



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ανάπτυξη διεργασιών εκχύλισης  
δενδROLίβανου με τεχνικές φιλικές προς το  
περιβάλλον, αξιολόγηση της βιολογικής  
δράσης των εκχυλισμάτων και  
ενσωμάτωσή τους σε καλλυντικά  
σκευάσματα.**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**ΛΥΔΙΑ ΠΑΠΑΚΩΣΤΑ-ΤΣΙΓΚΡΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ**



**ΑΘΗΝΑ 2018**

*Στον παππού μου,*

*Χρίστο Τσιγκρή*

# Πρόλογος

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Ε.Μ.Π., κας Αναστασίας Δέτση, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018. Το μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής, ενώ πειράματα διεξήχθησαν και στο Οριζόντιο εργαστήριο αναλύσεων και στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε συνεργασία με την εταιρία Κορρές Α.Ε. φυσικά προϊόντα, και συγκεκριμένα με το αναλυτικό εργαστήριο, για τη διεξαγωγή πειραμάτων διάρκειας ενός μήνα.

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια, κα Αναστασία Δέτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία, υπό τη συνεχή επίβλεψη της ίδιας και της ερευνητικής της ομάδας. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες που μου προσέφερε.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτρη Κέκο, καθηγητή Ε.Μ.Π., για τη βοήθειά του καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης. Οφείλω, βέβαια, ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κυρία Θεοπίστη Λυμπεροπούλου, υπεύθυνη του οριζόντιου εργαστηρίου, για την άριστη συνεργασία μας, αλλά και για τη στήριξη και τις συμβουλές της σε όλους τους τομείς. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Διομή Μάμμα για την επιστημονική υποστήριξη της και τη βοήθειά της όλο αυτό το διάστημα.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο οργανικής χημείας, Νεφέλη Ποντίλλο, για την καθημερινή συνεργασία μας, τη δημιουργία φιλικού περιβάλλοντος, την υπομονή που υπέδειξε και την ουσιαστική πνευματική και ψυχική υποστήριξη που μου προσέφερε. Η καθοδήγησή της, σε συνδυασμό με τη βοήθεια όλων των μελών του εργαστηρίου οργανικής χημείας, αποτέλεσαν βασικό θεμέλιο στη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης εργασίας. Για αυτό το λόγο, άλλωστε, τους ευχαριστώ που ήταν δίπλα μου σε ό,τι τους ζήτησα και δημιούργησαν ένα ιδιαίτερα όμορφο κλίμα.

Από την εταιρία Κορρές, θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεργασία μας, την κυρία Χρυσούλα Σταματογιάννη, η οποία ήταν υπεύθυνη για την παρασκευή της κρέμας και των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Αγγελική Χαρμαντά, που εργάζεται στο αναλυτικό εργαστήριο της εταιρίας, για την αμέριστη βοήθειά της και το ευχάριστο περιβάλλον που δημιούργησε.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, Σάντυ, Γιάννη και Παναγιώτα, αλλά και σε ορισμένους δικούς μου ανθρώπους, που τόσο κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών μου, μου προσέφεραν απλόχερα την αγάπη τους, την ανιδιοτελή υποστήριξή τους, τη συμπαράστασή τους και με βοήθησαν να παραμείνω προσηλωμένη στους στόχους μου.

# Περίληψη

---

Τα εκχυλίσματα των φυτών αποτελούν πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, όπως φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες και φλαβονοειδή και εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση. Για αυτό το λόγο, καθίστανται όλο και πιο σημαντικά στην πρόληψη και στη θεραπεία ασθενειών (όπως ο καρκίνος και τα νευροεκφυλιστικά σύνδρομα) που σχετίζονται με την υπερβολική παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες. Το δενδρολίβανο αποτελεί ένα φυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων, εξαιτίας της αφθονίας των βιοενεργών συστατικών του. Πρόκειται για ένα αιθαλές φυτό που ανήκει στην κατηγορία των Χειλανθών και διαθέτει αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και χημειοπροστατευτική δράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης φύλλων δενδρολίβανου, της συμβατικής εκχύλισης, της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα και της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. Κατόπιν, ελέγχθηκε και ο συνδυασμός της συμβατικής με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση. Τα δείγματα διαφοροποιούνταν ως προς το διαλύτη (διαφορετικές περιεκτικότητες νερού-αιθανόλης στις δύο πρώτες μεθόδους και χρήση, κατάλληλου για το κάθε ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα) και το χρόνο της εκχύλισης ( $t=0-24h$ ). Επιπλέον, όσον αφορά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, έγινε χρήση πηκτινάσης, κυτταρινάσης, ημικυτταρινάσης και πρωτεάσης, καθώς τα ένζυμα αυτά θεωρείται ότι μειώνουν ή καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών με αποτέλεσμα να διευκολύνουν την εκχύλιση, κάτω από ήπιες και φιλικές προς το περιβάλλον συνθήκες.

Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες αναλύσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η περιεκτικότητά τους σε ολικές φαινολικές ενώσεις, ολικά φλαβονοειδή και ολικές συμπυκνωμένες τανίνες. Οι φαινολικές ενώσεις μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Τα ολικά φλαβονοειδή προσδιορίστηκαν με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου, ενώ οι ολικές συμπυκνωμένες τανίνες με τη μέθοδο της οξινομένης βανιλίνης. Και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα κατεχίνης.

