής:

- αυξημένη ταχύτητα μεταφοράς μάζας λόγω τυρβώδους ανάμιξης
- διάρρηξη της μήτρας στη διεπιφάνεια διαλύτη-μήτρας λόγω των ωστικών κυμάτων και των μικρο-δινών
- συγκρούσεις με μεγάλη ταχύτητα μεταξύ των σωματιδίων της μήτρας
- διάλυση της μήτρας για αύξηση της επιφάνειας επαφής

Στον πίνακα 2 αναδεικνύονται οι κυριότερες μελέτες που έχουν γίνει για την εκχύλιση με χρήση υπερήχων για παραλαβή φαινολικών συστατικών.

Πίνακας 2: Κυριότερες μελέτες πάνω στην εκχύλιση φαινολικών συστατικών με υπέρηχους

Πρώτη ύλη	Προσδιοριζόμενα συστατικά	Συνθήκες εκχύλισης	Σχόλια	Αναφορά
Λιναρόσπορος	SDG, HDG (γλυκοζίτες φλαβονολών) Φερουλικός γλυκοζίτης π-κουμαρικός γλυκοζίτης	U bath/ 15-45 kHz/ 20-60 min/ 0.1-0.5 N NaOH	Καλύτερα αποτελέσματα από το 0,2 N NaOH (ίδια με 0,5 N) Για μέγιστη ώρα εκχύλισης και μέγιστη συχνότητα υπερήχων, παρατηρήθηκε μείωση των SDG, HDG Υψηλότερες αποδόσεις από εκχύλιση με MeOH, EtOH ή BuOH	Corbin et al. / Ultrasonics Sonochemistry 26 (2015) 176–185
Λουλούδι του Ιαπωνικού δέντρου παγόδα	Ρουτίνη	Υδατικά διαλύματα NaOH pH 6-8/ μέχρι 120 min /Ultrasound 20kHz	Σύγκριση με μεθανόλη Βέλτιστη απόδοση με μεθανόλη στα 30 min και μείωση μετά	Paniwnyk et al. / Ultrasonics Sonochemistry 8 (2001) 299-301
Ρίζες κόκκινης φασκομηλιάς	Σαλβιανολικό οξύ B	Διάφορες συγκεντρώσεις νερού, MeOH, EtOH και n-BuOH, διάφορες αναλογίες υγρού-στερεού, χρόνοι εκχύλισης, θερμοκρασίες και συχνότητα υπερήχων	Βέλτιστες συνθήκες: 60-70% EtOH, αναλογία υγρού-στερεού 20:1, θερμοκρασία 30°C και συχνότητα υπερήχων 45 kHz	Dong et al. / Ultrasonics Sonochemistry 17 (2010) 61–65
Δενδρολίβανο	Καρνοσικό οξύ	Βουτανόνη, EtOH, EtOAc, ultrasonic probe ή λουτρό, 25-50 °C, διάφοροι χρόνοι	Σύγκριση με εκχύλιση απλής ανάδευσης Καλύτερα αποτελέσματα από το λουτρό υπερήχων στους 50°C για 45 min	Albu et al. / Ultrasonics Sonochemistry 11 (2004) 261–265

Δενδρολίβανο	Ροσμαρινικό οξύ Ουρσολικό οξύ Ορλεανολικό οξύ	Λουτρό υπερήχων, 200W	Υψηλότερη απόδοση ουρσολικού οξέος: με UAE με 90% EtOH και αναλογία υγρού στερεού 15:1 για 10 min Υψηλότερη απόδοση ροσμαρινικού οξέος: με UAE με 70% EtOH και αναλογία υγρού στερεού 15:1 για 30 min ή νερό σε pH 9 Υψηλότερη απόδοση ορλεανολικού οξέος: με απλή ανάδευση	J. Bernatoniene et al. / Industrial Crops and Products 84 (2016) 72–79
Δενδρολίβανο	Ροσμαρινικό οξύ Καρνοσικό οξύ	Λουτρό και probe υπερήχων σε πιλοτική κλίμακα	Η MeOH ήταν αποτελεσματικότερη για το ροσμαρινικό και η EtOH για το καρνοσικό οξύ, σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45 min	Paniwnyk et al. / Ultrasonics Sonochemistry 16 (2009) 287–292
Δενδρολίβανο	Ολικές φαινόλες Ροσμαρινικό οξύ Καρνοσικό οξύ	Λουτρό και probe υπερήχων EtOH και νερό ως διαλύτες σε αναλογία στερεού-υγρού 1:6	Υψηλότερες αποδόσεις ολικών φαινολών και ροσμαρινικού οξέος με το νερό, ενώ καρνοσικού οξέος με την EtOH	Rodríguez-Rojo et al. / Journal of Food Engineering 109 (2012) 98–103
<i>Origanum majorana</i>	Ροσμαρινικό, καφεϊκό και καρνοσικό οξύ Καρνοσόλη, απιγενίνη, γλυκοζίτες της λουτεονίνης	Probe υπερήχων με ρύθμιση πλάτους 24-61 μm, θερμοκρασίες 15-35°C και χρόνοι 5-15 min	Βέλτιστες συνθήκες: Πλάτος 61 μm, θερμοκρασία 35°C και χρόνος 15 min	Hossain et al. / Ultrasonics Sonochemistry 19 (2012) 582–590

Στέμφυλα	Ολικά φαινολικά Ταρταρικοί εστέρες	Λουτρό υπερήχων 25 kHz, , 50% EtOH σε νερό, στερεό/υγρό 1:20, 20-50 °C, 2.5-80 min	Εφαρμογή δεύτερου νόμου του Fick για προσδιορισμό του D_{eff}	Tao et al. / Ultrasonics Sonochemistry 21 (2014) 1461–1469
Στέμφυλα	Ολικές φαινόλες	Probe υπερήχων 55 kHz, νερό, στερεό-υγρό 1:20, 20-50 °C, 2.5-60 min	Σύγκριση με εκχύλιση υπό ανάδευση Ίδια αποτελέσματα με 8 φορές μικρότερο χρόνο εκχύλισης και χαμηλότερη θερμοκρασία στην UAE	González-Centeno et al. / Ultrasonics Sonochemistry 22 (2015) 506–514
Βλαστοί αμπέλου	Πολυφαινόλες Πρωτεΐνες	Σύγκριση UAE και PEF με 0,1 N NaOH σε νερό ή EtOH	Εφαρμογή δεύτερου νόμου του Fick για προσδιορισμό του D_{eff}	Rajha et al. / Food Research International 65 (2014) 462–468
Μαύρη σταφίδα	Πολυφαινόλες Ανθοκυανίνες Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης	UAE για 30 min, θερμοκρασία δωματίου, στερεό-υγρό 1:10, EtOH 40-80%	Καλύτερα αποτελέσματα με EtOH 70%	Stoica et al. / REV. CHIM. (Bucharest) 64 (6), 2013, 620-624
Λουλούδι πυρέθρου Καρπός κρητίδας	Έλαιο καρπού κρητίδας πυρεθρίνες	Horn υπερήχων, 20 and 40 kHz, εξάνιο ως διαλύτης	Αύξηση της απόδοσης στην περίπτωση του πυρέθρου αλλά όχι στον καρπό κρητίδας, λόγω της σκληρότητάς του	Romdhane and Gourdon/Chemical Engineering Journal 87 (2002) 11–19

Οι Rodriguez-Rojo et al. (2012) εκχύλισαν δενδρολίβανο χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, τη συμβατική με ανάδευση, την εκχύλιση με υπέρηχους και την εκχύλιση με μικροκύματα. Και τις 3 εκχυλίσεις τις πραγματοποίησαν 2 φορές χρησιμοποιώντας ως διαλύτες νερό και αιθανόλη 96% σε αναλογία στερεού-υγρού 1:6. Οι εκχυλίσιμες ουσίες των οποίων εξέτασαν τις συγκεντρώσεις, ήταν το ροσμαρινικό και το καρνοσικό οξύ. Η μέγιστη ανάκτηση ροσμαρινικού οξέος πραγματοποιήθηκε με τη συμβατική εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη το νερό, ενώ καρνοσικού οξέος με την εκχύλιση με μικροκύματα και διαλύτη την αιθανόλη. Παρόλα αυτά, η εκχύλιση με υπέρηχους με διαλύτη το νερό, συντέλεσε στην μέγιστη ανάκτηση ολικών φαινολών.

Οι Paniwnyk et al. (2009) εκχύλισαν επίσης δενδρολίβανο, για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες αιθανόλη και μεθανόλη σε συμβατική εκχύλιση με ανάδευση, σε λουτρό υπερήχων 38 kHz με ή χωρίς ανάδευση και σε εκχύλιση με probe υπερήχων 20 kHz. Η παρουσία υπερήχων αύξησε την απόδοση της εκχύλισης τόσο σε ροσμαρινικό, όσο και σε καρνοσικό οξύ αλλά και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Η εκχύλιση με probe υπερήχων, αποδείχθηκε αποτελεσματικότερη ως προς τους παραπάνω παράγοντες, συγκριτικά με την εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων. Τέλος, ο διαλύτης που παρείχε εκχυλίσιμα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος ήταν η μεθανόλη, ενώ η αιθανόλη παρείχε εκχυλίσιμα υψηλότερης συγκέντρωσης σε καρνοσικό οξύ κατά την εκχύλιση με υπέρηχους σε λουτρό υπό ανάδευση και με probe υπερήχων. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι η χρήση υπερήχων, αύξησε κατά πολύ την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αιθανόλης.

Οι Hossain et al. (2012) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο RSM (Response Surface Methodology) για να βελτιστοποιήσουν την εκχύλιση με υπέρηχους από μαντζουράνα, ως προς την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, το περιεχόμενο τους σε ολικές φαινόλες και σε επιμέρους φαινολικά συστατικά. Οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν το πλάτος της επεξεργασίας με υπέρηχους, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Βρέθηκε ότι οι τιμές 61 μm, 35 °C και 15 min των προαναφερθεισών μεταβλητών, αποτέλεσαν τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για τη μεγιστοποίηση των ολικών φαινολών, της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και των φαινολικών συστατικών όπως το ροσμαρινικό, το καφεϊκό και το καρνοσικό οξύ.

Οι Dong et al. (2010) πραγματοποίησαν εκχύλιση με υπέρηχους για την παραλαβή σαλβιανολικού οξέος Β από ρίζες κόκκινης φασκομηλιάς. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν, ήταν η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία στερεού-υγρού, το είδος του διαλύτη και η συχνότητα των υπερήχων. Οι βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν, ήταν οι 30 °C, τα 25 min εκχύλισης, η αιθανόλη 60% σε μίγμα με νερό ως διαλύτης, η αναλογία στερεού-υγρού 1:20 και 45 kHz η συχνότητα των υπερήχων. Η εκχύλιση με υπέρηχους, έχει το πλεονέκτημα ότι λόγω των υψηλών αποδόσεων που μπορεί να δώσει σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής εκχύλισης με διαλύτες, καθώς στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτεί

αυτή για να έχει ικανοποιητικές αποδόσεις, το σαλβιανολικό οξύ Β υδρολύεται προς τανσινόλη.

Οι Paniwnyk et al. (2001), εξέτασαν την εκχύλιση της ρουτίνης, ενός γλυκοζίτη της κερκετίνης από το φυτό *Sophora japonica*. Τα υδατικά διαλύματα καθίστανται ακατάλληλα για τη συγκεκριμένη εκχύλιση, καθώς η κατεργασία τους με υπέρηχους προκαλεί το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και συνεπώς την υποβάθμιση της ρουτίνης. Η εφαρμογή της εκχύλισης αυτής όμως με μεθανόλη ως διαλύτη, οδήγησε σε μείωση του χρόνου που απαιτείται για την ολοκλήρωση της εκχύλισης, καθώς και σε υψηλότερες αποδόσεις, συγκριτικά με την αντίστοιχη συμβατική εκχύλιση.

Τέλος, οι González-Centeno et al. (2015), συγκρίνοντας την συμβατική εκχύλιση με ανάδευση με την εκχύλιση με υπέρηχους σε στέμφυλα, διαπίστωσαν ότι για την επίτευξη ίδιας απόδοσης σε ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος, η εκχύλιση με υπέρηχους χρειάστηκε περίπου 3,4 και 8 min λιγότερα στους 20, 35 και 80°C αντίστοιχα.

2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με εύρος συχνοτήτων από 0,3 μέχρι 300 GHz. Συνήθως τα μικροκύματα τόσο οικιακής όσο και βιομηχανικής χρήσης, λειτουργούν στα 2,45 GHz ώστε να αποφευχθεί η παρεμβολή τους στις ραδιοεπικοινωνίες. Χάρη στην ηλεκτρομαγνητική τους φύση, τα μικροκύματα διαθέτουν ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο κάθετα μεταξύ τους. Το ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί θέρμανση μέσω δύο μηχανισμών που δρουν ταυτόχρονα, της περιστροφής διπόλου και της ιοντικής αγωγιμότητας. Η περιστροφή διπόλου οφείλεται στην ευθυγράμμιση του ηλεκτρικού πεδίου και των μορίων που παρουσιάζουν διπολική ροπή (είτε μόνιμη είτε επαγόμενη από το ηλεκτρικό πεδίο), τόσο του διαλύτη όσο και του στερεού δείγματος. Η ταλάντωση αυτή των μορίων προκαλεί συγκρούσεις μεταξύ τους και συνεπώς απελευθέρωση θερμικής ενέργειας στο μέσο τη εκχύλισης. Λόγω της μεγάλης συχνότητας της ακτινοβολία, το φαινόμενο αυτό συμβαίνει $4,9 \times 10^9$ φορές το δευτερόλεπτο και ως αποτέλεσμα η θέρμανση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο παράγοντας διάλυσης (dissipation factor) του διαλύτη, τόσο καλύτερη είναι και η θέρμανσή του. Ο παράγοντας διάλυσης ($\tan\delta$) εκφράζει την ικανότητα ενός μέσου να απορροφάει την ενέργεια των μικροκυμάτων και να την μεταδίδει ως θερμότητα στα περιβάλλοντα μόρια (Zuloaga et al., 1999). Δίνεται από την εξίσωση:

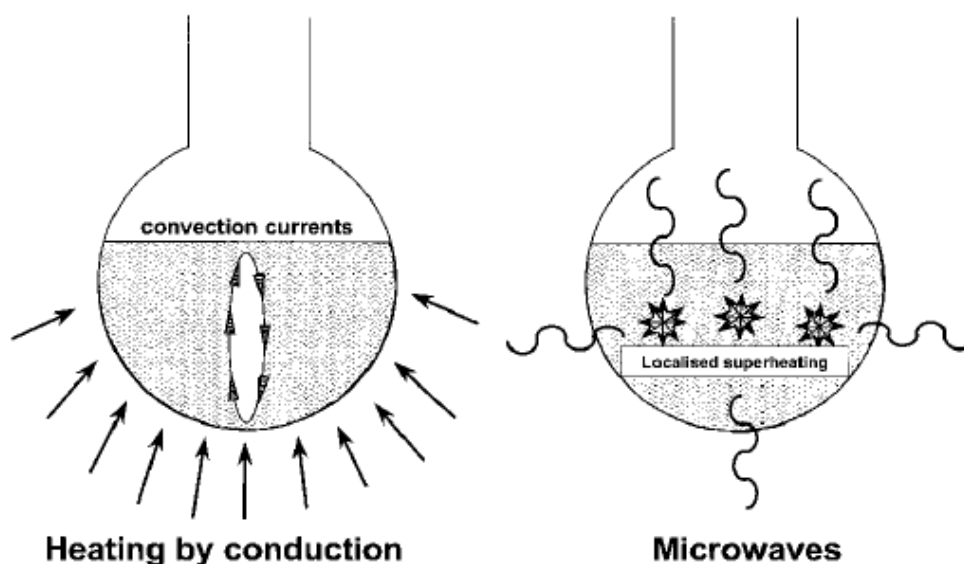
$$\tan\delta=e''/e',$$

όπου e'' είναι η διηλεκτρική απώλεια, που προσδιορίζει την επάρκεια μετατροπής ενέργειας μικροκυμάτων σε θερμότητα και e' είναι η διηλεκτρική σταθερά, που είναι το μέτρο της ικανότητας απορρόφησης ενέργειας μικροκυμάτων. Το μεγάλο

πλεονέκτημα των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τις κλασσικές μεθόδους θέρμανσης με αγωγή, είναι ότι τα μικροκύματα θερμαίνουν όλο το δείγμα ταυτόχρονα.

Πίνακας 3: Διηλεκτρικές σταθερές και παράγοντες διάλυσης μερικών συχνά χρησιμοποιούμενων διαλυτών στην εκχύλιση με μικροκύματα

Διαλύτης	Διηλεκτρική σταθερά (e') (20 °C)	Παράγοντας διάλυσης (tanδ) x 10 ⁻⁴
Ακετόνη	20,7	
Ακετονιτρίλιο	37,5	
Αιθανόλη	24,3	2500
Εξάνιο	1,89	
Μεθανόλη	32,6	6400
2-προπανόλη	19,9	6700
Νερό	78,3	1570



Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση της αρχής θέρμανσης με αγωγή στην κλασσική εκχύλιση και με την ακτινοβολία των μικροκυμάτων στην εκχύλιση με μικροκύματα

Παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ξηρή φυτόμαζα για εκχυλίσεις, τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν ακόμη μικροσκοπικά ίχνη υγρασίας, τα οποία αποτελούν το στόχο της θέρμανση με μικροκύματα. Η υγρασία όταν θερμανθεί μέσα στο φυτικό κύτταρο λόγω του φαινομένου των μικροκυμάτων, εξατμίζεται και ασκεί μεγάλη πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα και συνεπώς τη διόγκωσή του. Το κυτταρικό τοίχωμα λοιπόν, πιέζεται εσωτερικά και έτσι προκαλείται η ρήξη του κυττάρου που επιτρέπει την απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών στον περιβάλλοντα διαλύτη, αυξάνοντας την απόδοση εκχυλίσμων συστατικών. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να ενταθεί ακόμη περισσότερο αν ο διαλύτης που περιβάλλει τη μήτρα του φυτού έχει καλύτερη θερμική απόδοση υπό την επίδραση των μικροκυμάτων. Η υψηλή θερμοκρασία που επιτυγχάνεται με τα μικροκύματα μπορεί να υδρολύσει τους αιθερικούς δεσμούς της κυτταρίνης, που είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, μέσα σε ένα με δύο λεπτά. Η υψηλότερη θερμοκρασία

που επιτυγχάνεται με τα μικροκύματα στο κυτταρικό τοίχωμα, αυξάνει το βαθμό υδρόλυσης της κυτταρίνης και μειώνει τη μηχανική της αντοχή και έτσι ο διαλύτης έχει εύκολα πρόσβαση στα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο (Wang and Weller, 2006).

Οι Zhou και Liu (2006) και οι Kratchanova et al. (2004) μελέτησαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ιστούς από φύλλα καπνού και φρέσκες φλοίδες πορτοκαλιών αντίστοιχα, πριν από την εκχύλισή τους με μικροκύματα και μετά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιφάνεια των δειγμάτων ήταν κατεστραμμένη σε μεγάλο βαθμό μετά από την εκχύλιση με μικροκύματα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η εκχύλιση με μικροκύματα επηρεάζει την κυτταρική δομή των δειγμάτων λόγω της απότομης αύξησης της θερμοκρασίας και της εσωτερικής πίεσης των κυττάρων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η θερμοκρασία που επιτυγχάνεται με τη χρήση των μικροκυμάτων, αυξάνει την διεισδυτικότητα του διαλύτη στη μήτρα και τα εκχυλιζόμενα συστατικά απελευθερώνονται στο περιβάλλοντα θερμό διαλύτη. Παρ' όλα αυτά, σε μερικές περιπτώσεις επιτυγχάνεται επιλεκτική θέρμανση της μήτρας του δείγματος, εμβαπτίζοντας το δείγμα σε ένα άπολο διαλύτη πάνω στον οποίο δεν παρουσιάζουν επίδραση τα μικροκύματα. Αυτή η τεχνική είναι χρήσιμη στην εκχύλιση θερμοευαίσθητων ουσιών, ώστε να μην παρουσιαστεί υποβάθμισή τους.

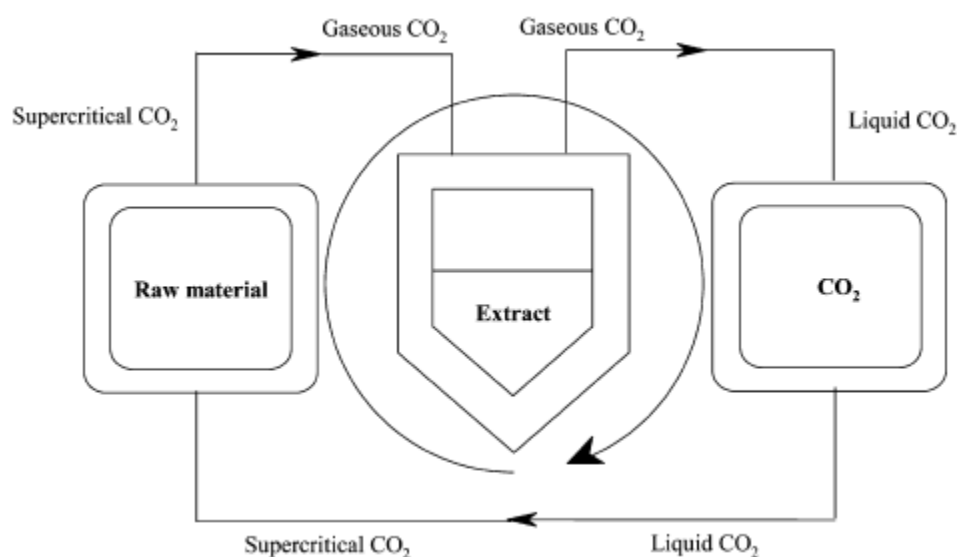
2.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)

Το κρίσιμο σημείο ανακαλύφθηκε το 1822 από τον Cagniard de la Tour. Ως κρίσιμο σημείο μίας καθαρής ουσίας, ορίζεται η υψηλότερη θερμοκρασία και πίεση στην οποία η ουσία μπορεί να υπάρξει σε ισορροπία ατμών-υγρού. Σε θερμοκρασίες και πιέσεις πέραν αυτού του σημείου, σχηματίζεται ένα ομογενές ρευστό, το οποίο είναι γνωστό ως υπερκρίσιμο ρευστό. Το υπερκρίσιμο ρευστό είναι βαρύ σαν υγρό αλλά έχει τη διεισδυτική δύναμη ενός αερίου. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τα υπερκρίσιμα ρευστά αποτελεσματικούς και εκλεκτικούς διαλύτες. Τα υπερκρίσιμα ρευστά παράγονται θερμαίνοντας ένα αέριο πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία του ή συμπιέζοντας ένα υγρό πάνω από την κρίσιμη πίεσή του. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση συστατικών από πολλά φυτά και μικροβιολογικά δείγματα. Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης υπερκρίσιμων ρευστών για εκχυλίσεις, είναι ότι είναι φθηνά, δε ρυπαίνουν, και η απόρριψή τους είναι πιο φθηνή από την απόρριψη οργανικών διαλυτών.

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπερκρίσιμο ρευστό είναι το CO₂ (Palma and Taylor, 1999; Nahar and Sarker, 2005). Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει είναι η χημική του αδράνεια, η χαμηλή του τοξικότητα, το γεγονός ότι είναι φιλικό προς το περιβάλλον και ότι απαιτείται μικρός χρόνος για τη συμπύκνωσή του. Τα συστήματα υπερκρίσιμης εκχύλισης με CO₂ ακολουθούν τα παρακάτω βήματα κατά τη λειτουργία τους:

1. Υγρό CO₂ μετατρέπεται σε υπερκρίσιμη μορφή με κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας και της πίεσής του
2. Το υπερκρίσιμο CO₂ έχει τη δύναμη διαλύτη και εκχυλίζει κυρίως λιπόφιλα και πτητικά συστατικά
3. Αέριο CO₂ επιστρέφει στη δεξαμενή CO₂. Μετά από έναν πλήρη γύρο, η νέα εκχύλιση ξεκινάει ανακυκλώνοντας το CO₂.

Οι εκχυλιζόμενες ουσίες παγιδεύονται αφήνοντας το υπερκρίσιμο CO₂ που τις φέρει, να εκτονωθεί σε ένα άδειο φιαλίδιο, μέσω ενός διαλύτη ή πάνω σε μία στερεή επιφάνεια με προσροφητικές ιδιότητες.



Εικόνα 2.7: Υπερκρίσιμη εκχύλιση με χρήση CO₂ (ανακύκλωση CO₂ σε ένα ερμητικά κλειστό σύστημα)

Η απουσία φωτός και αέρα κατά την υπερκρίσιμη εκχύλιση, μπορούν να μειώσουν τις αντιδράσεις υποβάθμισης που μπορούν να συμβούν ευκολότερα με χρήση άλλων τεχνικών. Για παράδειγμα, οι Tirsrisukond et al. (1998), παρατήρησαν ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μαύρου πιπεριού που παραλήφθηκαν με υπερκρίσιμη εκχύλιση ήταν μεγαλύτερη από αυτή των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν με κλασσικές μεθόδους. Επιπλέον, δεν είναι απαραίτητη η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται, καθώς οι ποσότητες οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως πολύ μικρές.

Για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών, που είναι σε ένα μεγάλο ποσοστό τους πολικές ενώσεις, η χρήση CO₂ δε θα επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Συνεπώς είναι απαραίτητη η χρήση οργανικών διαλυτών μαζί με το υπερκρίσιμο CO₂, δηλαδή τροποποιητών. Σε αυτή την περίπτωση, επειδή η παρουσία του τροποποιητή αυξάνει την κρίσιμη θερμοκρασία, πολλές φορές χρησιμοποιούνται συνθήκες κοντά στις κρίσιμες και όχι υπερκρίσιμες. Η θερμοκρασία δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλή,

καθώς τα περισσότερα φαινολικά συστατικά είναι θερμοευαίσθητα. Οι Lin et al. (1998), βρήκαν τις βέλτιστες συνθήκες για την υπερκρίσιμη εκχύλιση φλαβονών από το φυτό *scutellaria baicalensis*. Όπως αναμενόταν, η απόδοση που επιτεύχθηκε με καθαρό υπερκρίσιμο CO₂ δεν ήταν ικανοποιητική και αλλαγές στην πίεση και τη θερμοκρασία, συντέλεσαν μόνο σε ελάχιστες βελτιώσεις. Ικανοποιητικά αποτελέσματα λήφθηκαν μόνο όταν αυξήθηκε η πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης. η βέλτιστη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μίγμα υπερκρίσιμου CO₂-μεθανόλης-νερού (20:2,1:0,9), σε θερμοκρασία 50°C και πίεση 200 bar.

2.2.4 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)

Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό, που αναφέρεται επίσης ως επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη, είναι μία τεχνική εκχύλισης που χρησιμοποιεί οργανικούς και υδατικούς διαλύτες σε αυξημένη θερμοκρασία και πίεση. Παρόλο που οι αρχικές εφαρμογές αυτής της μεθόδου περιορίζονταν στον περιβαλλοντικό τομέα, η ευελιξία και η ευκολία χρήσης της τεχνικής αυτής, έχει αποδειχθεί χρήσιμη για εργαστήρια που πραγματοποιούν εκχυλίσεις στις βιομηχανίες τροφίμων και πολυμερών, καθώς επίσης και στις φαρμακευτικές.

Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες από αυτές. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας, βελτιώνει την κινητική της, και οδηγεί σε πιο αποτελεσματικές εκχυλίσεις συγκρινόμενες με αυτές των συμβατικών τεχνικών (γρηγορότερες και με χρήση μικρότερων ποσοτήτων διαλύτη). Οι διαλύτες χρησιμοποιούνται υπό πίεση για να διατηρηθούν στην υγρή κατάσταση κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Κοινώς χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού είναι το νερό, η μεθανόλη, η ακετόνη και το εξάνιο σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 75 έως 150°C και πίεση συνήθως 10,4 MPa. Αξίζει να σημειωθεί πως όταν ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι το νερό, η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως υποκρίσιμη εκχύλιση με νερό. Η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού χρησιμοποιεί λοιπόν πολύ θερμά υγρά για να επισπεύσει τη διεργασία της εκχύλισης.

Η τεχνική αυτή έχει ορισμένες εφαρμογές για εκχύλιση φαινολικών συστατικών. Η πίεση που ασκείται, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επαφής μεταξύ του υγρού εκχύλισης και του δείγματος και η υψηλή θερμοκρασία συντελεί στο σπάσιμο των δεσμών των φαινολικών συστατικών με τη μήτρα στην οποία είναι προσδεμένα. Ο ζεστός διαλύτης προκαλεί μετουσίωση των λιποπρωτεϊνών του κυττάρου, αυξάνοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Ο όγκος του διαλύτη που διεισδύει στα κύτταρα αυξάνεται με την θέρμανσή του, δημιουργεί αυξημένη εσωτερική πίεση στο κύτταρο και ωθεί τα διαλυμένα συστατικά στο εξωτερικό του κυττάρου μέσω των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος.

Η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού προσφέρει ακόμη τη δυνατότητα πραγματοποίησης της εκχύλισης σε αδρανή ατμόσφαιρα απουσία φωτός, δύο παραγόντων δηλαδή στους οποίους είναι πολύ ευαίσθητα τα φαινολικά συστατικά. Οι Palma et al. (2001) μελέτησαν τη σταθερότητα 9 φαινολικών συστατικών κατά την εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό σε ένα εύρος θερμοκρασιών 40 έως 150°C (40, 50, 100, 150) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μεθανόλη. Όλα τα φαινολικά ήταν σταθερά σε όλες τις θερμοκρασίες εκτός από την κατεχίνη και την επικατεχίνη στους 150°C (ανάκτηση 87,4% και 86% αντίστοιχα) και την επικατεχίνη στους 100°C (ανάκτηση του 94,1%).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και οι μελέτες των Ibanez et al. (2003) και Herrero et al. (2005), όπου εκχύλισαν φύλλα δενδρολίβανου με υποκρίσιμη εκχύλιση με νερό. Οι καλύτερες συνθήκες για την εκχύλιση του ροσμαρινικού οξέος ήταν οι 100°C, ενώ του καρνοσικού οξέος οι 200°C.

Αρκετές μελέτες έχουν παρουσιάσει συστηματικές προσεγγίσεις για την βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης πεπιεσμένου υγρού και της υποκρίσιμης εκχύλισης με νερό για την παραλαβή φαινολικών συστατικών, καθώς και σύγκριση των αποδόσεων των παραπάνω τεχνικών με τις συμβατικές τεχνικές (Luthria et al., 2007; Kronholm et al., 2004; Pineiro et al., 2001; Hatronen et al., 2007; Luthria, 2006; Chen et al., 2007; Data et al., 2002; King et al., 2006). Το κοινό συμπέρασμα αυτών των μελετών είναι ότι οι τεχνικές εκχύλισης με πεπιεσμένο υγρό είναι προτιμότερες, δίνοντας συγκρίσιμα αποτελέσματα ή ακόμη και καλύτερα, ενώ ήταν γρηγορότερες και οικονομικότερες όσον αφορά τους διαλύτες και τον υπόλοιπο εξοπλισμό που απαιτείται για τη διεκπεραίωσή τους.

2.2.5 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF)

Για περισσότερο από τα τελευταία 50 χρόνια, πραγματοποιείται μεγάλη έρευνα στον τομέα των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, ως μία μη θερμική μέθοδο με αρχικό στόχο την επίτευξη μικροβιακής απενεργοποίησης. Η εστίαση των εφαρμογών των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων έχει να κάνει με το να καταστούν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες, με στόχο τη βελτίωση μεταφοράς συστατικών από το εσωτερικό των κυττάρων. Τα φυτικά και τα ζωικά κύτταρα που είναι μεγαλύτερα από τα βακτηριακά, είναι πιο εύκολο να καταστούν διαπερατά, καθώς απαιτούν ηλεκτρικά πεδία μικρότερη έντασης, γεγονός το οποίο μεταφράζεται σε χαμηλότερη ενεργειακή κατανάλωση.

Χάρη στη δυνατότητά τους να καθιστούν διαπερατές τις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων και με αυτό τον τρόπο να μειώνουν τις αντιστάσεις στη μεταφορά μάζας, τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδος προεπεξεργασίας για να αυξήσουν την απόδοση στην παραγωγή χυμών, να επιταχύνουν τη μεταφορά του νερού κατά τη διεργασία της ξήρανσης και να

βελτιώσουν την εκχύλιση πολύτιμων συστατικών (όπως αντιοξειδωτικών και χρωστικών) από το εσωτερικό των κυττάρων (Vorobiev and Lebonka, 2006).

Η κατεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, περιλαμβάνει την επιβολή τάσης για δημιουργία παλμών συνεχούς ρεύματος για πολύ μικρά χρονικά διαστήματα, από microseconds έως milliseconds, σε ένα υλικό που είναι τοποθετημένο μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Η τάση που επιβάλλεται έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ηλεκτρικού πεδίου, η ένταση του οποίου εξαρτάται από την τιμή της επιβαλλόμενης τάσης και από την απόσταση των ηλεκτροδίων. Η αύξηση της διαπερατότητας των ευκαρυωτικών κυττάρων πραγματοποιείται σε εντάσεις μεταξύ των 0,1 και 1 kV/cm για χρόνους επεξεργασίας από 100 έως 10000 μ s ή σε εντάσεις από 1 έως 10 kV/cm για χρόνο επεξεργασίας μικρότερο από 100 μ s.

Στην περιοχή έντασης του ηλεκτρικού πεδίου 0,1-1 kV/cm, επιτυγχάνεται αντιστρέψιμη διαπερατότητα της μεμβράνης των φυτικών κυττάρων ενώ στην περιοχή εντάσεων 0,5-3 kV/cm, επιτυγχάνεται μη αντιστρέψιμη διαπερατότητα των φυτικών και ζωικών ιστών. Η μη αντιστρέψιμη ρήξη των φυτικών κυττάρων προσφέρει τη δυνατότητα αντικατάστασης ή συμπλήρωσης των συμβατικών θερμικών τεχνικών. Η επίτευξη μη αντιστρεπτής διαπερατότητας στα κύτταρα επιτρέπει τη σημαντική βελτίωση μεταφοράς μάζας που θα προσφέρει σημαντική ενίσχυση σε διεργασίες όπως η ξήρανση, η συμπύκνωση και η εκχύλιση, πετυχαίνοντας υψηλότερες αποδόσεις, μικρότερους χρόνους επεξεργασίας και συνεπώς χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας.

Η βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά κατά την παραγωγή κόκκινου κρασιού με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στα σταφύλια πριν από το στάδιο της ζύμωσης και της διάλυσής τους, είναι μία από τις πιο ερευνημένες εφαρμογές αυτής της τεχνολογίας. Αρχικές μελέτες που διεξήχθησαν το 2005 στο πανεπιστήμιο της Zaragoza, υπέδειξαν ότι η επεξεργασία των σταφυλιών με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (2-10 kV/cm, 0,4-6,7 kJ/kg) πριν από το στάδιο της ζύμωσης, αύξησε την απόδοση σε φαινολικά συστατικά αλλά και επιτάχυνε την εκχύλισή τους σε διαφορετικές ποικιλίες όπως οι Tempranillo, Graciano, Mazuelo, Garnacha, and Cabernet Sauvignon (Lopez et al., 2008a,b, 2009c). Η βελτίωση που παρατηρήθηκε στην ένταση του χρώματος και στη συγκέντρωση ανθοκυανινών και φαινολικών για κάθε ποικιλία σταφυλιών με την εφαρμογή του παλμικού ηλεκτρικού πεδίου, ανήρθε αντίστοιχα από 19% έως 62%, από 18% έως 43% και από 14% έως 45%. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και από τους Donsi et al. (2010) σε δύο Ιταλικές ποικιλίες σταφυλιών, την Aglianico και την Piediroso.

Η δυνατότητα επεξεργασίας σταφυλιών σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο σε πιλοτική κλίμακα (118 kg/h), ερευνήθηκε αργότερα από τους Puertolas et al. (2009a,b). Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν από τα αντίστοιχα εργαστηριακά. Τα καλύτερα χρωματικά χαρακτηριστικά και το υψηλότερο περιεχόμενο σε φαινόλες που προσδιορίστηκαν μετά από επεξεργασία με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, διατηρήθηκαν

κατά την ωρίμανση των κρασιών σε μπουκάλια και δρύινα βαρέλια (Puertolas et al., 2010a,b). Η πρώτη οργανοληπτική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι δεν υπήρξε αλλοίωση της γεύσης του κρασιού που προήλθε με επεξεργασία από το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο και ήταν οργανοληπτικά αντίστοιχο με αυτό που δεν υπέστη αυτή την επεξεργασία (Puertolas et al., 2010c).

Οι Rajha et al. (2014) πραγματοποίησαν κατεργασία με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο σε βλαστούς αμπέλου που είχαν προηγουμένως αλεστεί και συνέκριναν την απόδοση σε ολικές φαινόλες με αυτή που λήφθηκε με κατεργασία με υπέρηχους ή απλή εκχύλιση υπό ανάδευση. Τελικά παρατήρησαν ότι με επεξεργασία με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, επιτεύχθηκε υψηλότερη απόδοση σε πολυφαινόλες συγκριτικά με την εκχύλιση με υπέρηχους και την απλή εκχύλιση υπό ανάδευση. Οι ολικές φαινόλες που παρέλαβαν με εκχύλιση μετά από κατεργασία με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, ήταν 23 mg GAE/g πρώτης ύλης, ενώ με κατεργασία με υπέρηχους και εκχύλιση με απλή ανάδευση οι αντίστοιχες τιμές ήταν 16 mg GAE/g πρώτης ύλης και 11 mg GAE/g πρώτης ύλης.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Στόχος-σχεδιασμός πειραμάτων

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των μεθόδων ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum* με εκχύλιση και η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Ειδικότερα, σκοπός ήταν να παραληφθεί αφ' ενός το αιθέριο έλαιο του φυτού, αφ' ετέρου τα φαινολικά-αντιοξειδωτικά συστατικά της απελαιωμένης φυτόμαζας.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε υδρο-ατμοαπόσταξη της ξηρής φυτόμαζας, ούτως ώστε να παραληφθεί το αιθέριο έλαιο. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είναι πλούσιο σε καρβακρόλη, θυμόλη, γ-τερπινένιο και π-κυμένιο (Sivropoulou et al., 1996), ουσίες οι οποίες έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Κατά τη διάρκεια της υδρο-ατμοαπόσταξης λαμβάνονταν δείγματα του αιθέριου ελαίου τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη μέθοδο GC-MS, ώστε να προσδιοριστεί η σύσταση του αιθέριου ελαίου και η κινητική της απόσταξης των επιμέρους συστατικών που το απαρτίζουν. Επιπλέον, εξετάστηκε η δυνατότητα κλασμάτωσης του αιθέριου ελαίου προς παραλαβή κλάσματος πλούσιου σε καρβακρόλη, που είναι το συστατικό που καθορίζει την εμπορική τιμή του αιθέριου ελαίου της ρίγανης.

Στο επόμενο στάδιο των πειραμάτων, σκοπός ήταν η ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών από το απελαιωμένο πλέον φυτό. Η ρίγανη περιέχει μεγάλο πλήθος φαινολικών συστατικών που έχουν βιοδραστικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συντήρηση τροφίμων. Συνεπώς, σκοπός ήταν η μελέτη μεθόδων που καθιστούν δυνατή τη μέγιστη ανάκτηση των φαινολικών αυτών συστατικών. Οι μέθοδοι αυτές έπρεπε να είναι απλές και οικονομικές ώστε να μπορούν να έχουν κάποια βιομηχανική εφαρμογή. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια αποφυγής οργανικών διαλυτών και χρησιμοποιήθηκαν μόνο υδατικά ή υδραλκοολικά διαλύματα.

Αρχικά, αφού ξηράνθηκε και κονιοποιήθηκε η απελαιωμένη φυτόμαζα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet σε ορισμένο δείγμα της, ούτως ώστε να προσδιοριστεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του φυτού αλλά και η σύστασή του με χρωματογραφική ανάλυση. Οι διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, βοηθούν στην κλασμάτωση των συστατικών και στον καλύτερο διαχωρισμό τους στη χρωματογραφία. Η τεχνική Soxhlet παρά το γεγονός ότι είναι εξαντλητική, δηλαδή απογυμνώνει το φυτό από το φαινολικό του φορτίο, έχει κάποια σοβαρά μειονεκτήματα: απαιτεί χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλύτη και επιπλέον χρειάζεται θέρμανση ώστε να επιτυγχάνεται συνεχώς ο βρασμός του εκάστοτε διαλύτη. Το τελευταίο σε συνδυασμό με το μεγάλο χρόνο που χρειάζεται

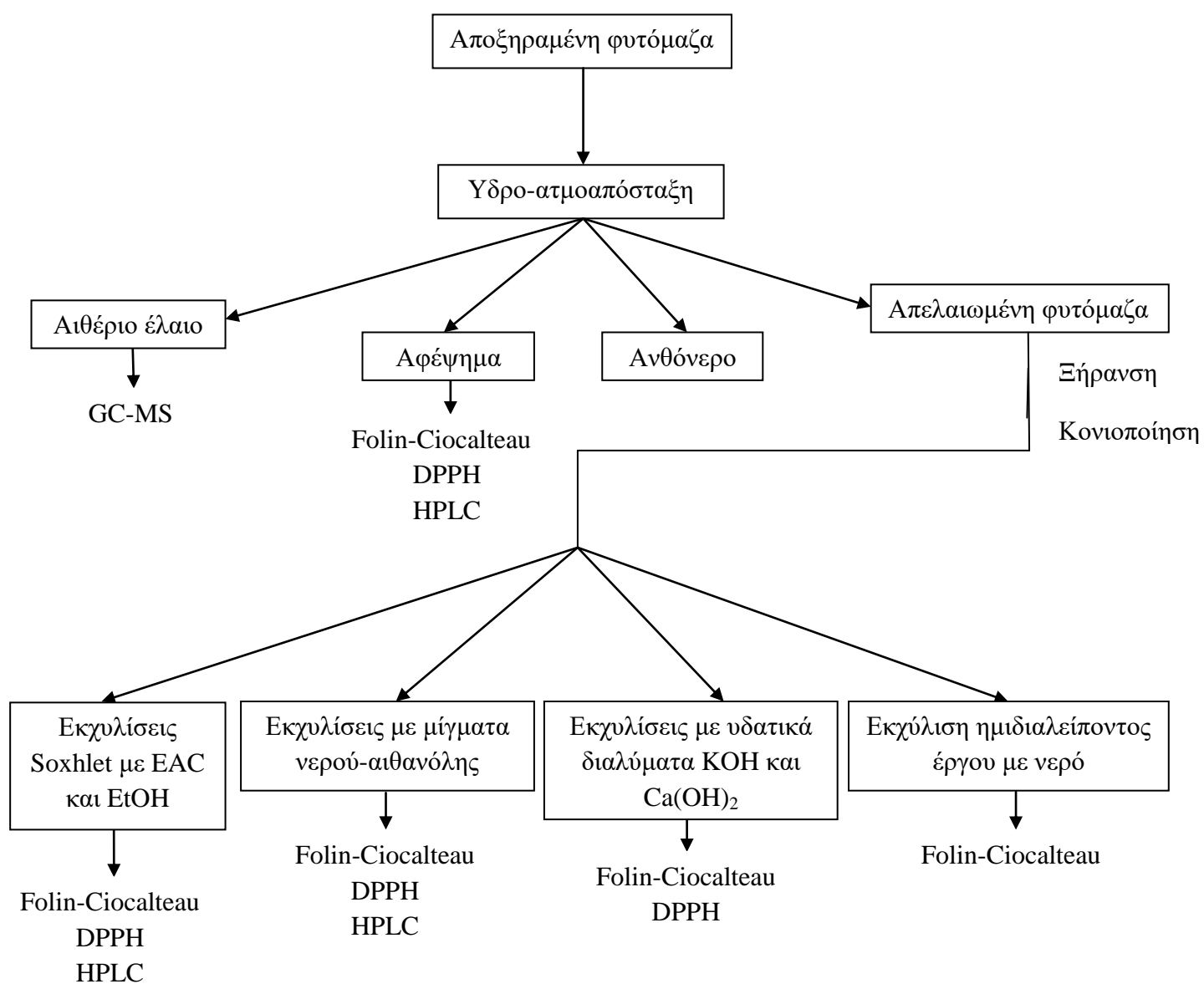
για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ποσά θερμότητας που δαπανώνται κατά τη διεργασία την καθιστούν μη βιώσιμη για βιομηχανική εφαρμογή, για αυτό το λόγο κιάλας περιορίζεται σε εργαστηριακή κλίμακα. Η εναλλακτική μέθοδος που θα χρησιμοποιούταν για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών από τη ρίγανη θα έπρεπε να είναι λοιπόν μια μέθοδος που θα χαρακτηρίζεται από απλότητα σαν διάταξη, δε θα απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας, θα είναι λιγότερο χρονοβόρα από τη συμβατική τεχνική Soxhlet και θα περιορίζει τη χρήση των διαλυτών.

Η αιθανόλη σε μίγματα με το νερό, όπως βρέθηκε βιβλιογραφικά, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από αρωματικά φυτά και όχι μόνο και επιπλέον δεν παρουσιάζει τοξικότητα. Λαμβάνοντας υπ' όψη όλα τα παραπάνω κριτήρια, η πρώτη σειρά πειραμάτων περιελάμβανε εκχυλίσεις με απλή ανάδευση σε διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης-νερού. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν η αναλογία αιθανόλης-νερού, η θερμοκρασία της εκχύλισης, καθώς και η αναλογία διαλύτη-ξηρής φυτόμαζας. Οι αναλύσεις των εκχυλισμάτων έγιναν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου, με τη μέθοδο DPPH για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και τέλος με HPLC για την εύρεση της τελικής σύστασης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, σε ορισμένες συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις για να διερευνηθεί η δυνατότητα ανάκτησης μεγαλύτερου ποσοστού των ολικών φαινολών του φυτού.

Εκτός από τα πειράματα με διαλύτη μίγματα αιθανόλης-νερού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αλκαλικό περιβάλλον. Σύμφωνα με τους Max et al. (2010) η παρουσία αλκαλικού περιβάλλοντος, αυξάνει την απόδοση σε φαινολικά συστατικά. Πραγματοποιήθηκαν λοιπόν, πειράματα εκχύλισης με διαλύματα $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (σχεδόν κορεσμένο, pH 12) και KOH (0,2N, pH 13,3) και τα τελικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ώστε να μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση της επίδρασης των αλκαλικών συνθηκών με την επίδραση των εκχυλίσεων σε μίγματα αιθανόλης-νερού. Η ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από τα αλκαλικά εκχυλίσματα, απαιτεί την οξίνιση του τελικού εκχυλίσματος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές βάσεις, ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα καταβύθισης του άλατος (π.χ. κιτρικό ασβέστιο) και απομάκρυνσής του από το εκχύλισμα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μία εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου, χρησιμοποιώντας το διαλύτη που επιτύγχανε τη μέγιστη ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών στο σύστημα με ανάδευση, ώστε να μπορέσει να γίνει μία άμεση σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων εκχύλισης. Και σε αυτή την περίπτωση, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του τελικού εκχυλίσματος, εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Διάγραμμα ροής πειραμάτων



3.2 Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια - Συσκευές

3.2.1 Πρώτες ύλες

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια τη πειραματική διαδικασία, ήταν αποξηραμένα φύλλα ρίγανης (*Origanum Vulgare* ssp. *hirtum*), η οποία είναι ένα φυτό τη οικογένειας των χειλανθών. Παραλήφθηκε από το τμήμα αρωματικών φαρμακευτικών φυτών του κέντρου γεωργικής έρευνας βορείου Ελλάδας, το οποίο είναι μέλος του οργανισμού Δήμητρα. Η συγκομιδή του έγινε το 2015.