Σύμφωνα με τις παραπάνω μεθόδους προέκυψε ότι το δείγμα που εμφάνισε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ήταν αυτό που προήλθε από συμβατική

εκχύλιση με χρήση 95% EtOH ( $IC_{50}=12,1\frac{\mu g}{mL}$ ). Παραπλήσια τιμή, βέβαια, παρατηρήθηκε και στο δείγμα που προήλθε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση για  $t=5h$ , με χρήση πηκτινάσης, ( $IC_{50}=13,2\frac{\mu g}{mL}$ ). Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή και τις συμπυκνωμένες τανίνες, αυτά εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά. Συγκρίνοντας τις τρεις μεθόδους, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις εμφάνισε το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH ( $TPC=2998\frac{\mu g_{gallia}}{mL}$ ), με παρόμοιες τιμές να εμφανίζουν τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με τη χρήση πηκτινάσης ή πρωτεάσης για  $t=5h$ . Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, και συγκεκριμένα η προεπεξεργασία με πηκτινάση για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$ , αποδείχθηκε ότι ενισχύει τόσο την αντιοξειδωτική δράση ( $IC_{50}=14,3\frac{\mu g}{mL}$ ), όσο και το περιεχόμενο σε βιοενεργές ενώσεις ( $TPC=4071\frac{\mu g_{gallia}}{mL}$  κατά μέσο όρο,  $TFC=2540\frac{\mu g_{catechin}}{mL}$  και  $TCT=600\frac{\mu g_{catechin}}{mL}$ ).

Η διπλωματική εργασία περιλάμβανε, επίσης, την ταυτοποίηση των συστατικών πέντε διαφορετικών εκχυλισμάτων (συμβατική εκχύλιση με 50% και 95% EtOH για  $t=24h$ , εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με 50% EtOH για  $t=1h$ , ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με πηκτινάση για  $t=5h$  και προεπεξεργασία με πηκτινάση για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$ ) με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Προκειμένου αυτό να καταστεί εφικτό, έγινε προσπάθεια δημιουργίας μίας βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων. Οι πρότυπες ουσίες και τα δείγματα των εκχυλισμάτων πριν οδηγηθούν προς ανάλυση, υποβλήθηκαν σε παραγωγοποίηση με διαλύτη το αντιδραστήριο BSTFA, ώστε να μετατραπούν σε πτητικά σιλυλιωμένα παράγωγα.

Τέλος, δύο εκχυλίσματα (συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$  και ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με πηκτινάση για  $t=5h$ ) ενσωματώθηκαν σε καλλυντικά σκευάσματα της εταιρίας Korres, ώστε να πραγματοποιηθούν τεστ σταθερότητας, διάρκειας ενός μήνα. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ακραίες θερμοκρασίες και ελέγχονταν ως προς την τιμή του pH, του ιξώδους, τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά τους έπειτα από φυγοκέντρηση. Η πορεία των δειγμάτων κρίθηκε ικανοποιητική καθώς δεν παρουσιάστηκαν έντονες διαφορές συγκριτικά με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που είχαν ληφθεί πριν αυτά υποβληθούν στα τεστ σταθερότητας.

**Λέξεις-κλειδιά:** Δενδρολίβανο, εκχύλιση, ένζυμα, φαινολικά, αντιοξειδωτικά, μικροκύματα, αέρια χρωματογραφία

# Abstract

---

Plant extracts constitute a rich source of natural products, such as phenolic acids, polyphenols and flavonoids and possess a remarkable antioxidant activity. As a result, they are becoming increasingly important in the prevention of diseases (such as cancer and neurodegenerative syndromes), that are related with the excessive production of reactive oxygen species and with oxidative stress. *Rosmarinus officinalis L.* is a perennial herb that belongs to the Lamiaceae family. It possesses a variety of antioxidant, anti-tumoral, antibacterial, chemoprotective and anti-inflammatory bioactivities, thus being widely used in pharmaceutical, cosmetic and food industry.

The present thesis focuses on the evaluation of three different extraction methods of rosemary leaves, the conventional extraction, the microwave assisted extraction and the enzyme assisted extraction. Afterwards, the combination of the conventional and the enzyme-assisted extraction was tested. The samples were differentiated with respect to the solvent (different water-ethanol contents in the first two methods and suitable, for each enzyme, buffer) and the extraction time ( $t = 0-24\text{h}$ ). In addition, as far as the enzyme assisted extraction is concerned, pectinase, cellulase, hemicellulase and protease have been used, as these enzymes are thought to weaken or degrade the integrity of the cell walls of the plants, thereby easing the extraction under mild and environmentally friendly conditions.

In order to evaluate the effectiveness of each method, different techniques were applied. In particular, the antioxidant activity of the extracts was measured with the DPPH<sup>•</sup> radical scavenging assay. Subsequently, the content of total phenolic compounds, total flavonoids and total condensed tannins was evaluated. The phenolic compounds were measured by the Folin-Ciocalteu method and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAEs). Total flavonoids were determined by the aluminium-flavonoid complexation method, while the total condensed tannins were determined using the acidified vanillin method. In both cases the samples were expressed as catechin equivalents.

According to the above methods, it was found that the sample with the best antioxidant activity was the one that derived from conventional extraction using 95% EtOH ( $IC_{50} = 12,1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ). A similar value, was also observed in the sample derived from enzyme assisted extraction for  $t = 5\text{h}$ , using pectinase ( $IC_{50} = 13,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ). Regarding phenolic compounds, flavonoids and concentrated tannins, they showed similar behavior. By comparing the three methods, a higher

content of total phenolic compounds showed the sample obtained by conventional extraction with 50% EtOH (TPC =  $2998 \frac{\mu\text{g gallic}}{\text{mL}}$ ), while similar values showed the samples extracted with pectinase or protease for  $t = 5\text{h}$ . However, the combination of the two methods, and especially the pretreatment with pectinase for  $t = 1\text{h}$ , followed by conventional extraction with 50% EtOH for  $t=24\text{h}$ , seemed to enhance both the antioxidant effect ( $\text{IC}_{50} = 14,3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ) and the content of bioactive compounds (TPC= $4071 \frac{\mu\text{g gallic}}{\text{mL}}$  on average, TFC= $2540 \frac{\mu\text{g catechin}}{\text{mL}}$  and TCT =  $600 \frac{\mu\text{g catechin}}{\text{mL}}$ ).