3.2.2 Αντιδραστήρια

Για τις αναλύσεις φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany), 2,2,- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), και ανθρακικού νατρίου (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri). Για τις εκχυλίσεις σε αλκαλικό περιβάλλον χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του καλίου (potassium hydroxide, 86,15%, Fisher Chemical, Loughborough, Leics, UK) και υδροξείδιο του ασβεστίου (calcium hydroxide, 96%, Merck, Darmstadt, Germany) και για την οξίνιση των εκχυλισμάτων ένυδρο κιτρικό οξύ (citric acid 1- hydrate, analytical grade, Panreac, Barcelona, Spain). Για τις καμπύλες αναφοράς της μεθόδου Folin-Ciocalteu και DPPH, χρησιμοποιήθηκαν γαλλικό οξύ (98% w/w), (Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey) και trolox (Aldrich, Denmark). Οι διαλύτες εκχυλίσεων οξικός αιθυλεστέρας και αιθανόλη ήταν από την Fisher Chemical (Loughborough, Leics, UK), ποιότητας HPLC και βαθμού MS. Το νερό, το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και το τριφθοροξικό οξύ που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές αναλύσεις, ήταν επίσης ποιότητας HPLC και βαθμού MS (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Για τις αναλύσεις GC-MS, αναλύθηκε ένα πρότυπο μίγμα αλκανίων C7-C30 για τον προσδιορισμό κατακράτησης δεικτών, ενώ το αιθέριο έλαιο αραιώθηκε σε εξάνιο πριν από τις αναλύσεις GC-MS.

3.3.3 Συσκευές

Για την υδρο-ατμοαπόσταξη της αποξηραμένης ρίγανης, χρησιμοποιήθηκε ο πιλοτικός αποστακτήρας του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας τροφίμων του Ε.Μ.Π., ο οποίος απεικονίζεται στην εικόνα 3.1. Αποτελείται από χάλκινο καζάνι χωρητικότητας 17 L.



Εικόνα 3.1: Διάταξη υδρο-ατμοαπόσταξης

Για την ξήρανση της φυτόμαζας που συλλέχθηκε μετά την υδρο-ατμοαπόσταξη, χρησιμοποιήθηκε φούρνος κυκλοφορίας αέρα (Binder, Germany)

Για τις εκχυλίσεις της ξηρής και απειλαιωμένης ρίγανης χρησιμοποιήθηκε εκχυλιστήρας Soxhlet όγκου 200 mL και το εκχύλισμα συλλεγόταν σε φιάλη όγκου 500 mL.

Για την εκχύλιση υπό ανάδευση του φυτού, χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που εικονίζεται στην εικόνα 3.2. Η διάταξη αποτελείται από μεταλλικά στηρίγματα, μία σφαιρική φιάλη όπου πραγματοποιείται η εκχύλιση, οποία είναι εμβαπτισμένη σε υδατόλουτρο, έναν αναδευτήρα (Heidolph R7R1, Germany) και έναν ψυκτήρα.



Εικόνα 3.2: Διάταξη εκχύλισης υπό ανάδευση

Για την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου χρησιμοποιήθηκε ένας ανοξείδωτος εκχυλιστήρας διαμέτρου 3 cm και ύψους 9 cm στον οποίο προσαρμόζεται ακριβώς φύσιγγα (MN 645, Macherey Nagel, Duren, Germany) ίδιων διαστάσεων και περισταλτική αντλία (Millipore, Bedford, Massachusetts). Η διάταξη απεικονίζεται στην εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3: Διάταξη εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου

Οι αναλύσεις HPLC των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης, που 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 5 μ m, 250x 4.6mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany).

Οι αναλύσεις GC-MS των εκχυλισμάτων 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 μ m x 0,25 μ m, Hewlett Packard, Ραίο Alto, CA, USA).

Τέλος, για τις φασματομετρικές τεχνικές, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Hitachi U29000.

3.3 Πειραματικές τεχνικές

3.3.1 Υδρο-ατμοαπόσταξη

Για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τη ρίγανη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υδρο-ατμοαπόσταξης. Στον αποστακτήρα αρχικά προστέθηκαν 4 L απιονισμένο νερό και στη συνέχεια σε ένα πλέγμα πάνω από την επιφάνεια του νερού και χωρίς να έρχεται σε επαφή με αυτό, τοποθετήθηκαν 500 g ρίγανης. Η φυτόμαζα τοποθετήθηκε σχετικά αραιά και δεν πακτώθηκε, ούτως ώστε να είναι δυνατή η διέλευση του ατμού διαμέσου της. Στη συνέχεια, με πρόσδοση θερμότητας στο νερό, ξεκίνησε ο βρασμός και μετά από 29 min άρχισε η παραλαβή του αποστάγματος. Το απόσταγμα αποτελούνταν από ανθόνερο και αιθέριο έλαιο τα οποία διαχωρίζονταν στο βαθμονομημένο συλλέκτη στον οποίο κατέληγαν, λόγω της διαφορετικής πυκνότητάς τους. Κατά τη διάρκεια της απόσταξης λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα δείγματα των 2 μ L αιθέριου ελαίου, τα οποία αραιώνονταν με 10 mL εξανίου, ούτως ώστε να αναλυθούν με τη μέθοδο GC-MS. Συνολικά λήφθηκαν 9 δείγματα και η συνολική διάρκεια της απόσταξης ήταν 420 min. Ως κριτήριο για το τέλος της απόσταξης, χρησιμοποιήθηκε η μη αναγνωρίσιμη μεταβολή του όγκου του αιθέριου ελαίου σε διάστημα 20 λεπτών. Μετά το πέρας της απόσταξης, το αφέψημα (W_s), δηλαδή το νερό μέσα στον αποστακτήρα που περιείχε τις υδατοδιαλυτές ενώσεις της ρίγανης, διηθήθηκε και στη συνέχεια μετρήθηκε το στερεό υπόλειμμα του, ενώ συλλέχθηκε το ανθόνερο και φυσικά το αιθέριο έλαιο.

3.3.2 Κλασμάτωση αιθέριου ελαίου

Με βάση προηγούμενη μελέτη παραλαβής του αιθέριου ελαίου από το φυτό *Satureja Thymbra*, η καρβακρόλη είναι μια ουσία που η μεγαλύτερη της ποσότητα δεν αποστάζεται από την αρχή αλλά μετά από κάποια ώρα και δίνει ένα χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στο αιθέριο έλαιο (Παρασκευοπούλου, 2015). Ακόμη, είναι γνωστό ότι το αιθέριο έλαιο του φυτού *O. Vulgare ssp hirtum* είναι πλούσιο σε καρβακρόλη (Kokkini and Vokou, 1989). Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση του αιθέριου ελαίου, ώστε να παραληφθούν ένα κλάσμα φτωχό και ένα κλάσμα πλούσιο σε καρβακρόλη. Για την κλασμάτωση του αιθέριου ελαίου, απλώς αλλάχθηκε ο συλλέκτης που χρησιμοποιούταν στην υδρο-ατμοαπόσταξη, όταν το χρώμα του ελαίου ξεκίνησε να γίνεται πιο έντονο κόκκινο.

3.3.3 Εκχυλίσεις Soxhlet

Η φυτόμαζα που παραλήφθηκε από την υδρο-ατμοαπόσταξη, ξηράνθηκε σε φούρνο με κυκλοφορία αέρα στους 38°C για 24 ώρες και στη συνέχεια ορισμένη ποσότητά της κονιοποιήθηκε σε blender και πέρασε από κόσκινο 500 μ m.

Πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet σε 48,44 g της ρίγανης, πρώτα με οξικό αιθυλεστέρα και στη συνέχεια με αιθανόλη. Η ποσότητα της ρίγανης τοποθετήθηκε σε μία φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού και εκχυλίστηκε αρχικά με 130 mL οξικού αιθυλεστέρα, ώστε να παραληφθούν τα άπολα συστατικά της. Με το πέρας της εκχύλισης μετά από 6,5 ώρες, όταν δηλαδή παρατηρήθηκε ότι ο διαλύτης που ερχόταν σε επαφή με τη φυτόμαζα παρέμενε άχρωμος, το εκχύλισμα αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL με οξικό αιθυλεστέρα και μετρήθηκε το στερεό του υπόλειμμα. Η φύσιγγα με τη ρίγανη ξηράνθηκε για μία ημέρα και στη συνέχεια η ίδια ρίγανη εκχυλίστηκε ξανά στη συσκευή Soxhlet με 130 mL αιθανόλης αυτή τη φορά. Μετά το πέρας της εκχύλισης, δηλαδή σε 6,5 ώρες, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα φυλάχθηκαν στο ψυγείο, έως ότου αναλυθούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

3.3.4 Εκχυλίσεις υπό ανάδευση με μίγματα αιθανόλης-νερού

Χρησιμοποιήθηκε απειρωμένη, αποξηραμένη και κονιοποιημένη φυτόμαζα όπως και στις εκχυλίσεις Soxhlet. Στα πειράματα εκχύλισης διαλείποντος έργου υπό ανάδευση, εξετάστηκαν ως παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη, η θερμοκρασία και η αναλογία υγρού-στερεού. Αρχικά εξετάστηκαν μίγματα αιθανόλης με το νερό με περιεκτικότητα αιθανόλης 0%, 60%, 80% και 96% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (22°C) και σε αναλογία υγρού-στερεού 20:1. Για την επίτευξη αυτής της αναλογίας, χρησιμοποιούνταν 5 g φυτού και 100 mL διαλύτη. Στο πείραμα με 80% αιθανόλη, ακολούθησε 2^η διαδοχική εκχύλιση της φυτόμαζας που συλλέχθηκε από το πρώτο στάδιο με την ίδια αναλογία υγρού-στερεού. Στη συνέχεια, εξετάστηκε σε πείραμα με 0% αιθανόλη, πως επιδρά η αύξηση της αναλογίας υγρού-στερεού στην απόδοση της εκχύλισης. Συγκεκριμένα εξετάστηκε αναλογία υγρού-στερεού 40:1. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην εκχύλιση με 0% και 96% αιθανόλη. Και στις 2 περιπτώσεις εξετάστηκαν εκτός από τους 22°C και οι 40 και 60°C. Σε όλες τις περιπτώσεις, η αναλογία υγρού-στερεού, διατηρήθηκε στο 1:20. Στο πείραμα με 0% αιθανόλη στους 60°C, πραγματοποιήθηκε και 2^η διαδοχική εκχύλιση της φυτόμαζας που συλλέχθηκε από το πρώτο στάδιο με την ίδια αναλογία υγρού-στερεού, στην ίδια θερμοκρασία.

Σε όλα τα πειράματα πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες 1 mL ανά τακτά χρονικά διαστήματα, εκτός από τα πειράματα με το 0% αιθανόλη όπου οι δειγματοληψίες ήταν 2 mL, καθώς αντιμετωπίστηκαν δυσκολίες λόγω της διόγκωσης του φυτικού υλικού από το νερό. Όλα τα δείγματα διηθούνταν άμεσα μετά την παραλαβή τους. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα διηθούνταν υπό κενό, σημειωνόταν ο όγκος του και μετρούταν το στερεό υπόλειμά του. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 2 φορές εκτός από αυτά των 2^{ων} διαδοχικών εκχυλίσεων λόγω δυσκολίας ανάκτησης επαρκούς ποσότητας φυτικού υλικού για την πραγματοποίησή τους.

3.3.5 Εκχυλίσεις υπό ανάδευση σε αλκαλικό περιβάλλον

Εκτός από τις εκχυλίσεις με μίγματα αιθανόλης-νερού, εξετάστηκε και εκχύλιση υπό ανάδευση παρουσία υδατικών διαλυμάτων $\text{Ca}(\text{OH})_2$ και KOH στην απειλωμένη, αποξηραμένη και κονιοποιημένη φυτόμαζα. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε κορεσμένο διάλυμα $\text{Ca}(\text{OH})_2$ το οποίο είχε pH 12,34 και αραιώθηκε σε pH 12 με τη βοήθεια πεχάμετρου. Ακόμη, παρασκευάστηκε διάλυμα KOH 0,2 N (pH 13,3). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στους 22°C με αναλογία υγρού στερεού 20:1 και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τις εκχυλίσεις με μίγματα αιθανόλης-νερού. Οι δειγματοληψίες ήταν 2 mL λόγω παρόμοιων προβλημάτων διόγκωσης με τα πειράματα με το νερό και κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Μετά το πέρας των εκχυλίσεων, τα εκχυλίσματα παραλαμβάνονταν αφού πρώτα διηθούνταν, μετρούταν το pH τους και με τη βοήθεια πεχαμέτρου, προστίθετο κιτρικό οξύ ώστε το pH να φτάσει αυτό των εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν με χρήση νερού ως διαλύτη εκχύλισης.

3.3.6 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό

Σε εκχυλιστήρα εργαστηριακής κλίμακας και όγκου 100 mL, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό, χρησιμοποιώντας ξανά την απειλωμένη, αποξηραμένη και κονιοποιημένη φυτόμαζα. Πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν σε φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού 20 g φυτόμαζας και η φύσιγγα εισήχθη στον εκχυλιστήρα. Η άντληση του νερού πραγματοποιούνταν από ογκομετρικό κύλινδρο μέσω περισταλτικής αντλίας με ογκομετρική ροή 5 mL/min. Ως χρόνος μηδέν της εκχύλισης, θεωρήθηκε ο χρόνος στον οποίο παρουσιάστηκε η πρώτη σταγόνα εκχυλίσματος στην έξοδο του εκχυλιστήρα. Η συλλογή του εκχυλίσματος πραγματοποιούνταν σε βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο ούτως ώστε να μπορεί να μετρηθεί με το χρόνο η ροή του εκχυλίσματος. Τακτικές δειγματοληψίες 1 mL πραγματοποιούνταν από την έξοδο του εκχυλιστήρα, ενώ πραγματοποιήθηκαν και 4 δειγματοληψίες 1 mL από το εκχύλισμα αφού πρώτα αναδευόταν καλά. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές.

3.4 Αναλυτικές μέθοδοι

3.4.1 GC-MS για ανάλυση αιθέριου ελαίου

Για την ανάλυση του αιθέριου ελαίου, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα 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 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 m/z 40-400, και η ταυτοποίηση των ουσιών βασίστηκε στη σύγκριση με τα δεδομένα των βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών NIST και Wiley. (Παρασκευοπούλου, 2015).

3.4.2 HPLC για ανάλυση φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα

Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων διεξήχθη σε σύστημα χρωματογραφίας Varian 212-LC, σε συνδυασμό με ένα φασματομέτρο 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 ενσωματώθηκαν μετά τη διήθηση (0.45 μm , φίλτρα σύριγγας PVDF, Teknokroma, Βαρκελώνη, Ισπανία) 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. Η ποσοτικοποίηση των επιμέρους ενώσεων βασίστηκε σε καμπύλες αναφοράς που έχουν κατασκευαστεί για χαρακτηριστικές ουσίες καθε κατηγορίας, στα προαναφερθέντα μήκη κύματος (Παρασκευοπούλου, 2015).

3.4.3 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα

Ο προσδιορισμός των στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας 5 mL με σιφόνιο πληρώσεως από το κάθε εκχύλισμα και μεταγγίζοντας τα σε φιαλίδια ζύγισης τα οποία είχαν προζυγιστεί. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια ζύγισης είτε τοποθετούνταν σε φούρνο στους 103°C για μία ημέρα, είτε -αν ο διαλύτης ήταν πτητικός- έμεναν στο περιβάλλον ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο φούρνο. Μετά το πέρας

της μίας ημέρας, τα φιαλίδια ζύγισης παρέμεναν για 20 min σε ξηραντήρα και στη συνέχεια ζυγίζονταν για να προσδιοριστεί το στερεό υπόλειμμα.

3.4.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πολλές διαθέσιμες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε τρόφιμα ή βιολογικά δείγματα, στηρίζονται στην αντίδραση των φαινολικών συστατικών με ένα χρωματομετρικό αντιδραστήριο που καθιστά εφικτή τημέτρηση στην περιοχή του ορατού φάσματος. Μία τέτοια μέθοδος είναι και η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό περιβάλλον από τα φαινολικά συστατικά προς συμπλέγματα φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος, που συντελεί στη δημιουργία μπλε συμπλόκων τα οποία προσδιορίζονται φασματομετρικά στα 760 nm.

Αρχικά παρασκευάστηκε κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο. Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 800 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση μέχρι βρασμού και εν συνεχεία αφέθηκε να ψυχθεί. Προστέθηκαν μερικοί κρύσταλλοι ένυδρου Na_2CO_3 και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h. Ακολούθησε διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

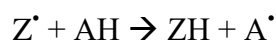
Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος το οποίο θα χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 0,500 g γαλλικού οξέος και ακολούθησε αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή (stock διάλυμα). Στη συνέχεια σε ογκομετρικές φιάλες των 50 mL, προστέθηκαν 0, 1, 3, 5, 10 και 0,5 mL από το stock διάλυμα γαλλικού οξέος και ακολούθησε αραιώση μέχρι τη χαραγή. Έτσι οι περιεκτικότητες των διαλυμάτων που προέκυψαν ήταν 0, 100, 300, 500, 1000 και 50 mg/L αντίστοιχα.

Τέλος για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων (ή του πρότυπου δείγματος), προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 100 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος (ή πρότυπου), 7,9 mL απιονισμένο νερό και 500 μL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση σε vortex, έπειτα προσθήκη 1,5 mL Na_2CO_3 και στη συνέχεια και πάλι ανάδευση σε vortex. Για την παρασκευή τυφλού δείγματος ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι αντί για 100 μL δείγματος στο δοκιμαστικό σωλήνα, προστέθηκαν 100 μL απιονισμένο νερό. Τα δείγματα αφέθηκαν για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40°C και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή τους σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης (Hitachi U29000) στα 765 nm θεωρώντας ως μηδέν την απορρόφηση του τυφλού δείγματος.

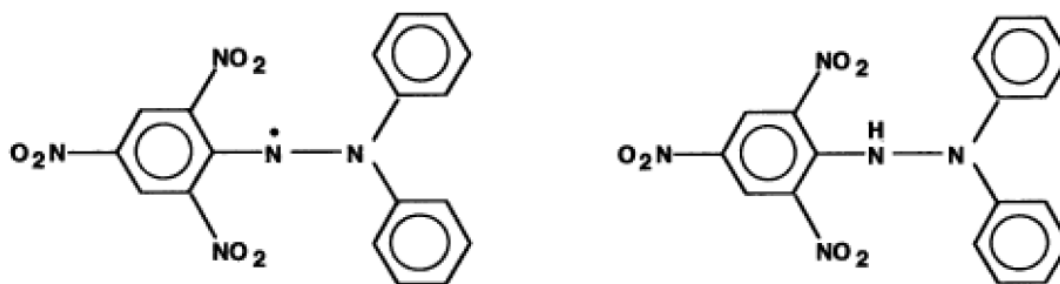
3.4.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση της ρίζας DPPH

Το μόριο του 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), χαρακτηρίζεται ως μία σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της δυνατότητας του ελεύθερου ηλεκτρονίου να μετακινείται στο μόριο, ούτως ώστε αυτό να μη διμερίζεται, πράγμα που συμβαίνει στις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Η μετακίνη του ηλεκτρονίου είναι ακόμα υπεύθυνη για την πρόσδοση στη ρίζα ενός βαθιού βιολετί χρώματος που χαρακτηρίζεται από μέγιστη απορρόφηση σε διάλυμα αιθανόλης στα 520 nm περίπου.

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με ένα διάλυμα μιας ουσίας η οποία μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε το DPPH μετατρέπεται στο υδρογονομένο παράγωγό του, χάνοντας το βιολετί του χρώμα. Αν συμβολιστεί με Z[•] το μόριο του DPPH και με AH το μόριο δότης, τότε η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



όπου το ZH είναι η παράγωγη μορφή και A[•] είναι η ελεύθερη ρίζα που παράγεται από αυτή την αντίδραση. Η ρίζα αυτή στη συνέχεια θα συμμετάσχει σε επιπλέον αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, δηλαδή τα μόρια DPPH που αποχρωματίζονται από 1 μόριο δότη H. Η αντίδραση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τις αντιδράσεις που συμβαίνουν σε ένα οξειδωτικό σύστημα. Η ρίζα του DPPH προσομοιάζει τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στο σύστημα και η δράση τους πρέπει να αντιμετωπιστεί από την ουσία AH, δηλαδή το αντιοξειδωτικό



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Εικόνα 3.4: Το μόριο του DPPH πριν και μετά την αντίδρασή του με το δότη H

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων ήταν αυτή των Brand-Williams et al. (1995). Για την παρασκευή διαλύματος DPPH, ζυγίστηκαν 2,5 mg DPPH και προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα, ακολούθησε προσθήκη ποσότητας μεθανόλης, έντονη

ανάδευση για την πλήρη διάλυση του DPPH στη μεθανόλη και τέλος προσθήκη επιπλέον μεθανόλης μέχρι τη χαραγή.

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, προστέθηκαν 3,9 ml από το διάλυμα DPPH και 100 μ L κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και ακολούθησε ανάδευση σε vortex. Στη συνέχεια, μετά από παραμονή σε σκοτεινό μέρος για 30 min, τα δείγματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης (Hitachi U29000) στα 515 nm. Πρώτα μηδενίστηκε η ένδειξη του φωτομέτρου χρησιμοποιώντας μεθανόλη και μετά μετρήθηκε το τυφλό διάλυμα το οποίο είχε παρασκευαστεί προσθέτοντας 100 μ L μεθανόλης σε 3,9 mL DPPH. Αυτό που μετρούνταν σε κάθε περίπτωση ήταν η διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος από το τυφλό δείγμα.

Η έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων έγινε σε ισοδύναμα trolox. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, ζυγίστηκαν 0,01 g 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL με μεθανόλη. Από αυτό το διάλυμα προστέθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL 1, 2, 3, 4 και 5 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν αντίστοιχα 40, 80, 120, 160 και 200 ppm. Οι μετρήσεις αυτών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο που αναφέρεται παραπάνω.

Στα εκχυλίσματα της Soxhlet, καθώς και στο αφέψημα της υδρο-ατμοαπόσταξης, η έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης έγινε, εκτός από ισοδύναμα trolox, και με χρήση της παραμέτρου EC_{50} . Η παράμετρος αυτή εκφράζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος η οποία οδηγεί στην αντίδραση του 50% της ποσότητας του DPPH.

Αρχικά κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για το DPPH. Ζυγίστηκαν 2,5 mg DPPH και αραιώθηκαν με μεθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια, λήφθηκαν 1, 3, 6 και 8 mL από το διάλυμα που παρασκευάστηκε και αραιώθηκαν με μεθανόλη σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, ώστε να προκύψουν διαλύματα 2,5 ppm, 7,5 ppm, 15 ppm και 20 ppm ενώ το αρχικό διάλυμα ήταν 25 ppm. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά μετρήθηκαν στο φωτόμετρο στα 515 nm μετά από την παραμονή τους σε σκοτεινό μέρος για 30 min και το μηδενισμό του φωτόμετρου με αιθανόλη.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν οι εξής αραιώσεις των εκχυλισμάτων:

- 15 mL εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα μέχρι τη χαραγή
- 3 mL εκχυλίσματος αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προσθήκη αιθανόλης μέχρι τη χαραγή

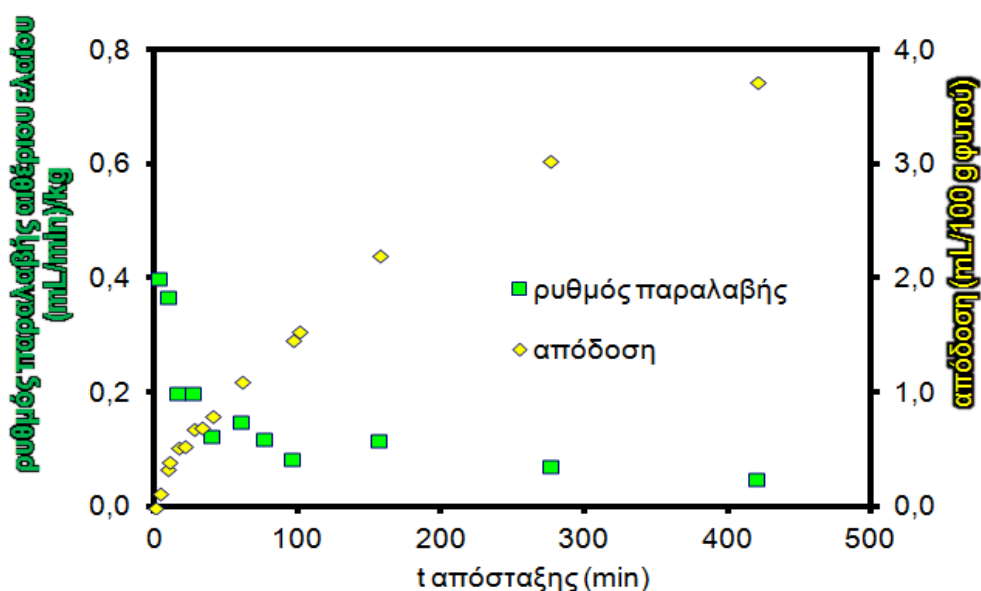
- 1 mL αφεψήματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προσθήκη νερού HPLC μέχρι τη χαραγή

Τα 3 αυτά διαλύματα αποτέλεσαν τα διαλύματα συγκέντρωσης C και σε καθένα από αυτά πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεων 0,1 C, 0,3 C και 0,7 C. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των παραπάνω δειγμάτων είναι η ίδια με αυτή που περιγράφεται για την μέτρηση των υπόλοιπων εκχυλισμάτων, με μοναδική διαφορά ότι ο χρόνος που αφέθηκαν σε σκοτεινό μέρος ήταν 3h.

4. Αποτελέσματα και σχολιασμός

4.1 Παραλαβή αιθέριου ελαίου

Κατά το πρώτο στάδιο των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε η παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τα αποξηραμένα φύλλα της ρίγανης με την τεχνική της υδροατμοαπόσταξης, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στο διάγραμμα 4.1, παρουσιάζεται ο ρυθμός παραλαβής του αιθέριου ελαίου συναρτήσει του χρόνου της υδροατμοαπόσταξης, καθώς και το ποσοστό του επί του ξηρού βάρους του φυτού που αποστάζεται.



Διάγραμμα 4.1: Ρυθμός παραλαβής αιθέριου ελαίου και απόδοση σε αιθέριο έλαιο συναρτήσει του χρόνου

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα η διεργασία παραλαβής του ελαίου ολοκληρώθηκε στα 420 min, καθώς ο ρυθμός παραλαβής αιθέριου ελαίου έχει σχεδόν μηδενιστεί. Συνολικά συλλέχθηκαν 18,6 mL αιθέριου ελαίου από τα 500 g φυτόμαζας που αποστάχθηκαν, συνεπώς η απόδοση του ανέρχεται στα 3,7 mL/ 100 g φυτού, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα. Μέχρι τα 120 min περίπου, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο αυξάνεται σχετικά γρήγορα, σχεδόν γραμμικά και έχει παραληφθεί το 50% του συνολικού αιθέριου ελαίου. Από τα 120 min και μέχρι το τέλος της εκχύλισης, ο ρυθμός αύξησης της απόδοσης του ελαίου αρχίζει να φθίνει, μέχρι που σχεδόν μηδενίζεται. Αυτό συμβαίνει κατά πάσα πιθανότητα, γιατί τα συστατικά που αποστάζονται στην αρχή είναι πιο πτητικά και συνεπώς ο ρυθμός παραλαβής τους

είναι μεγαλύτερος από των λιγότερο πτητικών συστατικών που αποστάζονται στη συνέχεια.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά την υδρο-ατμοαπόσταξη πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες αιθέριου ελαίου, το οποίο αναλύθηκε με τη μέθοδο GC-MS για τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών του. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζεται η τελική σύσταση του αιθέριου ελαίου. Για τον υπολογισμό του ποσοστού του κάθε συστατικού, διαιρέθηκε το εμβαδό της κορυφής του συστατικού με το συνολικό εμβαδό όλων των κορυφών που λήφθηκαν, πολλαπλασιασμένο με 100. Επειδή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε 2 φορές, παρατίθεται και η τυπική απόκλιση μεταξύ των 2 μετρήσεων. Συνολικά στο αιθέριο έλαιο ταυτοποιήθηκαν 19 συστατικά.

Πίνακας 4.4: Σύσταση του αιθέριου ελαίου του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum*

Συστατικό	Ποσοστό στο αιθέριο έλαιο (%)	sd(%)
α-θουγένιο	0,68	0,13
α-πινένιο	0,64	0,08
καμφένιο	0,19	0,05
β-πινένιο	0,28	0,03
β-μυρκένιο	0,69	0,01
I-φελλανδρένιο	0,12	0,00
α-τερπινένιο	1,57	0,10
π-κυμένιο	5,30	0,33
dI-λιμονένιο	0,34	0,09
γ-τερπινένιο	16,17	1,11
γιναλοόλη L	0,51	0,01
1-βορνεόλη	0,56	0,02
4-τερπινεόλη	0,26	0,02
ανισόλη	0,56	0,03
θυμόλη	0,50	0,00
καρβακρόλη	64,45	1,27
trans-καρνοφυλλένιο	6,69	0,52
α-χουμουλένιο	0,27	0,01
οξείδιο του καρνοφυλλενίου	0,21	0,01

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4.1, τα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου αποτελούν η καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο με ποσοστά 64,45% και 16,17%

αντίστοιχα, ενώ ακολουθούν σε περιεκτικότητα τα συστατικά trans-καρνοφυλλένιο, π-κυμένιο και α-τερπινένιο με αντίστοιχα ποσοστά 6,69%, 5,30% και 1,57%. Οι υπόλοιπες ουσίες είναι κάτω από 1% στο αιθέριο έλαιο η κάθε μια. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους Lagouri et al. (1993) και Sivrourouli et al. (1996), όσον αφορά την παρουσία της καρβακρόλης, του γ-τερπινενίου και του π-κυμενίου ως βασικά συστατικά του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum*. Αντίθετα, σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τους παραπάνω ερευνητές, έχει παρουσιαστεί το trans-καρνοφυλλένιο σε αρκετά μικρότερο η θυμόλη. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αιτιολογηθούν λόγω της διαφοράς των συνθηκών καλλιέργειας και του περιβάλλοντος στα οποία έχουν καλλιεργηθεί τα φυτά.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, λόγω της ενδιαφέρουσας δυνατότητας κλασμάτωσης των συστατικών που παρατηρήθηκε σε προηγούμενη μελέτη (Παρασκευοπούλου, 2015), πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση του αιθέριου ελαίου αλλάζοντας το συλλέκτη στον οποίο κατέληγε αυτό, με σκοπό την παραλαβή ενός κλάσματος πλούσιου σε καρβακρόλη. Η καρβακρόλη είναι μία ουσία η οποία προσδίδει κόκκινο χρώμα στο αιθέριο έλαιο, για αυτό η αλλαγή του συλλέκτη πραγματοποιήθηκε όταν το χρώμα του αιθέριου ελαίου από υποκίτρινο που ήταν ξεκίνησε να σκουραίνει. Έτσι λήφθηκαν 2 κλάσματα του αιθέριου ελαίου, ένα φτωχό και ένα πλούσιο σε καρβακρόλη. Η αλλαγή του συλλέκτη έγινε στα 60 min. Η σύσταση των δύο κλασμάτων του αιθέριου ελαίου, παρουσιάζεται στον πίνακα 4.2. Το πρώτο κλάσμα είναι το φτωχό και το δεύτερο το πλούσιο σε καρβακρόλη.

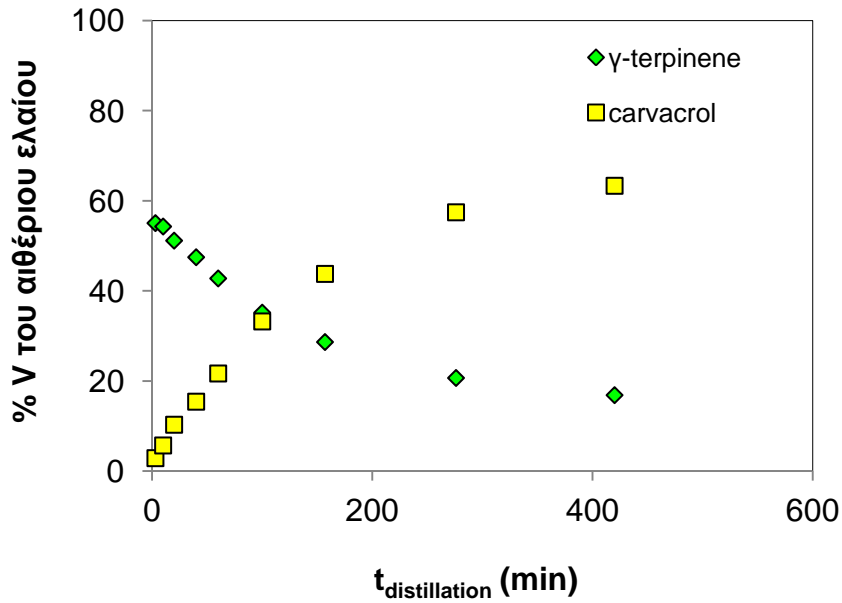
Πίνακας 4.2: Σύσταση των 2 κλασμάτων του αιθέριου ελαίου του φυτού *O. Vulgare ssp. hirtum*

Συστατικό	Ποσοστό στο		Ποσοστό στο	
	πρώτο κλάσμα (%)	sd(%)	δεύτερο κλάσμα (%)	sd(%)
α-θουγιένιο	2,05	0,13	0,11	0,01
α-πινένιο	1,95	0,08	0,09	0,01
καμφένιο	0,59	0,05	0,02	0,01
β-πινένιο	0,79	0,02	0,06	0,02
β-μυρκενίου	2,02	0,00	0,13	0,01
I-φελλανδρένιο	0,38	0,00	0,01	0,00
α-τερπινένιο	4,35	0,10	0,41	0,02
π-κυμένιο	13,23	0,33	1,98	0,06
dI-λιμονένιο	1,12	0,09	0,02	0,02
γ-τερπινένιο	42,85	1,10	4,97	0,07
γιναλοόλη L	0,82	0,01	0,38	0,01
1-βορνεόλη	0,46	0,00	0,61	0,02

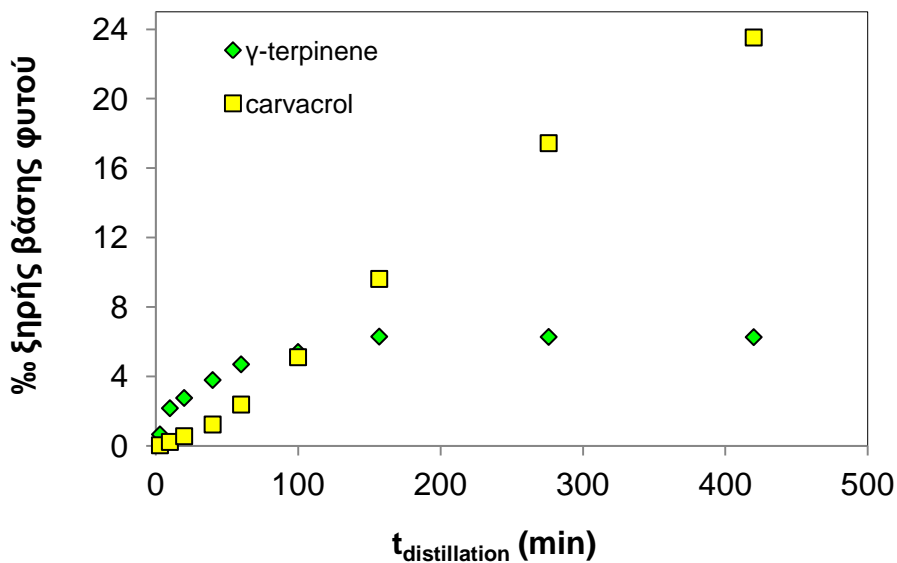
4-τερπινεόλη	0,20	0,02	0,29	0,00
ανισόλη	0,85	0,03	0,43	0,01
θυμόλη	0,19	0,00	0,63	0,00
καρβακρόλη	21,57	1,26	82,45	0,12
trans-καρνοφυλλένιο	6,36	0,51	6,83	0,11
α-χουμουλένιο	0,20	0,01	0,30	0,00
οξείδιο του καρνοφυλλενίου	0,01	0,00	0,29	0,01

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα, το κυριότερο συστατικό του πρώτου κλάσματος του αιθέριου ελαίου είναι το γ-τερπινένιο, που αποτελεί το 42,85% του συνολικού κλάσματος. Η καρβακρόλη αποτελεί το δεύτερο συστατικό σε περιεκτικότητα με ποσοστό 21,57%. Στο δεύτερο κλάσμα όμως η περιεκτικότητα της καρβακρόλης είναι πολύ υψηλή, καθώς αποτελεί το 82,45% του κλάσματος αυτού, ενώ το γ-τερπινένιο αποτελεί μόλις το 4,97%. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο μέγιστος ρυθμός παραλαβής του γ-τερπινενίου παρουσιάζεται προς την αρχή της εκχύλισης και φθίνει με το πέρασμα του χρόνου, ενώ προφανώς το αντίθετο συμβαίνει με την καρβακρόλη. Συγκρίνοντας τις τιμές του μεταξύ των δύο κλασμάτων, παρατηρείται ότι συμπεριφορά αντίστοιχη με το γ-τερπινένιο παρουσιάζει και το π-κυμένιο που είναι ένα άλλο βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου, αλλά και οι περισσότερες ουσίες εκτός από την 1-βορνεόλη, την 4-τερπινεόλη, τη θυμόλη, το α-χουμουλένιο και το οξείδιο του καρνοφυλλενίου. Το trans-καρνοφυλλένιο, παρουσιάζει παρόμοια περιεκτικότητα και στα 2 κλάσματα.

Με βάση τις αναλύσεις στα 9 δείγματα αιθέριου ελαίου που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της υδρο-ατμοαπόσταξης κατέστη δυνατή η παρακολούθηση της απόσταξης των επιμέρους συστατικών του αιθέριου ελαίου. Η εύρεση της περιεκτικότητας των επιμέρους συστατικών σε % ξηρής μάζας φυτού, πραγματοποιήθηκε πολλαπλασιάζοντας την περιεκτικότητα του κάθε συστατικού στο έλαιο και πραγματοποιώντας αναγωγή στα 100 g φυτού γνωρίζοντας την απόδοση σε αιθέριο έλαιο. Έτσι κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα 4.2 και 4.3, τα οποία αναφέρονται στα 2 βασικότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου, την καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο.



Διάγραμμα 4.2: Περικτικότητα του γ-τερπινενίου και της καρβακρόλης στο αιθέριο έλαιο συναρτήσει του χρόνου απόσταξης

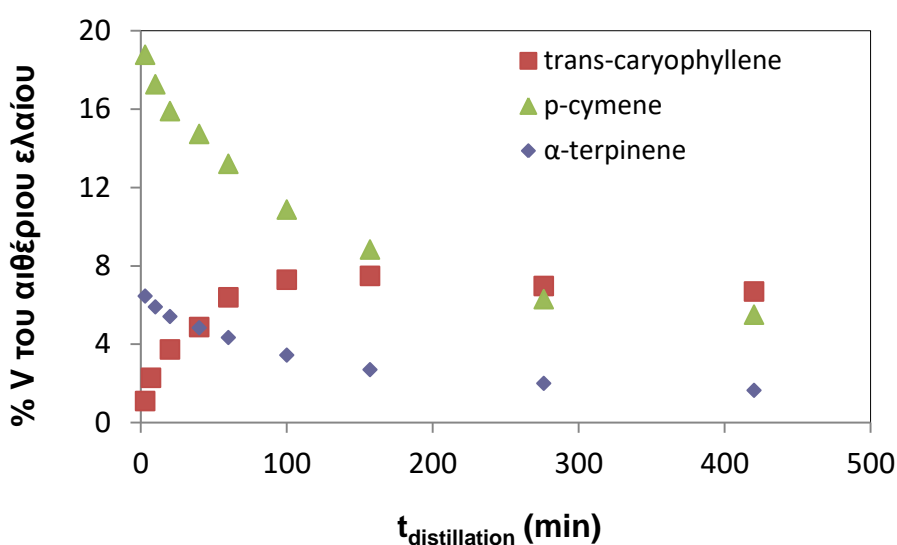


Διάγραμμα 4.3: Ποσότητα γ-τερπινενίου και καρβακρόλης επί ξηρής μάζας φυτού συναρτήσει του χρόνου απόσταξης

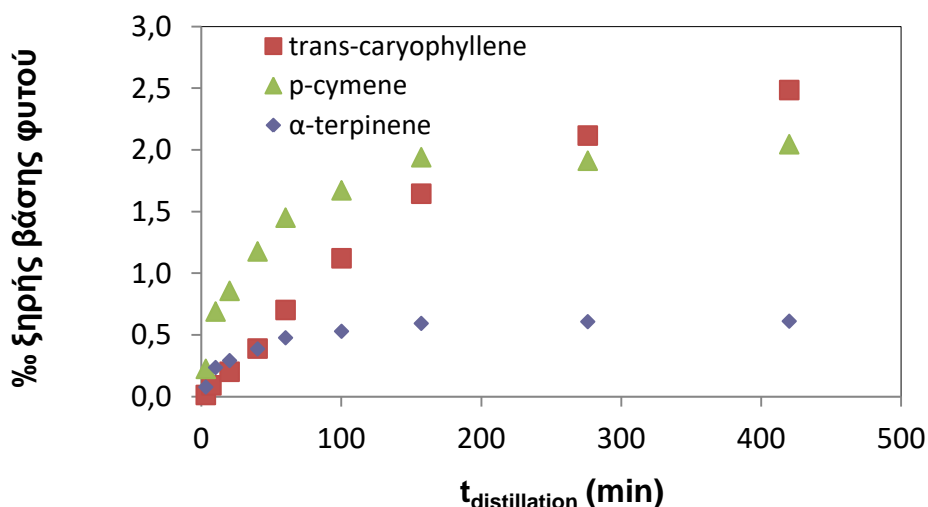
Πράγματι όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα, επιβεβαιώνεται η συμπεριφορά της καρβακρόλης και του γ-τερπινενίου που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η καρβακρόλη αποστάζει με μικρό ρυθμό στην αρχή όπως υποδεικνύει η κλίση του διαγράμματος 4.3 και ως αποτέλεσμα παρουσιάζει μικρή περιεκτικότητα στο αιθέριο έλαιο. Με το πέρας του χρόνου, ο ρυθμός με τον οποίο αποστάζει αυξάνεται, καθώς αυξάνεται η κλίση του ίδιου διαγράμματος, εξ ου και η

αύξηση της περιεκτικότητάς της στο αιθέριο έλαιο. Το αντίστροφο συμβαίνει με το γ-τερπινένιο. Στην αρχή της απόσταξης βρίσκεται σε μεγάλη περιεκτικότητα στο αιθέριο έλαιο και στη συνέχεια αραιώνεται σε αυτό, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.2. Από το διάγραμμα 4.3 φαίνεται ότι η κλίση στην αρχή είναι μεγάλη και μειώνεται στη συνέχεια, γεγονός που μαρτυρά την μείωση του ρυθμού με τον οποίο αποστάζεται. Από τα 170 min περίπου και έπειτα, όπως φαίνεται από το ίδιο διάγραμμα, η απόσταξη του γ-τερπινενίου έχει τερματιστεί.

Τα διαγράμματα 4.4 και 4.5 που ακολουθούν, αφορούν τις άλλες 3 βασικές ουσίες του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και πιο συγκεκριμένα το trans-καρυοφυλλένιο, το π-κυμένιο και το α-τερπινένιο.



Διάγραμμα 4.4: Περιεκτικότητα trans-καρυοφυλλενίου, π-κυμενίου και α-τερπινενίου στο αιθέριο έλαιο συναρτήσει του χρόνου απόσταξης

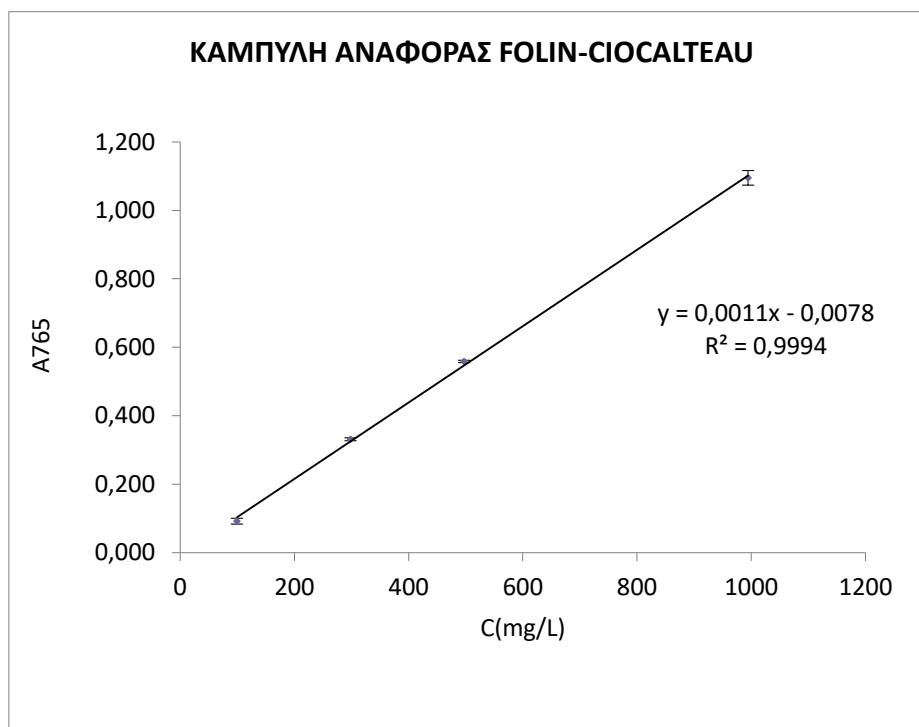


Διάγραμμα 4.5: Ποσότητα γ-τερπινενίου και καρβακρόλης επί ξηρής μάζας φυτού συναρτήσει του χρόνου απόσταξης

Η εικόνα που παρουσιάζουν το π-κυμένιο και το α-τερπινένιο και στα 2 παραπάνω διαγράμματα είναι κοινή. Η περιεκτικότητά τους στο αιθέριο έλαιο μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς αυτές οι ουσίες αποστάζονται με μεγαλύτερο ρυθμό στην αρχή όπως φαίνεται και από τις αντίστοιχες κλίσεις στο διάγραμμα 4.5. Το π-κυμένιο σταματάει να αποστάζει στα 170 min περίπου και το α-τερπινένιο περίπου στα 100 min. Αντίθετα, το trans-καρνοφυλλένιο ξεκινάει από πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο αιθέριο έλαιο, η οποία αυξάνεται στη συνέχεια. Από το διάγραμμα 4.5 φαίνεται ότι στο ξεκίνημα της διεργασίας, ο ρυθμός ανάκτησής του είναι χαμηλός, γεγονός που υποδεικνύεται από τη μικρή κλίση της καμπύλης, αλλά αυξάνεται από τα 30 min μέχρι περίπου τα 170 min, για να φθίνει και πάλι. Αυτή η πορεία του ρυθμού ανάκτησης του trans-καρνοφυλλενίου, μπορεί να εξηγήσει την παραπλήσια περιεκτικότητά του στα 2 κλάσματα του αιθέριου ελαίου.

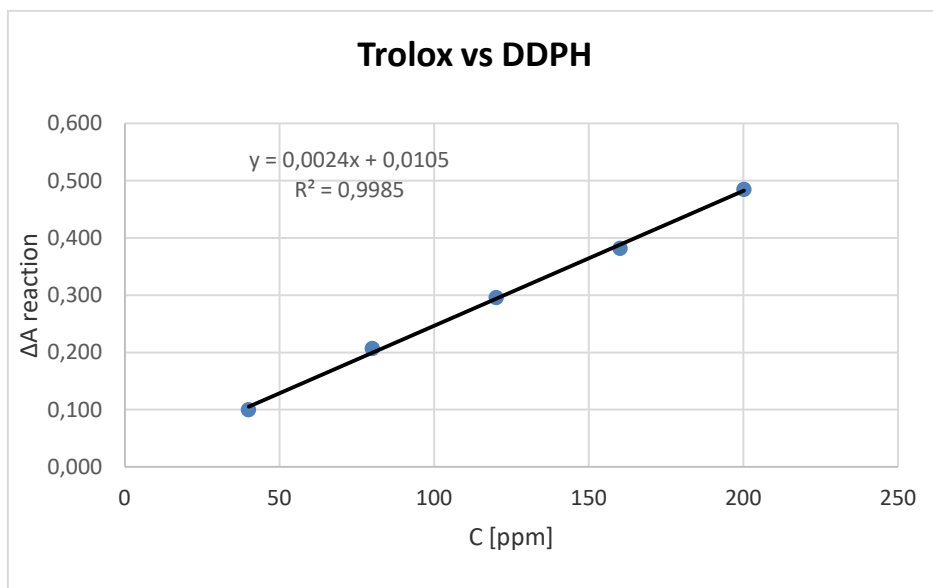
4.2 Καμπύλες αναφοράς

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι καμπύλες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα στο διάγραμμα 4.6, παρουσιάζεται η απορρόφηση του γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η συγκεκριμένη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.