This thesis also included the identification of the components of five different extracts (conventional extraction with 50% and 95% EtOH for  $t = 24\text{h}$ , microwave assisted extraction with 50% EtOH for  $t = 1\text{h}$ , enzyme assisted extraction with pectinase for  $t = 5\text{h}$  and pre-treatment with pectinase for  $t = 1\text{h}$ , followed by conventional extraction with 50% EtOH for  $t = 24\text{h}$ ) using gas chromatography hyphenated with mass spectrometry (GC-MS). To make this possible, an attempt was made to create a preliminary library of spectra of some standard compounds. It is also worth noticing that, before GC-MS, the pure compounds as well as the extraction samples were subjected to derivatization with BSTFA in order to be transformed to the corresponding volatile derivatives.

Finally, two extracts (conventional extraction with 50% EtOH for  $t = 24\text{h}$  and enzymatically assisted pectinase extraction for  $t = 5\text{h}$ ) were incorporated into cosmetic formulations of Korres company, thus carrying out stability tests for one month. The samples were subjected to extreme temperatures and tested as for their pH value, viscosity value, organoleptic characteristics and behavior after centrifugation. The performance of the samples was considered satisfactory as there were no significant differences compared to the results obtained before the stability tests took place.

**Keywords:** Rosemary, extraction, enzymes, phenols, antioxidants, microwave, GC-MS



# Περιεχόμενα

---

Πρόλογος .....	3
Περίληψη .....	5
Abstract.....	7
Περιεχόμενα.....	9
Συντομογραφίες .....	12
Ευρετήριο πινάκων.....	13
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	16
Ευρετήριο εικόνων .....	18
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>20</b>
<b>Εισαγωγή.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Το δενδρολίβανο .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Χαρακτηριστικά .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Χημική σύσταση .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την χημική σύσταση .....	26
<b>1.3 Βιολογικές δράσεις-Θεραπευτικές ιδιότητες .....</b>	<b>26</b>
<b>2. Εκχύλιση.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Τεχνικές εκχύλισης .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Παράμετροι εκχύλισης .....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Παράμετροι.....	29
2.2.2 Επιλογή διαλύτη .....	29
<b>2.3 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Συμβατική εκχύλιση υγρού-στερεού .....	31
<b>2.4 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης.....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα .....	31
2.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	31
2.4.1.2 Παράμετροι εκχύλισης.....	32
2.4.1.3 Επιλογή διαλύτη.....	33
2.4.1.4 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα .....	34
2.4.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση .....	35
2.4.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	35
2.4.2.2 Παράμετροι εκχύλισης.....	37
2.4.2.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα .....	38
2.4.2.4 Είδη ενζύμων.....	40
<b>3. Αντιοξειδωτικά .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Ελεύθερες ρίζες.....</b>	<b>45</b>

<b>3.2 Γενικά χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικών .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Είδη αντιοξειδωτικών .....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Φυσικά-συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	47
3.3.2 Πρωτοταγή-δευτεροταγή αντιοξειδωτικά.....	48
3.3.2.1 Γενικά .....	48
3.3.2.2 Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά.....	48
3.3.2.3 Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά.....	49
<b>3.4 Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Παράμετροι αντιοξειδωτικής δράσης.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 Αντιοξειδωτική δράση δενδρολίβανου .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης .....</b>	<b>51</b>
3.7.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	51
3.7.2 Μέθοδος DPPH .....	52
3.7.2.1 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα της μεθόδου DPPH .....	53
<b>4. Φαινολικές ενώσεις .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Γενικά χαρακτηριστικά .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Ταξινόμηση φαινολών.....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Φαινολικά οξέα.....	56
4.2.1.1 Ροσμαρινικό οξύ .....	57
4.2.1.2 Καρνοσικό οξύ.....	59
4.2.2 Φλαβονοειδή .....	60
4.2.2.1 Μέθοδος εκτίμησης φλαβονοειδών .....	62
4.2.3 Τανίνες .....	63
4.2.3.1 Μέθοδος εκτίμησης συμπυκνωμένων τανινών .....	63
<b>4.3 Βιοσύνθεση φαινολών .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4 Ιδιότητες φαινολών .....</b>	<b>65</b>
4.4.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολών .....	66
4.4.1.1 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών .....	66
<b>4.5 Μέθοδοι εκτίμησης φαινολικών ενώσεων .....</b>	<b>68</b>
4.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	68
4.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	68
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>70</b>
<b>5. Πειραματική μεθοδολογία.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 Υλικά, αντιδραστήρια και συσκευές.....</b>	<b>71</b>
5.2.1 Συμβατική εκχύλιση .....	73
5.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα .....	74
5.2.3 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση .....	75
5.2.4 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης .....	78
<b>5.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....</b>	<b>79</b>
5.3.1 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού .....	79
5.3.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης - δοκιμή DPPH.....	80
5.3.3 Μέτρηση ολικών φαινολικών - μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	81
5.3.4 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών – χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου.....	82