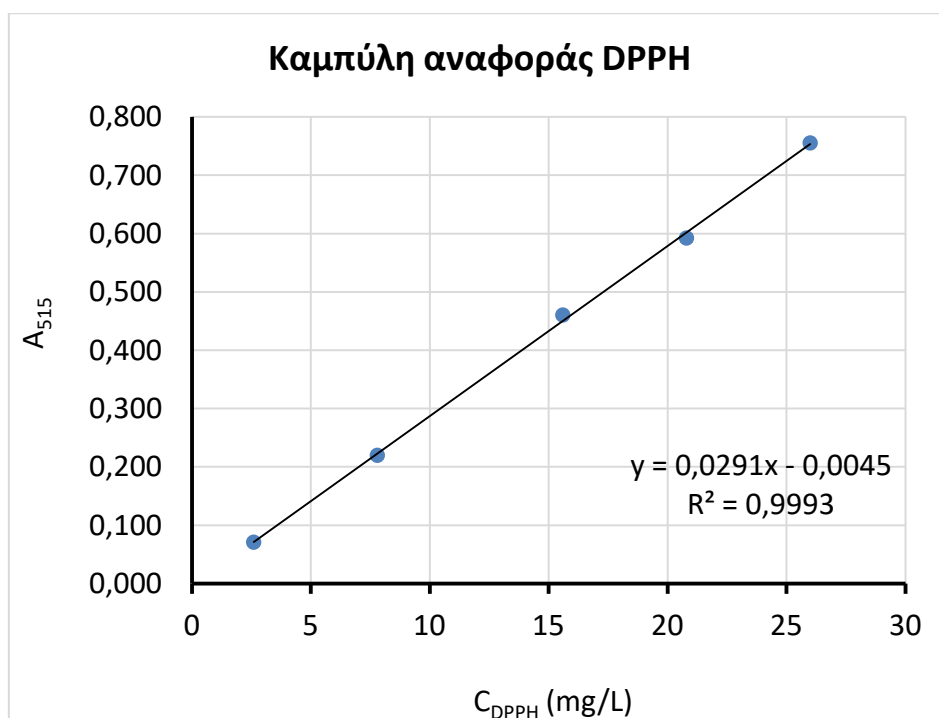
Διάγραμμα 4.6: Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Folin-Ciocalteu. Απορρόφηση στα 765 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος

Στο διάγραμμα 4.7, παρουσιάζεται η διαφορά απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων trolox σε μεθανόλη που έχουν μετρηθεί με τη μέθοδο DPPH, από το τυφλό διάλυμα DPPH. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ουσιών που παρουσιάζουν ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH.



Διάγραμμα 4.7: Καμπύλη αναφοράς trolox. Διάγραμμα διαφοράς απορρόφησης από το τυφλό στα 515 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης trolox

Τέλος, στο διάγραμμα 4.8, παρουσιάζεται η απορρόφηση στα 515 nm πρότυπων διαλυμάτων DPPH σε μεθανόλη. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό της παραμέτρου EC_{50} .



Διάγραμμα 4.8: Καμπύλη αναφοράς DPPH. Διάγραμμα απορρόφησης στα 515 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης DPPH

4.3 Αποτελέσματα εκχυλίσεων Soxhlet

4.3.1 Αποδόσεις εκχυλίσεων

Όπως έχει αναφερθεί, μετά από την υδρο-ατμοαπόσταξη για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου, η απειλαιωμένη ρίγανη, αφού πρώτα ξηράνθηκε, εκχυλίστηκε σε συσκευή Soxhlet διαδοχικά, πρώτα με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του άπολου κλάσματος των στερεών της και στη συνέχεια με αιθανόλη για την παραλαβή του πολικού κλάσματος. Στα εκχυλίσματα της Soxhlet, καθώς και στο αφέψημα (W_s) της υδρο-ατμοαπόσταξης, δηλαδή στο νερό που παραλήφθηκε μετά το τέλος της διεργασίας μέσα από το καζάνι, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις Folin-Ciocalteu, DPPH, καθώς και προσδιορισμός των στερεών υπολειμμάτων για την εύρεση της απόδοσης της κάθε διεργασίας. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν σε κάθε εκχύλισμα και αναλύσεις HPLC για τον προσδιορισμό της σύστασης του εκάστοτε εκχυλίσματος.

Στις αναλύσεις Folin-Ciocalteu, οι αποδόσεις σε ολικά φαινολικά εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Από τον προσδιορισμό των στερεών υπολειμμάτων, υπολογίστηκε η απόδοση της κάθε διεργασίας σε ολικά στερεά, εκφρασμένη σε % ξηρού φυτού. Στις αναλύσεις DPPH, εκφράστηκαν τα αποτελέσματα σε ισοδύναμα trolox (TE) και έγινε προσδιορισμός της παραμέτρου EC_{50} . Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παράμετρος αυτή εκφράζει την συγκέντρωση υποστρώματος που χρειάζεται για να αντιδράσει κατά 50% το DPPH. Να σημειωθεί εδώ ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτής της παραμέτρου, τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Για την εύρεσή της, έγινε γραφική παράσταση της % περιεκτικότητας του DPPH που δεν έχει αντιδράσει με το αντιοξειδωτικό συναρτήσει της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε g ξηρού εκχυλίσματος/ kg DPPH. Η ποσότητα % του DPPH που απομένει βρίσκεται από τον τύπο:

$$\% \text{rem.DPPH} = 100 \cdot \left(1 - \frac{A_{ref} - A_s}{A_{100\%}} \right)$$

όπου A_{ref} είναι η A_{515} του τυφλού διαλύματος DPPH η οποία μετριέται σε 3 h, A_s είναι η A_{515} του DPPH μετά την αντίδραση με ένα εκχύλισμα σε 3 h και $A_{100\%}$ η θεωρητική A_{515} διαλύματος DPPH 25 ppm σε μεθανόλη, όπως καθορίζεται από την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 4.3: Αποδόσεις εκχυλίσεων Soxhlet και στοιχεία υδατικού αφεψήματος

Εκχύλισμα	Απόδοση σε ολικά στερεά (%)	Ολικά φαινολικά GAE (g/ kg ξ.β. φυτού)	Ισοδύναμα trolox TE (g/ kg ξ.β. φυτού)	EC ₅₀ (g/ kg DPPH)
EtOH	9,60±0,04	29,47±0,64	37,27±1,32	271
EAC	8,03±0,19	10,20±0,70	6,43±0,29	1400
W _s	13,29±0,17	27,95±0,86	-	280

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.2, η συνολική απόδοση των εκχυλίσεων Soxhlet σε στερεά ξεπέρασε το 17% και μαζί με τα στερεά που εκχυλίστηκαν στο υδατικό αφέψημα έφτασαν στο 31% του ξηρού βάρους του φυτού. Παρά το γεγονός ότι οι αποδόσεις σε ολικά στερεά των εκχυλισμάτων αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα δε διαφέρουν σημαντικά, παρατηρείται ότι το εκχύλισμα της αιθανόλης έχει περίπου την τριπλάσια περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και 5 περίπου φορές μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αιθανόλη είναι πιο εκλεκτικός διαλύτης για την παραλαβή τόσο φαινολικών συστατικών, όσο και συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά το υδατικό αφέψημα, παρά το γεγονός ότι εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε στερεά από την αιθανόλη, παρουσιάζει λίγο χαμηλότερη απόδοση από αυτή όσον αφορά τις ολικές φαινόλες και την αντιοξειδωτική δράση.

4.3.2 Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και αιθανόλης που λήφθηκαν με την εκχύλιση Soxhlet, καθώς και το υδατικό αφέψημα, αναλύθηκαν με τη μέθοδο HPLC. Στον πίνακα 4.4, παρατίθενται τα αποτελέσματα των αναλύσεων και οι ποσοτικοποιήσεις των επιμέρους συστατικών. Για τις ποσοτικοποιήσεις, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπες ουσίες. Για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης και για τα ολικά φαινολικά οξέα, η καμπύλη αναφοράς του ροσμαρινικού οξέος. Η ποσότητα της κάθε ουσίας εκφράστηκε σε mg ουσίας / kg ξηρού φυτού.

Πίνακας 4.4: Σύσταση εκχυλισμάτων Soxhlet και υδατικού αφεψήματος εκφρασμένα σε mg ουσίας / kg ξηρού φυτού

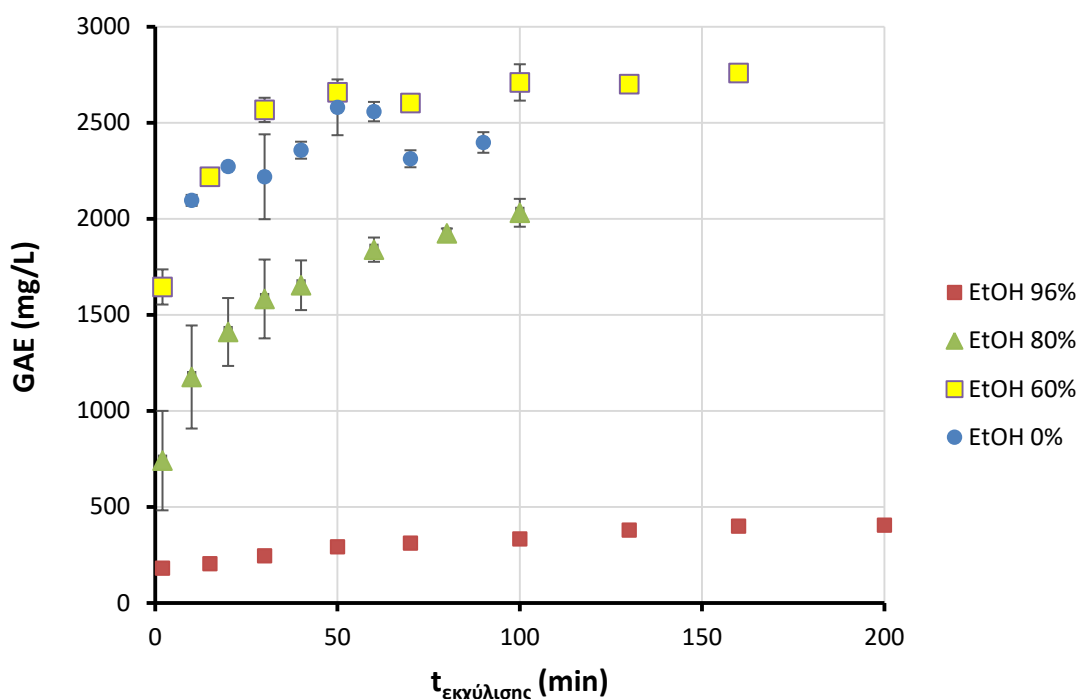
Εκχύλισμα/Ουσία	EAC	EtOH	W_s
Φλαβονοειδή	1883±12	3219±226	4811±204
Εριοδικτυόλη	169±7	-	66±19
Ολικά φαινολικά οξέα	919±17	9765±305	8525±13
Ροσμαρινικό οξύ	919±17	7740±186	4892±13
Σαλβιανολικά οξέα	-	1083±17	2491±51
Καφεϊκό οξύ	-	-	196±10
Καρβακρόλη	7151±12	-	-

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.4, στα εκχυλίσματα Soxhlet της απειλαιωμένης φυτόμαζας, βασικό συστατικό είναι το ροσμαρινικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό δεν προκαλεί εντύπωση, καθώς είναι σύμφωνο με πολλά ερευνητικά αποτελέσματα (Bimbilas et al., 2016; Tsimogiannis et al., 2016; Zgorka and Glowniak, 2001; Παρασκευοπούλου, 2015; Σταυρακάκη, 2004) που υποδεικνύουν ότι είναι κυρίαρχο συστατικό αρκετών φυτών της οικογένειας Lamiaceae. Η ύπαρξη καρβακρόλης στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, υποδηλώνει ότι απέμεινε ένα ποσοστό της στο φυτό και δεν παραλήφθηκε όλη στο αιθέριο έλαιο. Επιπλέον, η ύπαρξη φλαβονοειδών συμφωνεί με την έρευνα των Koukoulitsa et al. (2006), καθώς προσδιόρισαν 8 φλαβονοειδή στο φυτό *O. Vulgare* ssp. *hirtum* και με των Bimpilas et al. (2016) που προσδιόρισαν φλαβονοειδή και γλυκοζίτες τους σε αιθανολικό εκχύλισμα του ίδιου φυτού. Επιπλέον, οι Tsimogiannis et al. (2006) περοσδιόρισαν διάφορα φλαβονοειδή και γλυκοζίτες τους, μεταξύ των οποίων και εριοδικτυόλη, στα εκχυλίσματα κρητικής ρίγανης. Τέλος να σημειωθεί ότι από την ανάλυση HPLC, επιβεβαιώνονται οι χαμηλές EC₅₀ του αιθανολικού εκχυλίσματος και του υδατικού αφεψήματος, καθώς έχουν υψηλές αποδόσεις σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, ουσίες που ως γνωστόν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση.

4.4 Εκχυλίσεις διαλείποντος έργου με αιθανολικά διαλύματα

4.4.1 Αποδόσεις σε ολικά φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική δράση

Κατά την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων διαλείποντος έργου με αιθανολικά διαλύματα, εξετάστηκε αρχικά η επίδραση της περιεκτικότητας της αιθανόλης σε μίγματα με το νερό, ως προς την απόδοση σε ολικές φαινόλες και την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και ισοδύναμα trolox αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.9: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την εκχύλιση διαλείποντος έργου με διάφορες περιεκτικότητες αιθανολικών διαλυμάτων στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

Με βάση το διάγραμμα 4.9, παρατηρείται ότι στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και για αναλογία στερεού-υγρού 1:20, το διάλυμα περιεκτικότητας 60% σε αιθανόλη, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολών. Το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τους De Leonardis et al. (2005), που χρησιμοποίησαν μίγμα αιθανόλης με νερό περιεκτικότητας 60% για την παραλαβή των φαινολών από φλοιούς σπόρων ηλίανθου. Ακόμη η τιμή αυτή είναι κοντινή με την περιεκτικότητα αιθανόλης που ανέκτησε το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο από φλούδες εσπεριδοειδών στη μελέτη των Li et al. (2006), που κυμαινόταν από 72%-85%. Τέλος συμφωνεί και με τη μελέτη των Stoica et al. (2013), που με μίγμα αιθανόλης-νερού περιεκτικότητας 70%, παρατήρησαν την καλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά

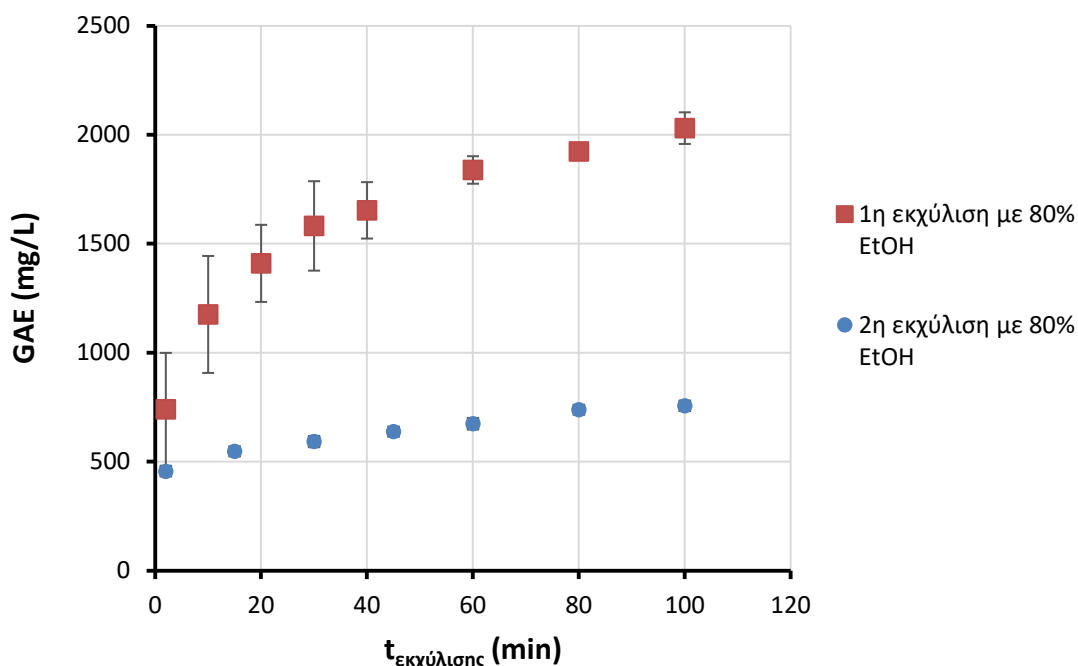
από μαύρη σταφίδα. Οι μικρές διαφορές μπορεί πιθανότατα να αποδοθούν στις διαφορές της σύστασης της πρώτης ύλης.

Πίνακας 4.4: Αποδόσεις, ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με διαφορετικές περιεκτικότητες αιθανόλης στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20

Διάλυμα	Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	Ισοδύναμα trolox TE (g/kg ξηρού φυτού)	Απόδοση σε ολικά στερεά (%)
EtOH 0%	48,69±1,07	86,88±7.66	20,88±1,33
EtOH 60%	54,00±0,63	91,46±1,77	19,36±0,14
EtOH 80%	41,63±1,45	66,00±1,65	14,88±0,06
EtOH 96%	7,98±0,13	7,83±0,82	6,04±0,05

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.4, αυξημένη απόδοση σε φαινολικά συστατικά συνεπάγεται και αυξημένη αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που είναι λογικό καθώς οι φαινόλες είναι ουσίες που έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συγκρίνοντας τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες και ουσίες με ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών με τις αντίστοιχες αποδόσεις της Soxhlet που ήταν 39,67 g GAE/kg ξηρού βάρους φυτού και 43,7 g TE/kg ξηρού φυτού, παρατηρείται ότι τα αιθανολικά διαλύματα περιεκτικότητας 0 και 60% σε αιθανόλη, παρουσιάζουν μεγαλύτερες αποδόσεις ακολουθούμενα από το 80%. Αυτό υποδεικνύει πως το νερό, βοηθά σημαντικά στην ανάκτηση αυτών των ουσιών. Είναι βέβαια πιθανό οι εκχυλίσεις Soxhlet ή να μην ολοκληρώθηκαν, ή να απαιτούνταν εκχύλιση και με κάποιον άλλο διαλύτη για την παραλαβή του συνόλου αυτών των ουσιών. Παρ' όλα αυτά, ενώ η εκχύλιση Soxhlet διήρκεσαν συνολικά 13h, με χρήση αιθανολικών διαλυμάτων, επιτεύχθηκαν υψηλότερες αποδόσεις σε χρόνους 50 min (απαραίτητος χρόνος για την ολοκλήρωση της εκχύλισης στα διαλύματα 0 και 60% σε αιθανόλη όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4.9) και 100 min (απαραίτητος χρόνος για την ολοκλήρωση της εκχύλισης στο διάλυμα 80% σε αιθανόλη όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4.9).

Στο πείραμα με το διάλυμα περιεκτικότητας 80% σε αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη διαδοχική εκχύλιση της ρίγανης που συλλέχθηκε, χρησιμοποιώντας την ίδια αναλογία στερεού-υγρού.

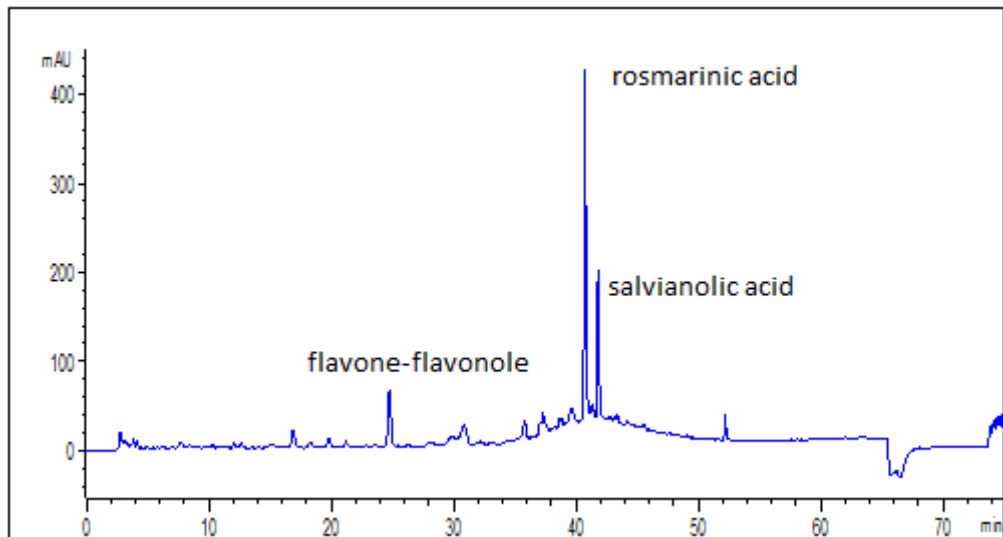


Διάγραμμα 4.10: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για τις δύο διαδοχικές εκχύλισεις διαλείποντος έργου με διάλυμα 80% αιθανόλης στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρό 1:20.

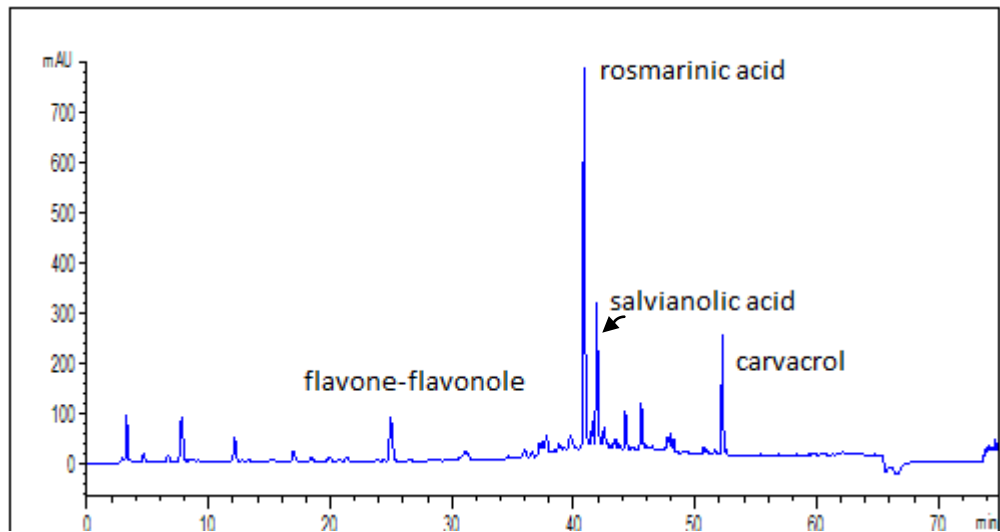
Από το διάγραμμα 4.10, φαίνεται πως η δεύτερη εκχύλιση ολοκληρώνεται σε 80 min περίπου. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολών στο διάλυμα της δεύτερης, είναι το 37,24% των ολικών φαινολών του διαλύματος της πρώτης εκχύλισης, γεγονός που υποδηλώνει πως σημαντικό ποσοστό φαινολών από την πρώτη εκχύλιση παρέμεινε εγκλωβισμένο στο υλικό. Η απόδοση της δεύτερης εκχύλισης σε ολικά φαινολικά και ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, ήταν 15,12 g GAE/kg ξηρού φυτού και 25,67 g TE/kg ξηρού φυτού αντίστοιχα. Σε συνδυασμό δηλαδή με την πρώτη εκχύλιση έφτασαν τα 56,75 g GAE/kg ξηρού βάρους φυτού και τα 93,58 g TE/kg ξηρού βάρους φυτού, αντίστοιχες αποδόσεις δηλαδή με την εκχύλιση με 60% αιθανόλη.