5.3.5 Προσδιορισμός ολικών συμπυκνωμένων τανινών- μέθοδος βανιλίνης- υδροχλωρίου.....	83
5.3.6 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	84
5.3.6.1 Παραγωγοποίηση .....	84
5.3.6.2 Μέθοδος GC-MS .....	85
<b>5.4 Δημιουργία καλλυντικής κρέμας- Δοκιμές σταθερότητας .....</b>	<b>86</b>
5.4.1 Σκοπός δοκιμών σταθερότητας .....	86
5.4.2 Δημιουργία καλλυντικής κρέμας .....	87
5.4.3 Δοκιμές σταθερότητας – Stability tests .....	90
<b>6. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 Συμβατική εκχύλιση και ΜΑΕ .....</b>	<b>92</b>
6.1.1 Αντιοξειδωτική δράση .....	92
6.1.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις .....	97
6.1.3 Ολικά φλαβονοειδή .....	99
6.1.4 Ολικές συμπυκνωμένες τανίνες.....	101
<b>6.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση .....</b>	<b>104</b>
6.2.1 Αντιοξειδωτική δράση .....	104
6.2.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις .....	107
<b>6.3 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης .....</b>	<b>114</b>
6.3.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις .....	114
6.3.2 Ανάλυση βέλτιστου εκχυλίσματος.....	116
6.3.2.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	116
6.3.2.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις .....	118
6.3.2.3 Ολικά φλαβονοειδή .....	119
6.3.2.4 Ολικές συμπυκνωμένες τανίνες .....	119
<b>6.4 Μελέτη κινητικής .....</b>	<b>120</b>
<b>6.5 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS) .....</b>	<b>125</b>
6.5.1 Δημιουργία βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων .....	125
6.5.2 Ανάλυση εκχυλισμάτων .....	126
<b>6.6 Δοκιμές σταθερότητας στην καλλυντική κρέμα .....</b>	<b>129</b>
<b>Συμπεράσματα - Προοπτικές .....</b>	<b>133</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>136</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>144</b>

# Συντομογραφίες

---

- RA: ροσμαρινικό οξύ (rosmarinic acid)
- CA: καρνοσικό οξύ (carnosic acid)
- MAE: εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (microwave assisted extraction)
- EAE: ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (enzyme assisted extraction)
- OS: οξειδωτικό στρες (oxidative stress)
- ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species)
- RNS: δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species)
- RSS: δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species)
- DPPH: 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζίλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- BHT: βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (Butylated HydroxyToluene)
- BHA: βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (Butylated HydroxyAnisole)
- PAL: αμμωνιακή λύση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia-lyase)
- TAL: αμμωνιακή λύση της τυροσίνης (tyrosine ammonia-lyase)
- F-C: Folin-Ciocalteu
- TMS: τριμεθυλοσιλυλιωμένο (trimethylsilyl)
- RT: χρόνος ανάσχεσης (retention time)
- BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

# Ευρετήριο πινάκων

---

Πίνακας 1: ταξινόμηση δενδρολίβανου.....	23
Πίνακας 2: συστατικά δενδρολίβανου.....	24
Πίνακας 3: οι πιο κοινοί διαλύτες και τα αντίστοιχα προϊόντα εκχύλισης.....	30
Πίνακας 4: φυσικές παράμετροι ορισμένων διαλυτών που χρησιμοποιούνται συχνά στη ΜΑΕ.....	34
Πίνακας 5: Ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση διάφορων προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα.....	41
Πίνακας 6: κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.....	55
Πίνακας 7:χημική δομή κύριων κατηγοριών φλαβονοειδών.....	61
Πίνακας 8: Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα όργανα και συσκευές.....	71
Πίνακας 9:Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα υλικά και αντιδραστήρια.....	72
Πίνακας 10: Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα.Για την ενεργότητα των ενζύμων.....	75
Πίνακας 11: Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στη ΜΑΕ.....	77
Πίνακας 12: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της αντιοξειδωτικής δράσης.....	92
Πίνακας 13: Τα δεδομένα για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος.....	93
Πίνακας 14: Τα δεδομένα για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων.....	94
Πίνακας 15: Οι τιμές IC <sub>50</sub> των δειγμάτων που προέκυψαν από τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.....	95
Πίνακας 16: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος.....	97
Πίνακας 17: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	98
Πίνακας 18: Οι ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	98
Πίνακας 19: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης.....	100
Πίνακας 20: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	100
Πίνακας 21: Τα ολικά φλαβονοειδή (TFC) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	101
Πίνακας 22: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης.....	102
Πίνακας 23: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	102
Πίνακας 24: Οι ολικές συμπυκνωμένες τανίνες (TCT) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από ΜΑΕ.....	103

Πίνακας 25: Η ονοματολογία των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία .....	104
Πίνακας 26: Οι τιμές των συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων απορροφήσεων για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση .....	105
Πίνακας 27: Οι τιμές IC <sub>50</sub> των δειγμάτων που προέκυψαν από την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και η (%) βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης συγκριτικά με τα τυφλά δείγματα .....	106
Πίνακας 28: Οι τιμές των απορροφήσεων για τα δείγματα που προέκυψαν από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.....	108
Πίνακας 29: Οι ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) των δειγμάτων που προέκυψαν από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.....	108
Πίνακας 30: Οι τιμές των TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για t=1-24h .....	110
Πίνακας 31: Οι τιμές της απορρόφησης για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, σε διαφορετικές συνθήκες.....	111
Πίνακας 32: Οι τιμές του TPC για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, σε διαφορετικές συνθήκες .....	112
Πίνακας 33: Οι τιμές της απορρόφησης, του TPC και της (%) ενίσχυσης του TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση .....	114
Πίνακας 34: Οι τιμές της απορρόφησης, του TPC και της (%) ενίσχυσης του TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση .....	115
Πίνακας 35: Οι τιμές των συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων απορροφήσεων για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM.....	117
Πίνακας 36: Οι τιμές IC <sub>50</sub> για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM .....	117
Πίνακας 37: Οι τιμές της απορρόφησης και του TPC για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM.....	118
Πίνακας 38: Οι τιμές της απορρόφησης και του TFC για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM.....	119
Πίνακας 39: Οι τιμές της απορρόφησης και του TCT για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM.....	119
Πίνακας 40: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης .....	121
Πίνακας 41: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης .....	122
Πίνακας 42: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης .....	123
Πίνακας 43: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης .....	125
Πίνακας 44: Τα αποτελέσματα από τα φάσματα μάζας για τις πρότυπες ενώσεις .....	125
Πίνακας 45: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα αρχικά δείγματα.....	129
Πίνακας 46: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=5°C .....	130
Πίνακας 47: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=5°C .....	130
Πίνακας 48: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=40°C.....	131

Πίνακας 49: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=50°C.....	131
Πίνακας 50: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το δείγμα α που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C.....	132
Πίνακας 51: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το δείγμα β που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C.....	132
Πίνακας 52: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το τυφλό δείγμα που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C .....	132

# Ευρετήριο διαγραμμάτων

---

Διάγραμμα 1: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για το γαλλικό οξύ .....	93
Διάγραμμα 2: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για τα δείγματα που προέκυψαν από τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα....	95
Διάγραμμα 3: Το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) σε σχέση με το χρόνο για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση .....	109
Διάγραμμα 4: Το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε τροποποιημένες συνθήκες.....	112
Διάγραμμα 5: το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) του δείγματος που υποβλήθηκε σε ενζυμική εκχύλιση ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση.....	115
Διάγραμμα 6: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που υποβλήθηκε σε EAE για $t=1\text{h}$ , ακολουθούμενη από CEM για $t=24\text{h}$ .....	117
Διάγραμμα 7: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35). (●) Alcalase 2.4 L FG, (○) Cellic CTec2, (▲) Viscozyme L, (Δ) Cellic HTec2, (▼) Bioprep 3000L .....	121
Διάγραμμα 8: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35). (●) pH=5.0, (○) pH=8.0.....	122
Διάγραμμα 9: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35). (●) 25 $\mu\text{L}$ πηκτινάσης, (○) 50 $\mu\text{L}$ πηκτινάσης, (▲) 25 $\mu\text{L}$ πηκτινάσης (1 h) + CEM, (Δ) 50 $\mu\text{L}$ πηκτινάσης (1 h) + CEM .....	123
Διάγραμμα 10: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35). (●) Συμβατική εκχύλιση (50% αιθανόλη), (○) EAE + CEM .....	124
Διάγραμμα 11: Η καμπύλη αναφοράς DPPH .....	145
Διάγραμμα 12: Η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος .....	145
Διάγραμμα 13: Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης για τη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών.....	146
Διάγραμμα 14: Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης για τη μέτρηση των ολικών συμπυκνωμένων τανινών.....	146
Διάγραμμα 15: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ε το ένζυμο 1 για $t=1\text{h}$ .....	147
Διάγραμμα 16: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 2 για $t=1\text{h}$ .....	147
Διάγραμμα 17: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}} - \Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 3 για $t=1\text{h}$ .....	148



Διάγραμμα 18: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 4 για $t=1\text{h}$ .....	148
Διάγραμμα 19: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 5 για $t=1\text{h}$ .....	149
Διάγραμμα 20: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 1 για $t=5\text{h}$ .....	149
Διάγραμμα 21: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 2 για $t=5\text{h}$ .....	150
Διάγραμμα 22: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 3 για $t=5\text{h}$ .....	150
Διάγραμμα 23: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 4 για $t=5\text{h}$ .....	151
Διάγραμμα 24: Το διάγραμμα $C_{\text{antiox}}$ - $\Delta C_{\text{DPPH}}$ για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 5 για $t=5\text{h}$ .....	151

# Ευρετήριο εικόνων

---

Εικόνα 1: Το δενδρολίβανο χωρίς άνθη.....	22
Εικόνα 2: Το δενδρολίβανο με άνθη.....	22
Εικόνα 3: Η γεωγραφική κατανομή πτητικών συστατικών δενδρολίβανου σε διάφορες βαλκανικές χώρες .....	23
Εικόνα 4: Χημική δομή των κύριων συστατικών του δενδρολίβανου.....	25
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της MAE σε εργαστηριακή κλίμακα.....	32
Εικόνα 6: Τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών .....	36
Εικόνα 7: εικόνα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του κυτταρικού τοιχώματος ενός φυτού 1) χωρίς επεξεργασία 2)μετά από επεξεργασία με ένζυμο.....	37
Εικόνα 8: Η χημική δομή της κυτταρίνης.....	42
Εικόνα 9: Η χημική δομή της ημικυτταρίνης.....	43
Εικόνα 10: Η χημική δομή της πηκτίνης.....	43
Εικόνα 11: Η ηλεκτρονιακή δομή δραστικών ειδών οξυγόνου (το κόκκινο υποδηλώνει ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο).....	46
Εικόνα 12: κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών.....	47
Εικόνα 13: η δομή της ρίζας DPPH' .....	52
Εικόνα 14: Η αρχή της ικανότητας δέσμευσης των ριζών DPPH' .....	53
Εικόνα 15: βασική χημική δομή φαινόλης.....	54
Εικόνα 16: Η χημική δομή του κινναμωμικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος αντίστοιχα.....	57
Εικόνα 17: Ο προτεινόμενος μηχανισμός βιοσύνθεσης του ροσμαρινικού οξέος.....	58
Εικόνα 18:: Οι δομές των κύριων και των δευτερευόντων φαινολικών διτερπενίων στα εκχυλίσματα δενδρολίβανου.....	60
Εικόνα 19: Ο μηχανισμός μεθόδου βανιλίνης για τον προσδιορισμό των συμπυκνωμένων τανινών.....	64
Εικόνα 20: Η βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διάφορα μονοπάτια.....	64
Εικόνα 21: Η παραγωγή φαινολικών οξέων από φαινυλαλανίνη και τυροσίνη ..	65
Εικόνα 22: Ο μηχανισμός σύζευξης φαινολών με χηλικά μέταλλα .....	67
Εικόνα 23: Το αντιδραστήριο F-C.....	69
Εικόνα 24: Τα αποξηραμένα φύλλα δενδρολίβανου πριν αυτά οδηγηθούν σε τεμαχισμό .....	73
Εικόνα 25: Τα δείγματα έπειτα από συμβατική εκχύλιση (από αριστερά προς τα δεξιά- περιεκτικότητα διαλύτη: 100% H <sub>2</sub> O, 50% EtOH, 70% EtOH και 95% EtOH) .....	73
Εικόνα 26: Η διήθηση των δειγμάτων έπειτα από MAE .....	74
Εικόνα 27: Ο διαχωρισμός δειγμάτων έπειτα από EAE για 24h (αριστερά: διήθημα, δεξιά: υπερκείμενο). Στη δεξιά φωτογραφία φαίνονται από αριστερά προς δεξιά τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με τα ακόλουθα ένζυμα: 5,1,3,4,276	