4.4.2 Αναλύσεις των εκχυλισμάτων με HPLC

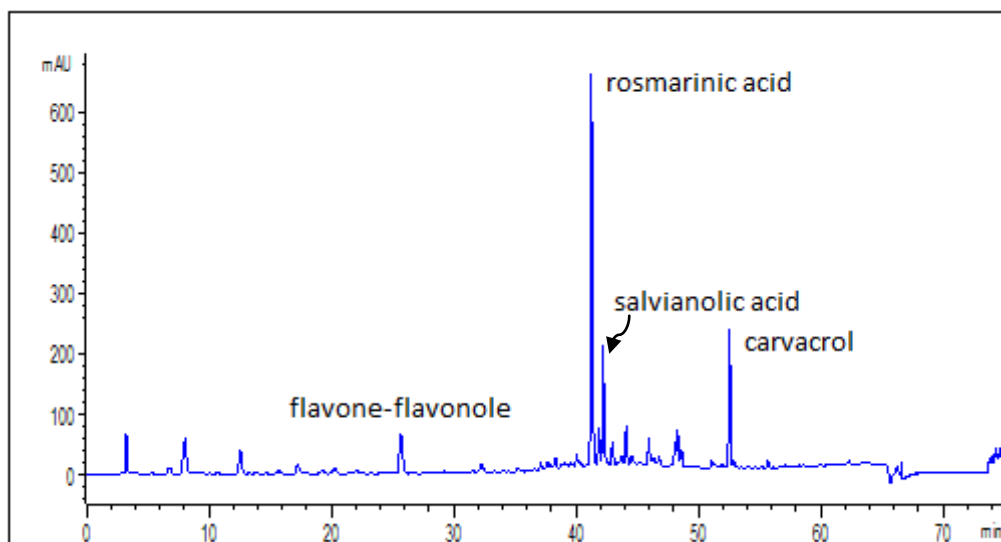
Τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν από τη χρήση αιθανολικών μιγμάτων σε διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για να ταυτοποιηθούν τα επιμέρους συστατικά τους, αλλά και να γίνουν οι ποσοτικοποιήσεις τους με βάση τις ήδη υπάρχουσες καμπύλες αναφοράς. Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν.



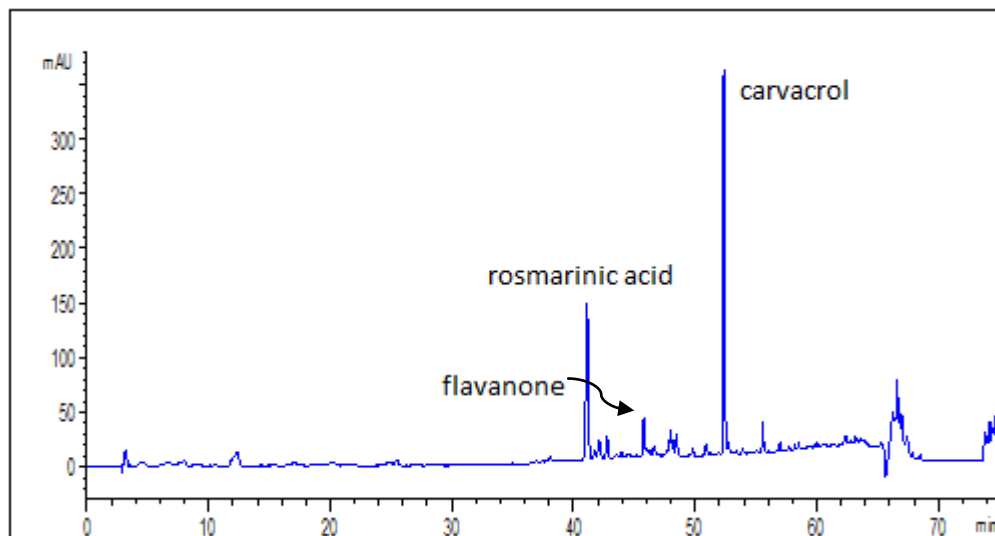
Εικόνα 4.8: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος



Εικόνα 4.9: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος 60% περιεκτικότητας σε αιθανόλη



Εικόνα 4.10: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος 80% περιεκτικότητας σε αιθανόλη



Εικόνα 11.4: Χρωματογράφημα εκχύλισματος 96% περιεκτικότητας σε αιθανόλη

Όπως παρατηρείται από τα χρωματογραφήματα στις εικόνες 4.1-4.3, στα εκχυλίσματα περιεκτικότητας 0, 60 και 80% σε αιθανόλη, κυρίαρχο συστατικό είναι το ροσμαρινικό οξύ που εκλύεται στα 41 min περίπου. Οι άλλες δύο σημαντικές κορυφές που φαίνονται, ανήκουν σε ένα σαλβιανολικό οξύ που εκλύεται στα 42 min περίπου και σε μία φλαβόνη ή φλαβονόλη που εκλύεται περίπου στα 25 min. Ακόμη, παρατηρείται πως με αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης, εμφανίζεται και μία κορυφή στα 52 min περίπου που ανήκει στην καρβακρόλη. Από το χρωματογράφημα της εικόνας 4.4 που ανήκει στο εκχύλισμα με περιεκτικότητα 96% σε αιθανόλη, φαίνεται πως κυρίαρχη ουσία είναι η καρβακρόλη και ακολουθεί το ροσμαρινικό οξύ. Επίσης εμφανίζεται μία φλαβανόνη στα 46 min που δεν είναι εμφανής στα άλλα χρωματογραφήματα, ενώ απουσιάζει το φλαβονοειδές που παρουσιαζόταν στα άλλα χρωματογραφήματα. Τέλος, το σαλβιανολικό οξύ που παρουσιαζόταν στα άλλα χρωματογραφήματα, φαίνεται πως υπάρχει και στο αιθανολικό διάλυμα, αλλά σε πολύ μικρότερη περιεκτικότητα.

Πίνακας 4.5: Απόδοση των αιθανολικών εκχυλισμάτων εκφρασμένη σε mg ουσίας / kg ξηρού φυτού

Ουσία	Περιεκτικότητα εκχύλισματος σε EtOH (%)			
	0	60	80	96
Φλαβονοειδή	5511±437	7448±68	2972±30	950±23
Εριοδικτυόλη	239±1	208±19	227±13	82±6
Ολικά φαινολικά οξέα	7870±657	15766±443	13107±325	1597±44
Ροσμαρινικό οξύ	5474±457	10050±245	8350±126	1169±43
Σαλβιανολικά οξέα	2212±216	4639±147	3015±191	124-15
Καφεϊκό οξύ	177±19	183±14	190±9	-
Καρβακρόλη	667±102	5453±38	5477±63	4242±49

Παρατηρώντας τον πίνακα 4.5, μπορεί να δικαιολογηθεί η μεγαλύτερη απόδοση του εκχυλίσματος περιεκτικότητας 60%, τόσο ως προς τις ολικές φαινόλες όσο και ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, καθώς έχει μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος, το οποίο όπως είναι γνωστό έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αλλά και φλαβονοειδών, ουσιών δηλαδή με επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η σχεδόν διπλάσια περιεκτικότητα του υδατικού εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή έναντι του εκχυλίσματος με 80% αιθανόλη, μπορεί εν μέρει να δικαιολογήσει τις μεγαλύτερες αποδόσεις του από αυτό σε ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτική δράση. Είναι πιθανό όμως οι ιδιότητές του αυτές να οφείλονται και σε ουσίες που δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Όσον αφορά το εκχύλισμα αιθανόλης 96%, η χαμηλή του περιεκτικότητα τόσο σε φαινολικά οξέα γενικά, όσο και σε ροσμαρινικό οξύ, δικαιολογούν απόλυτα την μειωμένη αντιοξειδωτική του δράση έναντι των υπολοίπων εκχυλισμάτων.

4.4.3 Επίδραση της αναλογίας υγρού-στερεού

Ένας επιπλέον παράγοντας που εξετάστηκε ως προς την επίδρασή του στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τη ρίγανη, ήταν η αναλογία στερεού-υγρού. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε καθαρό νερό. Όπως προέκυψε από την προηγούμενη σειρά πειραμάτων, η απόδοση του διαλύματος περιεκτικότητας 60% σε αιθανόλη ήταν υψηλότερη κατά 9,5% όσον αφορά τις ολικές φαινόλες, παρ'όλα αυτά, κρίνοντας σκόπιμη τη μείωση χρήσης οργανικών διαλυτών, επιλέχθηκε το καθαρό νερό. Λόγω της διόγκωσης του φυτού με το νερό, γεγονός που καθιστούσε δύσκολη τη δειγματοληψία, ήταν δύσκολο να εξεταστεί κάποια υψηλότερη αναλογία στερεού-υγρού από το 1:20. Συνεπώς εξετάστηκε μικρότερη αναλογία στερεού-υγρού και συγκεκριμένα η αναλογία 1:40.

Πίνακας 4.6: Ολική απόδοση σε στερεά και απόδοση σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων σε διαφορετικές αναλογίες στερεού-υγρού

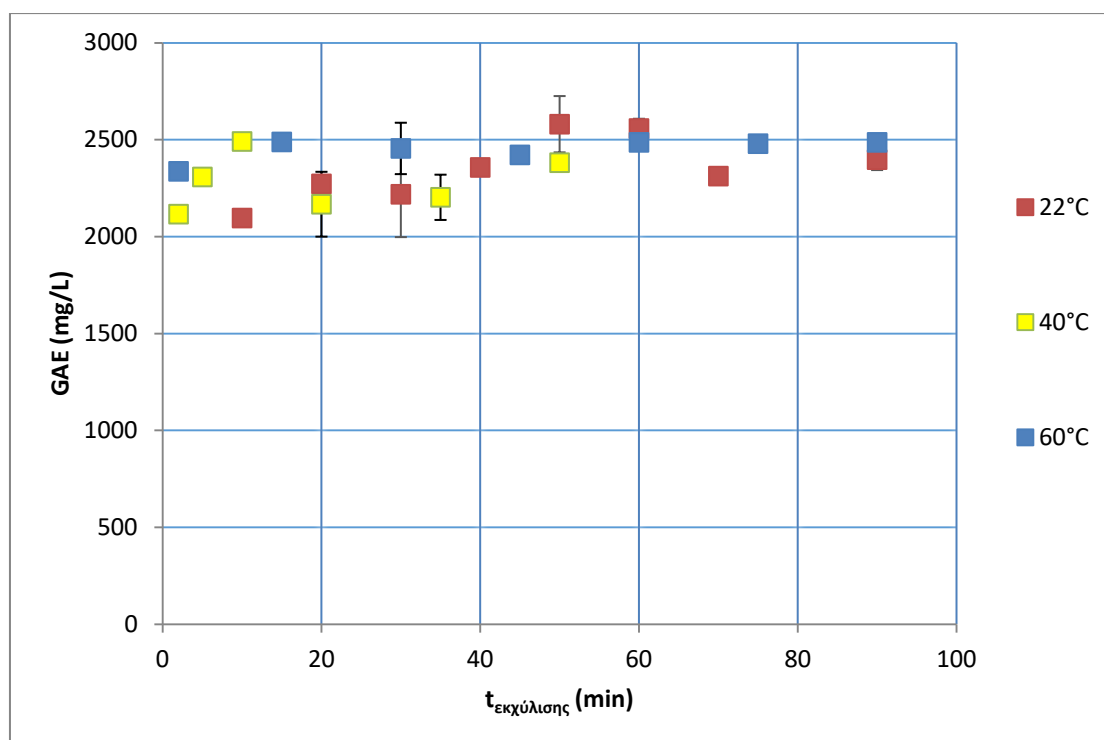
Αναλογία στερεού-υγρού	1:20	1:40
Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	48,67±1,07	48,27±1,72
Ισοδύναμα trolox TE(g/kg ξηρού φυτού)	86,88±7,66	82,67±0,47
Απόδοση σε ολικά στερεά (%)	20,88±1,33	23,48±1,07

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.6, η απόδοση του εκχυλίσματος με αναλογία στερεού-υγρού 1:20 σε ουσίες με αντιοξειδωτική δράση είναι παρόμοια με εκείνη του εκχυλίσματος με αναλογία στερεού-υγρού 1:40, παρά το γεγονός ότι το δεύτερο εκχύλισμα έχει υψηλότερη απόδοση σε ολικά στερεά. Η απόδοση σε ολικές φαινόλες

είναι αντίστοιχη και στα δύο εκχυλίσματα. Συνεπώς, καλύτερη αναλογία στερεού-υγρού, κρίνεται η αναλογία 1:20, καθώς είναι επιθυμητή η παραλαβή όσο το δυνατόν πυκνότερων εκχυλισμάτων, για λόγους οικονομίας διαλυτών. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Dong et al. (2010), που μελέτησαν την εκχύλιση ριζών κόκκινης φασκομηλιάς ως προς την απόδοση σε σαλβιανολικό οξύ B και βρήκαν ως βέλτιστη αναλογία στερεού-υγρού την αναλογία 1:20.

4.4.4 Επίδραση της θερμοκρασίας

Ακόμη ένας παράγοντας που εξετάστηκε ως προς την επίδρασή του στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τη ρίγανη, ήταν η θερμοκρασία. Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, ως διαλύτης για την εκχύλιση επιλέχθηκε το καθαρό νερό. Οι επιπλέον θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν οι 40 και οι 60°C. Επιπλέον, η επίδραση της θερμοκρασίας εξετάστηκε και στο διάλυμα το οποίο είχε την μικρότερη απόδοση και χρειάστηκε τον περισσότερο χρόνο για να ολοκληρώσει την εκχύλιση, δηλαδή στο διάλυμα περιεκτικότητας 96% σε αιθανόλη. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν και πάλι οι 40 και οι 60°C.



Διάγραμμα 4.11: Ισοδύναμο γαλλικού οξέος συναρτήσεως του χρόνου σε καθαρό νερό για τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

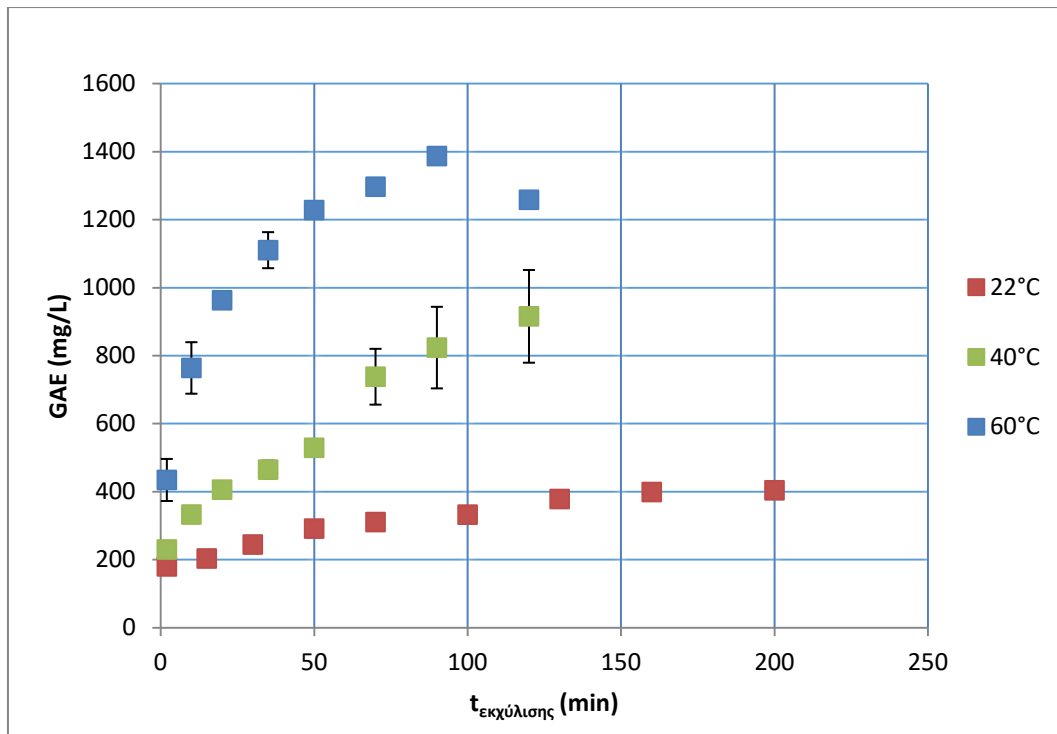
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.11 που αφορά τα πειράματα με καθαρό νερό ως διαλύτη, δεν παρατηρούνται διαφορές στις τελικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, αλλά υπάρχει διαφοροποίηση ως προς το χρόνο στον οποίο ολοκληρώνεται η

εκχύλιση. Ο χρόνος αυτός μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος αυτός είναι 50 min περίπου στους 22°C, 10 min περίπου στους 40°C και λιγότερο από 10 min στους 60°C. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η θερμότητα καθιστά τα κυτταρικά τοιχώματα διαπερατά, αυξάνει το συντελεστή διάχυσης των επιθυμητών προς εκχύλιση συστατικών και μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, καθιστώντας τον ικανό να διεισδύσει ευκολότερα στο στερεό υπόστρωμα και να παραλάβει τις εκχυλιζόμενες ουσίες. Έτσι η εκχύλιση πραγματοποιείται γρηγορότερα.

Πίνακας 4.7: Ολική απόδοση σε στερεά και απόδοση σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Θερμοκρασία (°C)	22	40	60
Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	48,67±1,07	47,62±3,16	49,71±0,00
Ισοδύναμα trolox TE(g/kg ξηρού φυτού)	86,88±7,66	98,50±0,94	96,83±1,41
Απόδοση σε ολικά στερεά (%)	20,88±1,33	25,45±0,18	26,30±0,79

Παρά την αντίστοιχη απόδοση σε φαινολικά συστατικά που παρουσιάζουν οι διαφορετικές θερμοκρασίες, παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στους 40 και τους 60°C. Μία ερμηνεία που θα μπορούσε να δοθεί σε αυτό το φαινόμενο, είναι ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες παραλαμβάνονται περισσότερα φαινολικά συστατικά, άρα και περισσότερες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Παρ' όλα αυτά, κάποια φαινολικά που είναι θερμοευαίσθητα μπορεί να αποσυντίθενται και έτσι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο να παραμένει ίδιο. Σε αυτή την περίπτωση, οι ουσίες με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση δείχνουν να μην υποβαθμίζονται και έτσι προσδίδουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ισχύ στο εκχύλισμα.



Διάγραμμα 4.12: Ισοδύναμο γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου σε αιθανολικό διάλυμα 96% για τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

Όσον αφορά τα αντίστοιχα πειράματα με αιθανόλη, η εικόνα που παρουσιάζεται είναι διαφορετική. Η ομοιότητα με τα υδατικά διαλύματα είναι ότι η αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να συντελεί στη μείωση του χρόνου της εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στην εκχύλιση στους 22°C απαιτούνται 200 min περίπου για την ολοκλήρωση της εκχύλισης, στους 60°C απαιτούνται λιγότερα από 100 min. Στην εκχύλιση των 40°C δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα που να αφορά το χρόνο εκχύλισης καθώς δεν υπάρχει ακόμη πλατώ στο χρονικό διάστημα που διήρκεσε το πείραμα. Η σημαντική διαφορά που παρατηρείται, αφορά την απόδοση των εκχυλίσεων.

Πίνακας 4.8: Ολική απόδοση σε στερεά και απόδοση σε ολικά φαινολικά και αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων 96% σε διαφορετικές θερμοκρασίες

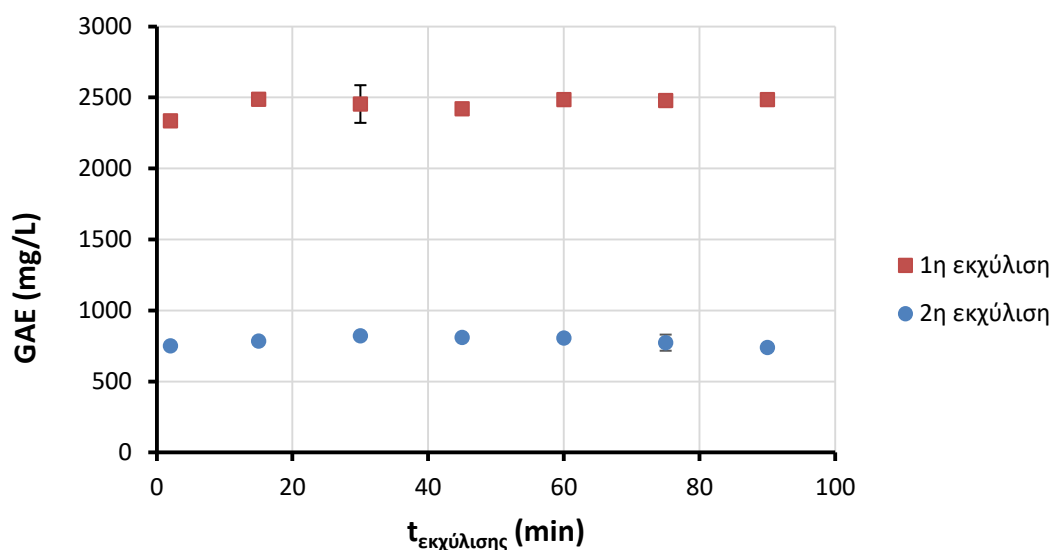
Θερμοκρασία (°C)	22	40	60
Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	7,98 ±0,13	18,31±0,27	25,17±0,35
Ισοδύναμο trolox TE(g/kg ξηρού φυτού)	7,83±0,82	17,42±1,89	28,50±2,47
Απόδοση σε ολικά στερεά (%)	6,04 ±0,05	7,26±0,42	13±0,11

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 4.8, αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις και σε ολικά στερεά και σε ολικά φαινολικά συστατικά και σε αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με αυτό των Spigno and De Faveri (2007), που εξετάζοντας ένα εύρος θερμοκρασιών από 28

μέχρι 60°C, παρατήρησαν βέλτιστη απόδοση στην εκχύλιση ολικών φαινολών από υπολείμματα σταφυλιών στους 60°C για μίγμα αιθανόλης:νερού 9:1.

Λαμβάνοντας ως μέτρο σύγκρισης την απόδοση σε ολικές φαινόλες, αύξηση της θερμοκρασίας από τους 22 στους 40°C αύξησε την απόδοση κατά 129,45%, ενώ αύξηση από τους 22 στους 60°C αύξησε την απόδοση κατά 215,41%.

Στο πείραμα με το υδατικό διάλυμα στους 60°C, πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη διαδοχική εκχύλιση της ρίγανης που συλλέχθηκε στη ίδια θερμοκρασία, χρησιμοποιώντας την ίδια αναλογία στερεού-υγρού.



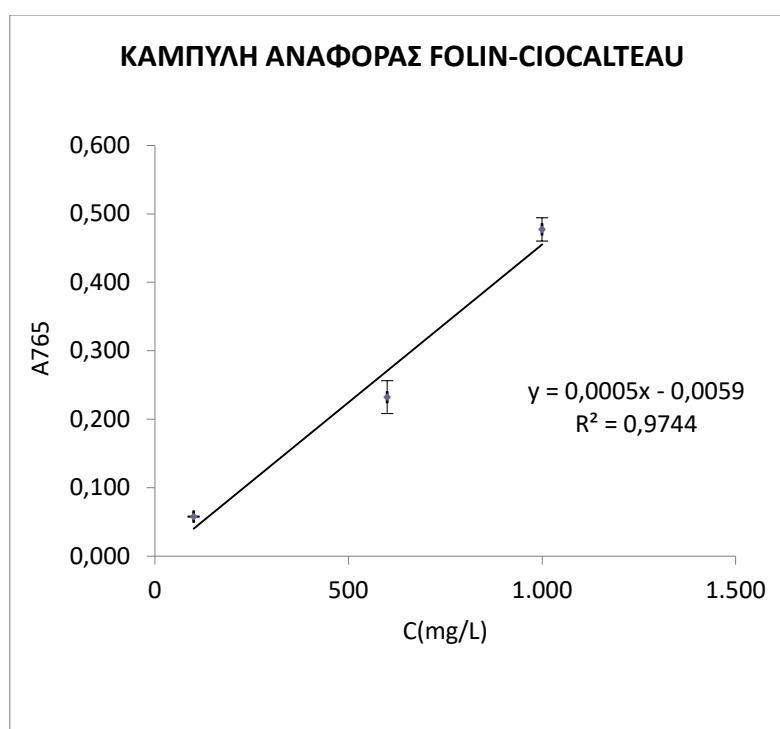
Διάγραμμα 4.13: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για τις δύο διαδοχικές εκχυλίσεις διαλείποντος έργου με διαλύτη καθαρό νερό στους 60°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

Στο διάγραμμα 4.13 φαίνεται πως η δεύτερη εκχύλιση της ρίγανης έχει αντίστοιχη μορφή με την πρώτη. Η πτώση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών μετά τα 60 min, υποστηρίζει την υπόθεση ότι πραγματοποιείται αποσύνθεση ορισμένων θερμοευαίσθητων ουσιών. Με τη δεύτερη εκχύλιση παραλαμβάνονται 15,08 g GAE/kg ξηρού φυτού, δηλαδή το 30,33% της πρώτης εκχύλισης. Έτσι τα ολικά φαινολικά μαζί με την πρώτη εκχύλιση, φτάνουν τα 64,79 g GAE/kg ξηρού φυτού.