Εικόνα 28: Τα δείγματα μετά την τοποθέτησή τους σε φυγόκεντρο (ανοιχτόχρωμα εμφανίζονται τα δείγματα που έχει γίνει προσθήκη αιθανόλης, ενώ σκουρόχρωμα αυτά που ως διαλύτη έχουν μόνο νερό) .....	77
Εικόνα 29: Τα δείγματα που συλλέγονταν ανά 1h (τα σκουρόχρωμα είναι τα δείγματα μετά από 1h ΕΑΕ, ενώ τα υπόλοιπα είναι από τη συμβατική εκχύλιση που ακολούθησε) .....	79
Εικόνα 30: Οι χρωματικές διαφοροποιήσεις των δειγμάτων μετά το πέρας των $t=30\text{min}$ , ανάλογα με τη συγκέντρωση (από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται το δείγμα σε συγκέντρωση: $C_0$ , $0.8C_0$ , $0.6C_0$ και $0.4C_0$ ).....	80
Εικόνα 31: Τα δείγματα μετά από $t=1\text{h}$ επώαση (ο μπλε χρωματισμός αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης φαινολικών στο δείγμα, οπότε από αριστερά προς δεξιά αυξάνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικά) .....	82
Εικόνα 32: Η αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA.....	85
Εικόνα 33: Τα δείγματα που προήλθαν από συμβατική εκχύλιση και ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, αντίστοιχα, μετά την υποβολή τους σε freeze-drying .....	87
Εικόνα 34: Το δείγμα κατά την παρασκευή της υδατικής φάσης.....	88
Εικόνα 35: Το δείγμα πριν οδηγηθεί προς γαλακτωματοποίηση.....	88
Εικόνα 36: Το δείγμα μετά τη γαλακτωματοποίηση.....	89
Εικόνα 37: Η τελική εμφάνιση της καλλυντικής κρέμας μετά την προσθήκη όλων των συστατικών .....	89
Εικόνα 38: Οι δύο καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν στην εταιρία, μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων δενδρολίβανου.....	90
Εικόνα 39: Τα δείγματα μετά από την τοποθέτησή τους στις διάφορες θερμοκρασίες. Είναι εμφανής η χρωματική τους διαφορά. ....	90
Εικόνα 40: Οι μετρήσεις στις οποίες υποβλήθηκαν τα δείγματα. Από αριστερά προς δεξιά: φυγόκέντρωση, μέτρηση pH και μέτρηση ιξώδους.....	91
Εικόνα 41: Τα χρωματογραφήματα των πέντε εκχυλισμάτων .....	127
Εικόνα 42: Η ταυτοποίηση του γαλλικού οξέος στα εκχυλίσματα .....	152
Εικόνα 43: Το φάσμα μάζας του γαλλικού οξέος.....	152
Εικόνα 44: Η ταυτοποίηση του βενζοϊκού οξέος στα δείγματα.....	152
Εικόνα 45: Η ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος στα δείγματα.....	153
Εικόνα 46: Το φάσμα μάζας του καφεϊκού οξέος.....	153
Εικόνα 47: Η ταυτοποίηση του p-κουμαρικού οξέος στα δείγματα.....	153
Εικόνα 48: Το φάσμα μάζας του p-κουμαρικού οξέος.....	154
Εικόνα 49: Η ταυτοποίηση του αβιετικού οξέος .....	154
Εικόνα 50: Η ανίχνευση του ροσμαρινικού οξέος.....	155
Εικόνα 51: Το φάσμα μάζας του ροσμαρινικού οξέος.....	155
Εικόνα 52: Η ανίχνευση του 12-O-μεθυλο-καρνοσικού οξέος.....	155

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

# Εισαγωγή

---

Τα βότανα και τα φυτά αποτελούν φυσικές, ανεξάντλητες πηγές βιολογικά ενεργών ενώσεων, όπως πολυφαινολών και φλαβονοειδών, και είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν προς όφελος του ανθρώπινου οργανισμού. Για αυτό το λόγο, τις τελευταίες δεκαετίες, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών από φυτικές πηγές.

Η Ελλάδα είναι μία χώρα της οποίας το κλίμα ευνοεί την ανάπτυξη της χλωρίδας. Μέρος της χλωρίδας αυτής αποτελούν τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* (Χειλανθή). Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών του δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.), ενός φυτού της οικογένειας των Χειλανθών. Το δενδρολίβανο περιλαμβάνει πληθώρα βιολογικά ενεργών ενώσεων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ευρέως. Μάλιστα, το ροσμαρινικό οξύ, που αποτελεί το κύριο συστατικό του δενδρολίβανου μαζί με το καρνοσικό οξύ, θεωρούνται ιδιαίτερα βιοδραστικά συστατικά και εμφανίζουν ποικιλία δραστηριοτήτων, όπως ισχυρή αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Ως αποτέλεσμα, το δενδρολίβανο αποτελεί ένα φυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Αυτό εμφανίζεται είτε με τη μορφή εκχυλίσματος είτε με τη μορφή αιθέριου ελαίου.