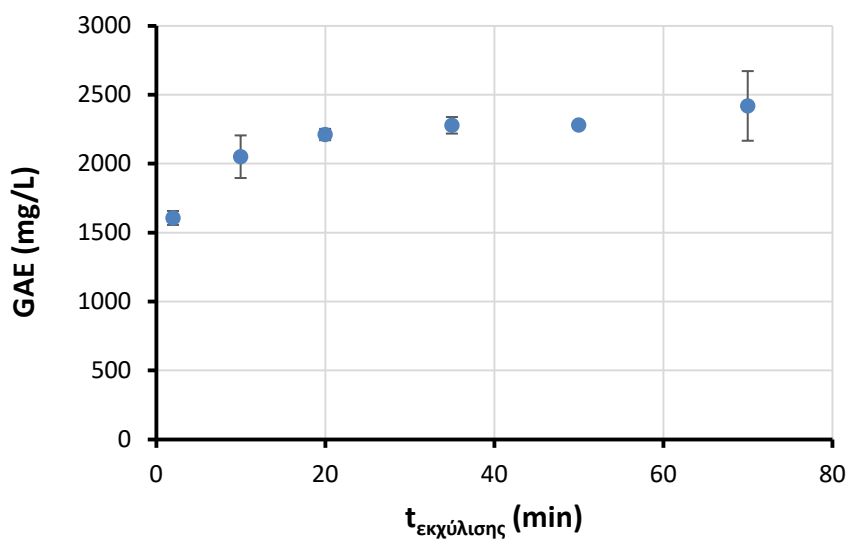
4.5 Εκχυλίσεις σε αλκαλικά διαλύματα

Έπειτα από τις εκχυλίσεις με αιθανολικά διαλύματα, εξετάστηκε η δυνατότητα αύξησης της απόδοσης της εκχύλισης με χρήση αλκαλικών διαλυμάτων. Τα διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν σχεδόν κορεσμένο $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (pH=12) και KOH 0,2 N (pH=13,3). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν στους 22°C με αναλογία στερεού:υγρού 1:20.

Μετά από την εκχύλιση με το υδατικό διάλυμα $\text{Ca}(\text{OH})_2$, το pH του εκχυλίσματος ήταν 6,32, πολύ κοντά δηλαδή στην τιμή του υδατικού διαλύματος (pH=6,14). Το pH όμως του εκχυλίσματος KOH μετά από την εκχύλιση, ήταν 12,6, πολύ υψηλότερο δηλαδή του υδατικού. Συνεπώς για τη μέτρηση των ολικών φαινολών στο εκχύλισμα του υδατικού διαλύματος KOH , κατέστη αναγκαία η κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε αλκαλικό περιβάλλον για τη μέθοδο Folin-Ciocalteu με pH παραπλήσιο στο ζητούμενο. Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιήθηκε με υδατικό διάλυμα KOH με pH 12,6 που παρασκευάστηκε. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της ήταν η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με γαλλικό οξύ σε απιονισμένο νερό, με μόνη διαφορά το γεγονός ότι οι αραιώσεις του γαλλικού οξέος πραγματοποιούνταν σε υδατικό διάλυμα KOH με pH=12,6 και όχι σε απιονισμένο νερό.

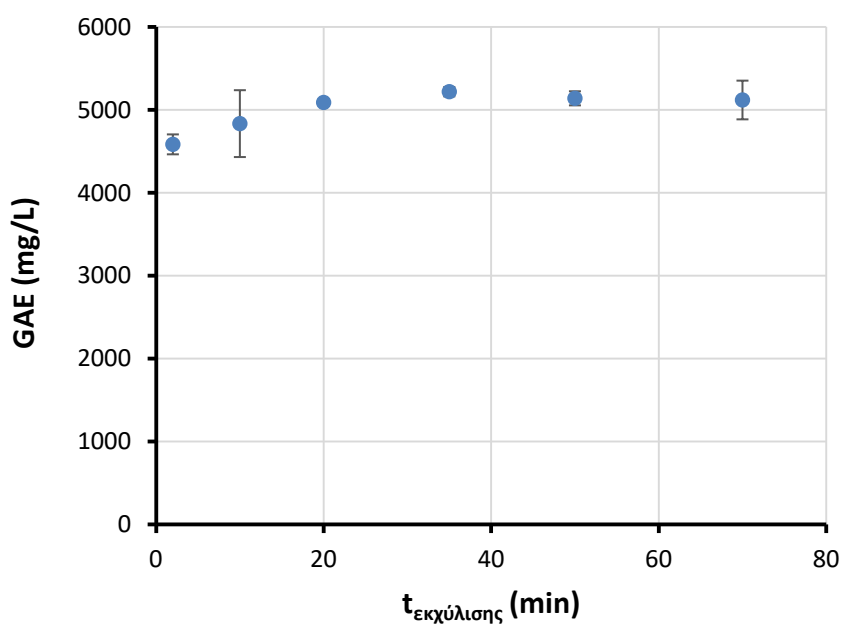


Διάγραμμα 4.14: Καμπύλη αναφοράς μεθόδου Folin-Ciocalteu σε pH=12,6. Απορρόφηση στα 765 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος



Διάγραμμα 4.15: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την εκχύλιση διαλείποντος έργου με υδατικό διάλυμα Ca(OH)_2 pH=12 στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4.15, η εκχύλιση με το υδατικό διάλυμα Ca(OH)_2 ολοκληρώνεται σχετικά γρήγορα, καθώς η επίτευξη πλατώ γίνεται στα 20 min περίπου.



Διάγραμμα 4.16: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος συναρτήσει του χρόνου για την εκχύλιση διαλείποντος έργου με υδατικό διάλυμα KOH pH=13,3 στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20.

Συγκρίνοντας το διάγραμμα 4.16 με το διάγραμμα 4.15, φαίνεται πως ενώ η εκχύλιση με διάλυμα ΚΟΗ έχει πολύ μεγαλύτερες αποδόσεις από ότι με διάλυμα Ca(OH)₂, αργεί περισσότερο να φτάσει σε πλατώ (40 min περίπου).

Πίνακας 4.9: Αποδόσεις σε ολικές φαινόλες και αντιοξειδωτική δράση των αλκαλικών εκχυλισμάτων και σύγκριση με νερό στους 22°C και με αναλογία στερεού-υγρού 1:20

Διάλυμα	Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	Ισοδύναμα trolox TE (g/kg ξηρού φυτού)
Υδατικό	48,69±1,07	86,88±7.66
ΚΟΗ (pH=13,3)	105,68±4,67	66,67±0,24
Ca(OH) ₂ (pH=12)	52,62±1,83	81,67±1,18

Στον πίνακα 4.9 παρουσιάζονται οι αποδόσεις σε ολικά φαινολικά και ουσίες με αντιοξειδωτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος καθώς και των εκχυλισμάτων των υδατικών διαλυμάτων Ca(OH)₂ και ΚΟΗ. Η μέτρηση σε ισοδύναμα trolox του διαλύματος ΚΟΗ, πραγματοποιήθηκε μετά από οξίνισή του με κιτρικό οξύ ώστε το pH να καταστεί αντίστοιχο με του υδατικού διαλύματος, καθώς δεν ήταν δυνατή η κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο DPPH σε αλκαλικό περιβάλλον. Παρατηρείται πως όσον αφορά τις ολικές φαινόλες, το διάλυμα ΚΟΗ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανάκτηση σε ολικά φαινολικά συστατικά, περίπου τη διπλάσια απ' ότι το καθαρό νερό.

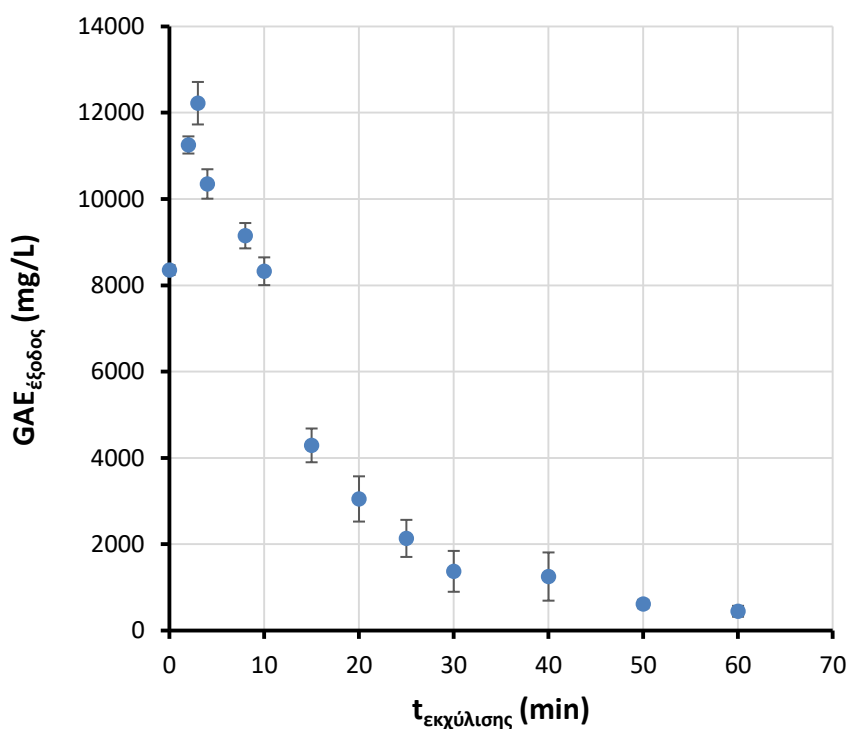
Σύμφωνα με την έρευνα των Max et al. (2010) που εκχύλισαν βλαστούς αμπέλου με διαλύματα NaOH, η εκχύλιση σε υψηλότερο pH οδηγεί στην απελευθέρωση δεσμευμένων υδροξικιναμωμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων που είναι δεσμευμένα με εστερικούς δεσμούς στη λιγνίνη. Συνεπώς το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη σημαντικής ποσότητας αυτών των ουσιών στη ρίγανη.

Συγκρίνοντας την απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων των διαλυμάτων Ca(OH)₂ και ΚΟΗ με αυτές του καθαρού νερού, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το αύξηση του pH μέχρι ορισμένο σημείο δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή όσον αφορά τις αποδόσεις, καθώς η ποσότητα φαινολικών που έδρασαν ως οξέα ήταν επαρκής για την εξουδετέρωση της βάσης, εξ ου και το αντίστοιχο pH του εκχυλίσματος με διάλυμα Ca(OH)₂ με του καθαρού νερού. Με περαιτέρω αύξηση του pH όμως, το αλκαλικό περιβάλλον διατηρήθηκε και οδήγησε στην εκχύλισης μεγαλύτερης ποσότητας φαινολικών, καθώς εκχύλισε και δεσμευμένα συστατικά, πιθανότατα υδρολύοντας τους εστερικούς δεσμούς φαινολικών συστατικών με τη λιγνίνη του κυτταρικού τοιχώματος. Η μειωμένη αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος ΚΟΗ, οφείλεται στο ότι η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μετά από

οξίνιση με κιτρικό οξύ, συνεπώς ένα μεγάλο μέρος των ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, πιθανώς κατακρημνίστηκε. Για την επιβεβαίωση αυτών των υποθέσεων, είναι πάντως απαραίτητη η ανάλυση των αλκαλικών εκχυλισμάτων με χρωματογραφία, ούτως ώστε να μπορέσουν να ταυτοποιηθούν τα επιμέρους συστατικά τους.

4.6 Εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό

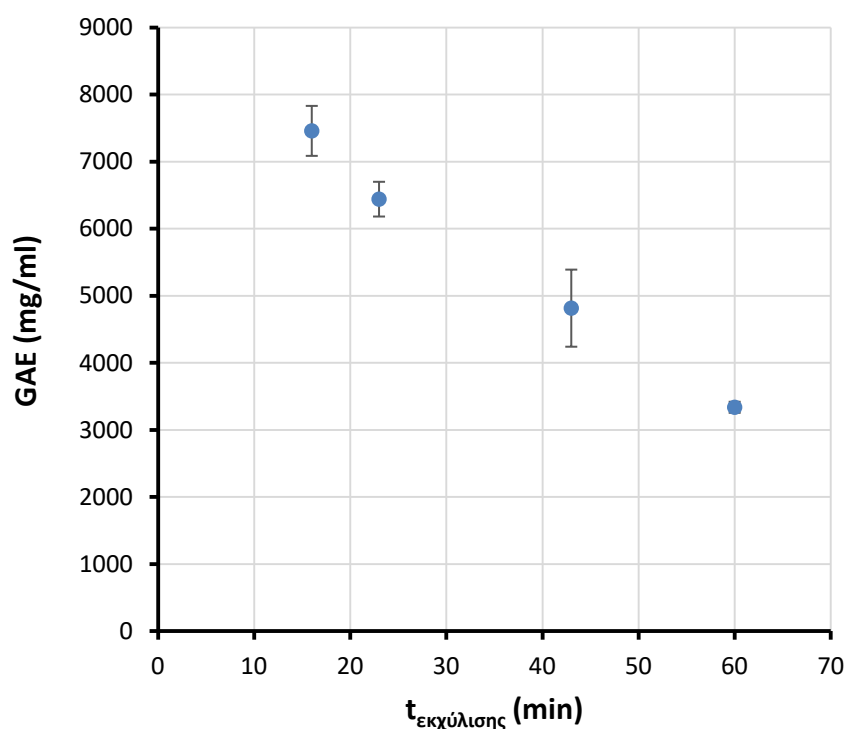
Στο τελευταίο σκέλος των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό, ώστε να συγκριθεί με την αντίστοιχη διεργασία διαλείποντος έργου. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στη διάταξη που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.3 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.6.



Διάγραμμα 4.17: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος στην έξοδο του εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.17, κατά την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό, αρχικά αυξάνεται η συγκέντρωση σε φαινορικά συστατικά στην έξοδο του εκχυλιστήρα και στη συνέχεια, από τα 3 min και μετά πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση μειώνεται. Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογηθεί καθώς το νερό που εξέρχεται από τον εκχυλιστήρα στην αρχή της εκχύλισης, δεν έχει πλήρη επαφή με τη φυτόμαζα, συγκριτικά με το νερό που εξέρχεται από τον εκχυλιστήρα στη συνέχεια, καθώς έχει βρει δίοδο μέσω καναλιών που σχηματίζονται κατά τη φόρτωση του

εκχυλιστήρα. Στη συνέχεια όμως, λόγω της κατάληψης των καναλιών από νερό, το νερό που εισέρχεται μετά στον εκχυλιστήρα, διαβρέχει καλύτερα τη φυτόμαζα, εξ ου και η συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης σε φαινολικά στην έξοδο του εκχυλιστήρα κατά τα πρώτα λεπτά της εκχύλισης. Στη συνέχεια, λόγω της εκχύλισης, μειώνεται η συγκέντρωση των φαινολικών στη φυτόμαζα και συνεπώς μειώνεται και η συγκέντρωσή τους στο νερό στην έξοδο του εκχυλιστήρα. Μέσα σε 60 min τελικά, η συγκέντρωση φαινολικών στην έξοδο του εκχυλιστήρα, τείνει να μηδενιστεί.



Διάγραμμα 4.18: Ισοδύναμα γαλλικού οξέος στο εκχύλισμα κατά την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με νερό

Παρατηρώντας το διάγραμμα 4.18, διαπιστώνεται ότι η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό είναι ένα απόλυτα φυσιολογικό γεγονός, καθώς όπως η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών μειώνεται στην έξοδο του εκχυλιστήρα, συντελεί στην όλο και μεγαλύτερη αραίωση του εκχυλίσματος.

Πίνακας 4.10: Ολική απόδοση σε στερεά και φαινολικά συστατικά για τις διεργασίες διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου με χρήση καθαρού νερού ως διαλύτη

Διάλυμα	Ολικά φαινολικά GAE (g/kg ξηρού φυτού)	Απόδοση σε ολικά στερεά(%)
Διαλείποντος έργου	48,69±1,07	20,88±1,33
Ημιδιαλείποντος έργου	49,23±1,19	22,11±0,72

Όπως παρατηρείται, οι αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά των δύο διεργασιών είναι αντίστοιχες. Αυτό που πρέπει να τονιστεί όμως είναι πως το τελικό εκχύλισμα στη διεργασία ημιδιαλείποντος έργου, ήταν 290 mL, συνεπώς κατ' αντιστοιχία με την εκχύλιση διαλείποντος έργου, η αναλογία στερεού-υγρού είναι 1:14,5. Άρα η ίδια απόδοση, επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μικρότερο όγκο διαλύτη, έχοντας δηλαδή πυκνότερο εκχύλισμα. Αυτό φαίνεται και από το διάγραμμα 4.18, καθώς η τελική συγκέντρωση του εκχυλίσματος είναι μεγαλύτερη των 3000 mg GAE/L, ενώ στις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου με αιθανολικά διαλύματα, οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων μετά βίας ξεπέρασαν τα 2500 mg GAE/L. Επιπλέον, στην εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου, δεν υπάρχει απαίτηση διαχωρισμού της φυτόμαζας από το διαλύτη στο τέλος της εκχύλισης και δεν έχει απομείνει ροφημένο εκχύλισμα στη φυτόμαζα. Επομένως, συνολικά η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου πλεονεκτεί σημαντικά έναντι εκείνης σε ασυνεχή εκχυλιστήρα πλήρους ανάδευσης.

4.7 Εκτίμηση συντελεστών διάχυσης (D_{eff}) για τις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου

Για την εκτίμηση του αποτελεσματικού συντελεστή διάχυσης D_{eff} στις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου, θεωρήθηκε ότι η διάχυση των εκχυλίσμων συστατικών από το εσωτερικό των σωματιδίων της ρίγανης προς την επιφάνεια αποτελεί το βραδύτερο στάδιο. Επιπλέον έγιναν οι εξής παραδοχές:

- Η ρίγανη θεωρήθηκε ως όμοια σφαιρικά σωματίδια, διαμέτρου 500 μm (ίσο με το άνοιγμα του κοσκίνου).
- Η συγκέντρωση των εκχυλίσμων συστατικών στα σωματίδια της ρίγανης προκύπτει ως διαφορά της ολικής συγκέντρωσης αυτών των συστατικών μείον της συγκέντρωσης που προσδιορίζεται την αντίστοιχη χρονική στιγμή στο εκχύλισμα
- Η συγκέντρωση ισοροπίας των εκχυλίσμων συστατικών στα σωματίδια της ρίγανης είναι 0.
- Με την επαφή της φυτόμαζας με το διαλύτη (χρόνος 0) διαλύονται τα επιφανειακά ευρισκόμενα εκχυλιζόμενα συστατικά του φυτού

Επομένως, σύμφωνα με το δεύτερο νόμο του Fick για σφαιρικά σωματίδια, χρησιμοποιήθηκε η σχέση:

$$\frac{d\left(\ln\frac{C_{ολ}-C}{C_{ολ}-C_o}\right)}{dt} = -\frac{\pi^2}{R^2} \cdot D_{eff}$$

όπου $C_{ολ}$ είναι η τελική συγκέντρωση των φαινολικών στο διάλυμα, C_o η αρχική συγκέντρωση των φαινολικών στο διάλυμα ($t=0$), C η συγκέντρωση φαινολικών στο διάλυμα την εκάστοτε χρονική στιγμή t , R η ακτίνα των σωματιδίων του υλικού σε m και D_{eff} ο συντελεστής διάχυσης σε m^2/s (Guerrero et al, 2008)

Ως τελική συγκέντρωση στο εκχύλισμα ορίζεται η συγκέντρωση που είχε το αιθανολικό διάλυμα 60% που είχε την υψηλότερη απόδοση, με εξαίρεση την εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα KOH που εκχυλίζονται επιπλέον ουσίες, όπου χρησιμοποιείται ως τελική συγκέντρωση αυτή που επιτυγχάνεται σε αυτή την εκχύλιση. Με χρήση του προγράμματος Microsoft Office Excel 2007, κατασκευάζεται το διάγραμμα $\ln(C_{ολ}-C)$ συναρτήσει του t (min) σε όλες της εκχυλίσεις. Η μορφή της εξίσωσης που προκύπτει είναι:

$$\ln(C_{ολ}-C) = \ln(C_{ολ}-C_o) - kt$$

Το k που είναι η κλίση του διαγράμματος, ισούται με $-\frac{\pi^2}{R^2} \cdot D_{eff}$. Το C_o προσδιορίζεται από την αποτέμνουσα του διαγράμματος. Σε μερικές εκχυλίσεις δεν υπήρχαν τα κατάλληλα πειραματικά σημεία, οπότε δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός του D_{eff} . Η κλίση του παραπάνω διαγράμματος με το συντελεστή συσχέτισης R^2 , και επίσης το C_o καθώς και η τιμή του D_{eff} για κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.11: Υπολογισμός D_{eff} για πειράματα διαλείποντος έργου

Συνθήκες εκχύλισης	Κλίση	R^2	C_o (mg/L εκχυλίσματος)	$D_{eff} \cdot 10^{-13}$ (m^2/s)
96% EtOH/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0011	0,998	160	1,16
80% EtOH/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0221	0,967	698	23,33
60% EtOH/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0512	0,976	1622	54,04
0% EtOH/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0426	0,968	1657	44,96
0% EtOH/ 40°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,1089	0,999	1967	114,94
0% EtOH/ 22°C / στερεό : υγρό 1:40	-0,0161	0,956	996	16,99
96% EtOH/ 40°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0040	0,978	219	4,22
96% EtOH/ 60°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0142	0,971	401	14,99
Ca(OH) ₂ pH 12/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,0407	0,943	1578	42,96
KOH pH 13.3/ 22°C / στερεό : υγρό 1:20	-0,1974	0,977	3857	208,34

Όπως φαίνεται από τις τιμές των συντελεστών διάχυσης που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.11, ο μικρότερος συντελεστής διάχυσης παρουσιάζεται στο αιθανολικό διάλυμα περιεκτικότητας 96%, ενώ ο μεγαλύτερος στο υδατικό διάλυμα KOH.

Δεν υπάρχουν δεδομένα για το καθαρό νερό σε θερμοκρασία 60°C λόγω αδυναμίας προσαρμογής της παραπάνω σχέσης σε αυτά, αλλά λόγω της σχεδόν σταθερής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, είναι προφανές ότι σε εκείνο το διάλυμα ο συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος από αυτόν του καθαρού νερού στους 40°C. Ακόμη μικρότερος παρουσιάζεται ο συντελεστής διάχυσης με διαλύτη το νερό στους 20°C. Στα πειράματα με αιθανολικό διάλυμα περιεκτικότητας 96%, ο συντελεστής διάχυσης παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά με το καθαρό νερό ως διαλύτη, δηλαδή αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Άρα σαν γενικότερο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί, είναι η αύξηση του συντελεστή διάχυσης με αύξηση της θερμοκρασίας.