Με βάση τα προαναφερθέντα, σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών από εκχυλίσματα δενδρολίβανου, η διαπίστωση της παρουσίας φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και τανινών και η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, διερευνώνται διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης, όπως η συμβατική εκχύλιση, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και ο συνδυασμός των παραπάνω, με σκοπό την επίτευξη της ανάκτησης, όσο το δυνατόν, περισσότερων βιοενεργών ενώσεων. Μάλιστα, προσοχή δίνεται και σε ορισμένες παράμετρους, όπως ο χρόνος και η επιλογή του διαλύτη, προκειμένου να διαπιστωθεί πως αυτές επηρεάζουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Επιπρόσθετα, τα εκχυλίσματα αναλύονται με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS), με σκοπό την ταυτοποίηση των ενώσεων που εμπεριέχονται σε αυτά. Τέλος, τα δείγματα με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και περιεκτικότητα σε φαινολικά, ενσωματώνονται σε καλλυντικό σκεύασμα της εταιρίας KOPPEΣ, προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα απαραίτητα τεστ σταθερότητας και να διαπιστωθεί αν αυτά θα είχαν τη δυνατότητα, με περαιτέρω μελέτη, να ενταχθούν σε κάποιο καλλυντικό προϊόν.

# 1. Το δενδρολίβανο

---

## 1.1 Χαρακτηριστικά

Το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.), γνωστό και ως αρισμαρί, είναι ένα αειθαλές, θαμνώδες βότανο, που φτάνει το ύψος των 1,5 μέτρων και έχει μεγάλη διάκριση ζωής.<sup>[1]</sup> Τα φύλλα του είναι μικρά, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων του έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και το χρώμα τους μπορεί να είναι μωβ, κυανόλευκο ή και λευκό. Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από πότισμα και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχύδεις ορεινές περιοχές καθώς πρόκειται για ένα πολύ ανθεκτικό φυτό, που προσαρμόζεται πολύ εύκολα στην περιοχή που φύτευται και αντέχει ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε όξινα όσο και σε αλκαλικά εδάφη (pH=4,5-8,7). Έρευνες βέβαια δείχνουν ότι καλύτερη απόδοση και μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριου έλαιου εμφανίζονται σε εδάφη με ουδέτερο pH (pH=6-7) αλλά και με υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο.

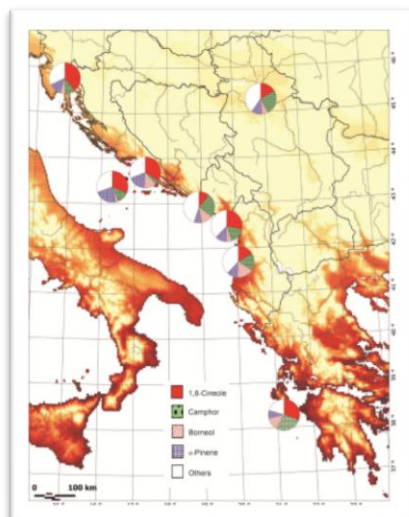


Εικόνα 1: Το δενδρολίβανο χωρίς άνθη



Εικόνα 2: Το δενδρολίβανο με άνθη

Το δενδρολίβανο έχει μέτριες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία.<sup>[2, 3]</sup> Το όνομα του δενδρολίβανου προέρχεται από τις λατινικές λέξεις *ros* (δροσιά) και *marinus* (θάλασσα) και σημαίνει "δροσιά της θάλασσας".<sup>[4]</sup> Το φυτό αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη, στην Ασία και στην Αφρική και αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς στις Μεσογειακές χώρες. Κύριοι παραγωγοί δενδρολίβανου θεωρούνται η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Τουρκία, η Αίγυπτος, η Γαλλία, η Πορτογαλία και η Νότια Αφρική. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χημική του σύσταση παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή στην οποία βρίσκεται.<sup>[5]</sup> Οι δύο βασικές μορφές αυτού είναι φρέσκο και αποξηραμένο. Συχνή βέβαια είναι και η σύνθεση του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου, το οποίο έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια.<sup>[3]</sup>



Εικόνα 1: Η γεωγραφική κατανομή πτητικών συστατικών δενδρολίβανου σε διάφορες βαλκανικές χώρες<sup>[6]</sup>

Το δενδρολίβανο ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, η οποία περιλαμβάνει περίπου 200 γένη και 6900-7200 είδη. Τα φυτά που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι συνήθως αρωματικά σε όλα τα μέρη τους και πολλά από αυτά, όπως το δενδρολίβανο, η μέντα, ο βασιλικός, το φασκόμηλο και η ρίγανη, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη μαγειρική.<sup>[7]</sup> Η οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) αποτελεί μία πολύ σημαντική ομάδα αρωματικών φυτών, καθώς τα είδη της περιέχουν σημαντικές ποσότητες ισχυρών αντιοξειδωτικών.<sup>[8]</sup> Στον παρακάτω πίνακα καταγράφεται η ακριβής ταξινόμηση του δενδρολίβανου:

Πίνακας 1: ταξινόμηση δενδρολίβανου<sup>[4]</sup>

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Υποβασίλειο	Τραχεοφυτά (Tracheobionta)
Υπερδιαίρεση	Σπερματοφύτα (Spermatophyta)
Διαίρεση	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Κλάση	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Υποκλάση	Αστερίδες (Asteridae)
Τάξη	Λαμιώδη (Lamiales)
Οικογένεια	Χειλανθή (Lamiaceae)
Γένος	Rosmarinus L.
Είδος	Officinalis
Δινομικό όνομα	Rosmarinus officinalis