Ενδεικτικά, με βάση τους συντελεστές διάχυσης στις διαφορετικές θερμοκρασίες στα πειράματα με χρήση αιθανόλης 96% ως διαλύτη, εκτιμήθηκε η ενέργεια ενεργοποίησης με βάση την εξίσωση Arrhenius:

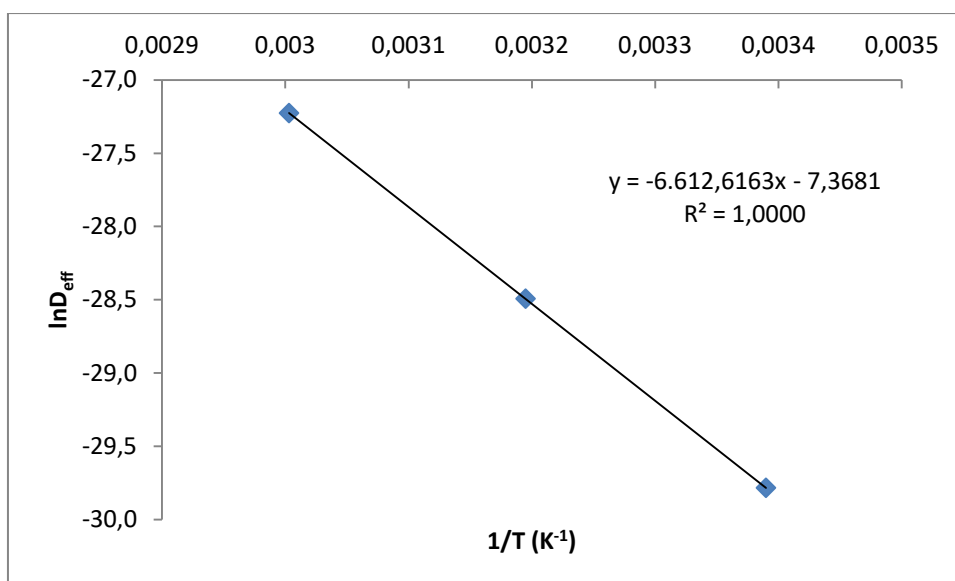
$$D_{eff} = D_o \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

όπου D_o είναι ο συντελεστής διάχυσης σε άπειρη θερμοκρασία, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, ίση με $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ και T η θερμοκρασία σε K.

Η παραπάνω σχέση μπορεί να μετασηματιστεί στη μορφή $\ln D_{eff} = \ln D_o - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$.

Έτσι, κατασκευάζοντας το διάγραμμα του $\ln D_{eff}$ συναρτήσει του $\frac{1}{T}$, προσδιορίζονται

από την αποτέμνουσα και την κλίση το D_0 και η E_a . Τελικά το D_0 υπολογίστηκε $6,31 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ και η E_a $54,98 \text{ kJ/mol}$.



Διάγραμμα 4.19: $\ln D_{\text{eff}}$ συναρτήσει του $1/T$ για τα διαλύματα αιθανόλης 96%

Τέλος, συγκρίνοντας τους συντελεστές διάχυσης των πειραμάτων σε κοινή θερμοκρασία που διέφεραν μόνο ως προς την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη, φαίνεται πως η αύξηση του ποσοστού του νερού στο μίγμα αιθανόλης-νερού, οδηγεί στην αύξηση του συντελεστή διάχυσης. Αυτό φαίνεται και από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης σε ολικές φαινόμενες του διαλύτη με αύξηση του ποσοστού του νερού. Ο συντελεστής διάχυσης πάντως μεγιστοποιείται στην περίπτωση του υδατικού διαλύματος KOH , καθώς η αρχική συγκέντρωση εκχυλίσματος αυτού ξεπερνάει ακόμη και τις τελικές συγκεντρώσεις των υπολοίπων εκχυλισμάτων.

5. Συμπεράσματα-Προτάσεις

Τα αρωματικά φυτά και γενικότερα τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διάφορες μέθοδοι ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών της ρίγανης (*O. Vulgare* ssp. *hirtum*), ενός φυτού πολύ διαδεδομένου στην Ελλάδα και στη Μεσόγειο γενικότερα. Ενώ το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει σημαντική εμπορική αξία, λόγω της περιεκτικότητάς του σε καρβακρόλη, δεν έχουν αναφερθεί χρήσεις της απελαιωμένης ρίγανης ως πηγή βιοδραστικών συστατικών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τη ρίγανη με τη μέθοδο της υδρο-ατμοαπόσταξης και διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητά της σε αυτό είναι αρκετά υψηλή. Το βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, το οποίο καθορίζει και την τιμή του είναι η καρβακρόλη, συνεπώς μελετήθηκε η δυνατότητα κλασμάτωσης του αιθέριου ελαίου προς παραλαβή κλάσματος πλούσιου σε καρβακρόλη, φτάνοντας τελικά σε υψηλή περιεκτικότητα. Συνεπώς, διαπιστώθηκε και στην πράξη η σημαντική εμπορική αξία του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, καθώς η καρβακρόλη είναι μία ουσία με ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ακόμη, το υδατικό αφέψημα της υδρο-ατμοαπόσταξης, παρουσίασε σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς και υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά.

Στη συνέχεια, για την επεξεργασία του απελαιωμένου φυτού με σκοπό την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από αυτό, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις Soxhlet, πρώτα με οξικό αιθυλεστέρα και στη συνέχεια διαδοχική με αιθανόλη. Το αιθανολικό εκχύλισμα της Soxhlet παρουσίασε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά συγκριτικά με αυτό του οξικού αιθυλεστέρα. Επειδή όμως η Soxhlet είναι μία ακριβή τεχνική με εφαρμογή κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα, εξετάστηκαν φθηνότερες και λιγότερο χρονοβόρες λύσεις για την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών από τη ρίγανη.

Δοκιμάστηκαν αρχικά εκχυλίσεις διαλείποντος έργου σε αιθανολικά μίγματα με νερό διαφόρων περιεκτικότητων σε αιθανόλη σε δεδομένες συνθήκες και εξετάστηκαν οι αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Οι μέγιστες αποδόσεις προέκυψαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μίγμα με περιεκτικότητα 60% σε αιθανόλη και μάλιστα ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες της Soxhlet, καθιστώντας αυτή τη μέθοδο ως οικονομική και αποδοτική. Οι αποδόσεις που προέκυψαν με διαλύτη καθαρό νερό όμως ήταν επίσης πολύ υψηλές, συνεπώς για λόγους οικονομίας διαλυτών θα μπορούσε να γίνει χρήση απλώς υδατικών διαλυμάτων. Στα δείγματα των διαφόρων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC που έδειξαν ότι βασικό συστατικό της ρίγανης είναι το ροσμαρινικό οξύ, ενώ εντοπίστηκε πλήθος φλαβονοειδών, ουσιών δηλαδή με σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Το διάλυμα αιθανόλης 96% παρέλαβε μικρές ποσότητες ροσμαρινικού οξέος, αλλά όταν αναμίχθηκε με το νερό η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ροσμαρινικό οξύ αυξήθηκε κατακόρυφα, γεγονός που δικαιολόγησε και την αύξηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, καθώς το ροσμαρινικό οξύ είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό. Στο καθαρό νερό πάντως η περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ ήταν μικρότερη από τα μίγματα περιεκτικότητας 60 και 80% σε αιθανόλη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως πιθανότατα ο ρόλος του νερού στα μίγματα του με την αιθανόλη εκτός από το να διαλύει το ροσμαρινικό οξύ, είναι να βοηθάει την αιθανόλη να διαβρέξει καλύτερα τη φυτόμαζα ώστε να μπορέσει να διαλυθεί το ροσμαρινικό οξύ σε αυτή. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη καθαρό νερό, έναντι αυτού στο οποίο χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη περιεκτικότητας 80%, μπορεί να αποδοθεί στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του πρώτου σε φλαβονοειδή.

Εξετάστηκαν ακόμη παράμετροι όπως η αναλογία υγρού-στερεού, που δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση και η αύξηση της θερμοκρασίας, που ενώ σε υδατικά διαλύματα απλώς μείωσε τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης, σε διαλύματα 96% αιθανόλης αύξησε και την απόδοση της εκχύλισης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε υδατικά διαλύματα Ca(OH)_2 και KOH . Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις αποδόσεις ολικών φαινόλων των εκχυλίσεων με το διάλυμα Ca(OH)_2 συγκριτικά με την αντίστοιχη εκχύλιση με διαλύτη καθαρό νερό. Όμως το αυξημένο pH που προκλήθηκε με χρήση KOH , οδήγησε στο διπλασιασμό της απόδοσης. Το αυξημένο pH οδήγησε πιθανότατα στην εκχύλιση δεσμευμένων φαινολικών οξέων υδρολύοντας τους εστερικούς δεσμούς τους με τη λιγνίνη. Συμπερασματικά, η χρήση Ca(OH)_2 ως βάσης για την αύξηση της απόδοσης σε ολικές φαινόλες δεν ενδείκνυται καθώς λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του στο νερό, είναι δύσκολο να επιτευχθούν οι συνθήκες που θα ευνοήσουν την αύξηση αυτή. Είναι πάντως σκόπιμο να γίνει μία πιο εμπειριστατωμένη μελέτη που να βασίζεται στην ανάλυση των εκχυλισμάτων αυτών με χρωματογραφία, ώστε να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους.

Εξετάστηκε επίσης η εκχύλιση με νερό σε εκχυλιστήρα διαλείποντος έργου ώστε να γίνει σύγκριση με την αντίστοιχη διεργασία διαλείποντος έργου. Από τα αποτελέσματα, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η εκχύλιση διαλείποντος έργου πλεονεκτεί έναντι της διαλείποντος, καθώς σε σύντομο χρονικό διάστημα μπορούν να ληφθούν πυκνότερα εκχυλίσματα χωρίς να απαιτείται ο τελικός διαχωρισμός της φυτόμαζας από το εκχύλισμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περαιτέρω μελέτη της χρήσης ήπιων αλκαλικών διαλυμάτων σε αυτού του τύπου την εκχύλιση.

Τέλος, με την εύρεση του αποτελεσματικού συντελεστή διάχυσης (D_{eff}) στις εκχυλίσεις διαλείποντος έργου, εξήχθη το συμπέρασμα ότι ο συντελεστής διάχυσης αυξάνεται τόσο με την αύξηση της θερμοκρασίας, όσο και με την αύξηση της

περιεκτικότητας των μιγμάτων αιθανόλης-νερού σε νερό. Η μέγιστη τιμή του πάντως λαμβάνεται με χρήση υδατικού διαλύματος ΚΟΗ 0,2 Ν (pH=13).

Με βάση όλα τα παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η ρίγανη είναι ένα φυτό πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά και συνεπώς θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω οι δυνατότητες ανάκτησής τους από αυτή και με άλλες σύγχρονες μεθόδους, όπως η εκχύλιση με υπέρηχους και παλμικά ηλεκτρικά πεδία. Ενδιαφέρον έχει ο συνδυασμός παλμικών ηλεκτρικών πεδίων με εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου σε φυτόμαζα μη αλεσμένη, ώστε να ελεγχθεί αν μπορεί να αποφευχθεί το ενεργοβόρο στάδιο της άλεσης του φυτού.

6. Βιβλιογραφία

Abaza L., Youssef N.B., Manai H., Haddada F.M., Methenni K. Zarrouk M., 2011, Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities, *grasas y aceites*, 62 (1): 96-104

Ainsworth E.A., Gillespie K.M., 2007, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nature Protocols* 2: 875-877

Alberti A., Zielinskyi A.A.F., Zardo D.M., Demiate I.M., Nogueira A., Mafra L.I., 2014, Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology, *Food Chemistry* 149: 151–158

Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J., 2004, Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 261–265

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M., 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering* 117: 426–436

Bauer J.L., Harbaum-Piayda B., Schwarz K., 2012, Phenolic compounds from hydrolyzed and extracted fiber-rich by-products, *LWT - Food Science and Technology* 47: 246-254

Bazykina N. I., Nikolaevskii A. N., Filippenko T. A., Kaloerova V. G., 2002, Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 36: 46-49

Bernatoniene J., Cizauskaite U., Ivanauskas L., Jakstas V., Kalveniene Z., Kopustinskiene D.M., 2016, Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves, *Industrial Crops and Products* 84: 72–79

Bimpilas A., Panagopoulou M., Tsimogiannis D., Oreopoulou V., 2016, Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors, *Food Chemistry* 197: 39-46

Boussetta N., Soichi E., Lanoiselle J.L., Vorobiev E., 2014, Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields, *Industrial Crops and Products* 52: 347–353

Burns R.E., 1971, Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum, *Agron. J.* 63: 511–512

Burt S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253

Chen C.R., Lee Y.N., Chang C.M.J., Lee M.R., Wei I.C., 2007, Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in vitro, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 38 (3–4): 191–196

Chethan S., Malleshi N.G., 2007, Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability, *Food Chemistry* 105: 862–870

Corbin C., Fidel T., Leclerc E.A., Barakzoy E., Sagot N, Falguières A, Renouard S., Blondeau J.P., Ferroud C., Doussot J., Lainé E., Hano C., 2015, Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum L.*) seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*, 26: 176-185

Datta S., Loyo-Rosales J.E., Rice C.P., 2002, A simple method for the determination of trace levels of alkylphenolic compounds in fish tissue using pressurized fluid extraction, solid phase cleanup, and high-performance liquid chromatography fluorescence detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (6): 1350–1354

De Castro M.D.L., Garcia-Ayuso L.E., 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta* 369: 1-10

De Castro M.D.L., Priego-Capote F., 2010, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217: 2383-2389

De Leonardis A., Macciola V., Di Domenico N., 2005, A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*), *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 220–227

De Martino L., De Feo V., Formisano C., Mignola E., Senatore, F., 2009, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare L. ssp. hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy), *Molecules*, 14(8): 2735-2746.

Deshpande S.S., Cheryan M., 1985, Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans, *J. Food Sci.* 50: 905–910

Dong J., Liu Y., Liang Z., Wang W., 2010, Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root, *Ultrasonics Sonochemistry* 17: 61–65

Donsi F., Ferrari G., Pataro G., 2010, Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue, *Food Eng Rev* 2:109–130

Gonçalves S., Moreira E., Grosso C., Andrade P. B., Valentão P., Romano A., 2016, Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet, *Journal of Food Science and Technology*

Gonzales G.B., Raes K., Vanhoutte H., Coelus S., Smagghe G., Van Camp J., 2015, Liquid chromatography–mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and non extractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams, *Journal of Chromatography A*, 1402: 60–70

Gonzalez-Centeno M.R., Comas-Serra F., Femenia A., Rossello C., Simal S., 2015, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera L.*): Experimental kinetics and modeling, *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 506-514

Graf B. A., Milbury P. E., Blumberg J. B., 2005, Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence, *Journal of medicinal food*, 8(3): 281-290.

Guerrero M.S., Torres J.S., Nunez M.J., 2008, Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modeling, *Bioresource Technology* 99: 1311–1318

Hartonen K., Parshintsev J., Sandberg K., Bergelin E., Nisula L., Riekkola M.-L., 2007, Isolation of flavonoids from aspen knotwood by pressurized hot water extraction and comparison with other extraction techniques, *Talanta* 74 (1): 32–38

Herrero M., Arraez-Roman D., Segura A., Kenndler E., Gius B., Raggi M.A., Ibanez E., Cifuentes A., 2005, Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts, *J. Chromatogr. A* 1084: 54–62

Hinneburg I., Neubert R.H.H., 2005, Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristics of Extracts from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Herb, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (1): 3-7

Hossain M., Brunton N., Barry-Ryan C., Martin-Diana A. B., Wilkinson M., 2008, Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants, *Rasayan Journal of Chemistry*, 1 (4): 751-756

Hossain M.B., Brunton N.P., Patras A., Tiwari B., O'Donnell C.P., Martin-Diana A.B., Barry-Ryan C., 2012, Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* 19: 582–590

Ibanez E., Kubatova A., Senorans F.J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S.B., 2003, Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants, *J. Agric. Food Chem.* 51: 375–382

Kaufmann B., Christen P., 2002, Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction, *Phytochem. Anal.* 13: 105–113

King J.W., 2006, Pressurized water extraction: resources and techniques for optimizing analytical applications, *Modern Extraction Techniques: Food and Agricultural Samples* 926: 79–95

Knorr D., Froehling A., Jaeger H., Reineke K., Schlueter O., Schoessler K., 2011, Emerging Technologies in Food Processing, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2: 203–35

Kokkini S., Karagiannakidou V., Hanlidou E., Vokou D., 1988, Geographical and altitudinal distribution of the Lamiaceae in Greece, *Phyton*, 28: 215-228.

Kokkini S., Vokou D., 1989, Carvacrol-rich Plants in Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, 4: 1-7

Kratchanova M., Pavlova E., Panchev I., 2004, The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin, *Carbohydr. Polym.* 56:181-186

Kronholm J., Revilla-Ruiz P., Porrás S.P., Hartonen K., Carabias-Martinez R., Riekkola M.-L., 2004, Comparison of gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis in analysis of phenolic compounds extracted from solid matrices with pressurized hot water, *Journal of Chromatography A* 1022 (1–2): 9–16

Krygier K., Sosulski F., Hogge L., 1982, Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 330-334

Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S., Boskou D., 1993, Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 197(1): 20-23

Liang Y., Xu Y., 2001, Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield from black tea, *Food Chemistry* 74: 155-160

Li B.B., Smith B., Hossain Md. M., 2006, Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method, *Separation and Purification Technology* 48: 182–188

Lin M.C., Tsai M.J., Wen K.C., 1999, Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix*, *Journal of Chromatography A* 830: 387–395

Lopez N., Puertolas E., Alvarez I., Condon S., Raso J., 2008a, Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety, *Eur. Food Res. Technol*, 227: 1099–1107

Lopez N., Puertolas E., Condon S., Alvarez I., Raso J., 2008b, Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9: 477–482

Lopez N., Puertolas E., Hernandez-Orte P, Alvarez I, Raso J., 2009, Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of Cabernet Sauvignon freshly fermented model wines obtained after different maceration times, *Food Sci. Technol.* 42:1225–1231

Luthria D.L., 2006, Application of green chemistry principles for extraction of phytolipids and phenolic compounds, *Indian Journal of Chemistry Section Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 45 (10): 2291–2296

Luthria D.L., Biswas R., Natarajan S., 2007, Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean, *Food Chemistry* 105 (1): 325–333

Luthria D.L., Vinjamoori D., Noel K., Ezzell J., 2004, *Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Competitive Studies*, AOSC Press, Chapter 3

Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S., 2007, Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacognosy Reviews* Vol 1, Issue 1

Max B., Salgado J.M., Cortes S., Dominguez J.M., 2010, Extraction of Phenolic Acids by Alkaline Hydrolysis from the Solid Residue Obtained after Prehydrolysis of Trimming Vine Shoots, *J. Agric. Food Chem.* 58 (3): 1909-1917

Molyneux P., 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarini J. Sci. Technol.*, 26(2) : 211-219

Mustafa A., Turner C., 2011, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta* 703: 8– 18

Naczki M., Shahidi F., 2006, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1523–1542

Naczki M., Shahidi F., Sullivan A., 1992, Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems, *Food Chem.* 45: 51–54

Nahar L., Sarker S.D., 2005, Supercritical Fluid Extraction, *Methods in Biotechnology* , 20: 47-76

Παρασκευοπούλου Αικατερίνα, 2016, Μελέτη της ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών από το αρωματικό φυτό *Satureja Thymbra* (θρούμπι), Διπλωματική εργασία, Ε.Μ.Π, Σχολή Χημικών Μηχανικών

Palma M., Pineiro Z., Barroso C.G., 2001, Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents, *Journal of Chromatography A*, 921: 169–174

Palma M., Taylor L.T., 1999, Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide, *Journal of Chromatography A*, 849: 117–124

Palma M., Taylor L.T., 1999, Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities, *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5044-5048

Paniwnyk L., Cai H., Albu S., Mason T.J., Cole R., 2009, The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 287–292

Paniwnyk L., Beaufoy E., Lorimer J.P., Mason T.J., 2001, The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*, *Ultrasonics Sonochemistry* 8: 299-301

Pineiro Z., Palma M., Barroso C.G., 2001, Analysis of trans-resveratrol in grapes by pressurised fluid extraction-solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection, *Biologically-Active Phytochemicals in Food* 269: 226–228

Price M.L., Butler L.G., 1977, Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268–1273

Puertolas E., Hernandez-Orte P., Saldana G., Alvarez I., Raso J., 2010c, Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines, *Food Res. Int.* 43: 761–766

Puertolas E., Lopez N., Saldana G., Alvarez I., Raso J., 2009a, Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale, *J. Food Eng.* 98: 120–125

Puertolas E., Luengo E., Alvarez I., Raso J., 2012, Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3:263–282

Puertolas E., Saldana G., Alvarez I., Raso J., 2010a, Effect of pulsed electric field processing of red grapes on wine chromatic and phenolic characteristics during aging in oak barrels, *J. Agr. Food Chem.* 58: 2351–2357

Puertolas E., Saldana G., Condon S., Alvarez I., Raso J., 2009b, A comparison of the effect of macerating enzymes and pulsed electric fields technology on phenolic content and color of red wine, *J. Food Sci.* 74: 647–652

Puertolas E., Saldana G., Condon S., Alvarez I., Raso J., 2010d, Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle, *Food Chem.* 119:1063–70

Raja R. R., 2012, Medicinally potential plants of *Labiatae (Lamiaceae)* family: an overview, *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(3): 203-213.

Rajha H.N., Boussetta N., Louka N., Maroun R.G., Vorobiev E., 2014, A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots, *Food Research International* 65: 462–468

Rodriguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., Cocero M.J., 2012, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *Journal of Food Engineering* 109: 98-103

Romdhanea M., Gourdon C., 2002, Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound Chemical Engineering Journal 87: 11–19

Shahidi F., Yeo J., 2016, Insoluble-Bound Phenolics in Food, Molecules, 21(9): 1216

Shirsath S.R., Sonawane S.H., Gogate P.R., 2012, Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations–A review of current status, Chemical Engineering and Processing 53: 10-23

Simeonov E., Tsibranska I., Minchev A., 1999, Solid–liquid extraction from plants–experimental kinetics and modeling , Chemical Engineering Journal 73: 255-259

Spigno G., De Faveri D.M., 2007, Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts, Journal of Food Engineering 78: 793–801

Σταυρακάκη Μαρία, 2004, Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των αρωματικών φυτών *Origanum heracleoticum* και *Salvia officinalis*, Διπλωματική Εργασία, ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1996, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils, J. Agric. Food Chem., 44: 1202-1205

Stoica R., Senin R.M., Ion R.D., 2013, Ethanol Concentration Effect on the Extraction of Phenolic Compounds from Ribes nigrum Assessed by Spectrophotometric and HPLC-DAD Methods, REV. CHIM. (Bucharest), 64: 620-624

Tao Y., Zhang Z., Sun D.W., 2014, Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature Ultrasonics Sonochemistry 21: 1461–1469

Teixeira B., Marques A., Ramos C., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira, J.A. Saraiva J.M.F., Nunes M.L., 2013, Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil, Journal of the Science of Food and Agriculture Volume, 93 (11): 2707–2714

Teresa M., Bailon E., Buelga C.S., Polyphenol extraction from foods, Scribd, 16p

Tipsrisukond N., Fernando L.N., Clark A.D., 1998, Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleoresin of Black Pepper from Supercritical Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork, J. Agric. Food Chem. 46 (10): 4329–4333

Tiwari B.K., 2015, Ultrasound: A clean, green extraction technology, Trends in Analytical Chemistry 71: 100-109

Tsimogiannis D., Choulitoudi E., Bimpilas A., Mitropoulou G., Kourkoutas Y. and Oreopoulou V., 2016, Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.07.002

Tsimogiannis D., Stavrakaki M., Oreopoulou V., 2006, Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*), International Journal of Food Science and Technology 41 (Supplement 1): 39-48

Vorobiev E., Lebovka N.I., 2006, Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: Raso J, Heinz H (eds) Pulsed electric field technology for the food industry. Fundamentals and applications. Springer, New York, 153–194

Wang L., Weller C.L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from Plants, Trends Food Sci. Technol., 17: 300-312

Zhou H., Liu C., 2006, Microwave assisted extraction of solanesol from tobacco leaves, J. Chromatogr. A. 1129: 135-139

Zuloaga O., Etxebarria N., Fernandez L.A., Madariaga J.M., 1999, Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach, Talanta. 50: 345-357