Από την αρχαιότητα, γινόταν χρήση του δενδρολίβανου σε διαφορετικούς τύπους τροφίμων, με σκοπό τη βελτίωση της γεύσης τους και των οργανοληπτικών τους ιδιοτήτων.<sup>[3]</sup> Αποτελούσε επιπλέον σημαντικό βότανο, καθώς χρησιμοποιούνταν ως αντισηπτικό και συντηρητικό τροφίμων πριν από την εφεύρεση της ψύξης.<sup>[2]</sup> Στην αρχαία Ελλάδα και στη Ρώμη χρησιμοποιούνταν ως ενισχυτικό της μνήμης, αλλά και ως σύμβολο πιστότητας, καθώς οι άνθρωποι έφεραν μαζί τους ένα κλαδί από δενδρολίβανο ως ένδειξη πίστης. Από τότε, αυτό συνεχίζει να χρησιμοποιείται ευρέως, ενώ το 2001 ονομάστηκε «βότανο της χρονιάς» από τη Διεθνή Ένωση Βοτανοθεραπείας.<sup>[4]</sup>

## 1.2 Χημική σύσταση

Τα βιοενεργά συστατικά του δενδρολίβανου διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: το πτητικό κλάσμα και τις φαινολικές ενώσεις.<sup>[5, 9-13]</sup> Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η καμφορά, και η 1,8-κινεόλη, ακολουθούμενες από βορνεόλη, βερβενόνη, α-πινένιο και καμφένιο.<sup>[3, 4]</sup> Τα φαινολικά συστατικά αποτελούνται κυρίως από πολυφαινολικά οξέα όπως το ροσμαρινικό οξύ (RA), από φλαβονοειδή, όπως η λουτεολίνη και από ορισμένες διτερπενοειδείς ενώσεις, όπως η καρνοσόλη.<sup>[5, 9-13]</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα από τα συστατικά του, όπως η καρνοσόλη, η ροσμανόλη, η επιροσμανόλη, η ροσμαρικινόνη, η γαλδοσόλη και η 7-O-μεθυλο-επιροσμανόλη αποτελούν παράγωγα του καρνοσικού οξέος (CA), και εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των κατεργασιών που υφίσταται το φυτό (όπως η εκχύλιση με πολικούς διαλύτες). Βέβαια, οι ουσίες αυτές είναι συχνά λιγότερο δραστικές συγκριτικά με τη μητρική ένωση.<sup>[8, 14, 15]</sup>

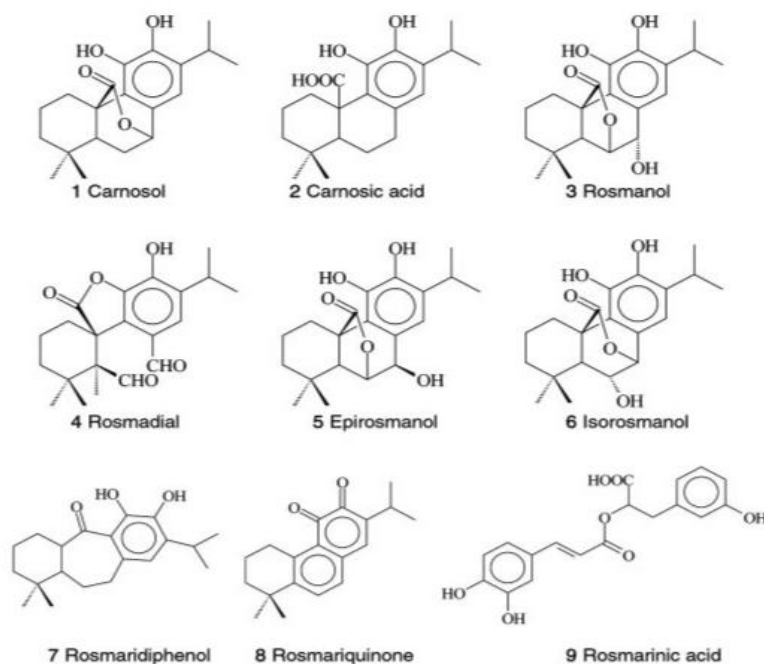
Πίνακας 2: συστατικά δενδρολίβανου<sup>[3,4]</sup>

<b>Συστατικά δενδρολίβανου</b>	
<b>Φλαβονοειδή</b>	απιγενίνη, διοσμίνη, διοσμετίνη, ισπιδουλίνη, λουτεολίνη, σινεσετίνη
<b>Διτερπένια και τριτερπένια</b>	καρνοσικό οξύ, πικροσαβίνη, ροσμαρικινόνη, ολεανικό οξύ, ουρσολικό οξύ, 6-καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμανόλη, ροσμαδιάλη, καρνοσικός μεθυλεστέρας
<b>Συστατικά στο αιθέριο έλαιο</b>	
<b>Μονοτερπενοειδή</b>	α-πινένιο, β-πινένιο, καμφένιο, μυρκένιο, λιμονένιο, α-τερπινένιο, γ-τερπινένιο, παρακυμένιο
<b>Σεσκιτερπένια</b>	β-καρυοφυλλένιο
<b>Μονοτερπενόλες</b>	λιναοόλη, τερπινόλη, α-τερπινεόλη, βορνεόλη, ισοβορνεόλη, cis-θυγανόλη-



	4, trans-θυγανόλη-4, p-κυμεν-8-όλη
<b>Τερπενικοί εστέρες</b>	Οξικό βορνύλιο, οξικό φενχύλιο
<b>Οξείδια τερπενίου</b>	1,8 κινεόλη, οξείδιο καρνοφυλλίνης, εποξειδίο χουμουλενίου I και II
<b>Μη τερπενικές κετόνες</b>	3-εξανόνη, μεθυλο-επτενόνη
<b>Μονοτερπενόνες</b>	καμφορά, βεβρενόνη, καρβόνη

Τα συστατικά που καταγράφονται στον πίνακα βρίσκονται κυρίως στα φύλλα του δενδρολίβανου. Άλλα μέρη, όπως οι ρίζες και τα λουλούδια, έχουν μικρή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Το καρνοσικό οξύ, το οποίο βρίσκεται στους χλωροπλάστες και σε κάποια υποκυτταρικά οργανίδια, εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στα λουλούδια κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού.<sup>[16]</sup> Η ποιότητα και η εμπορική αξία των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου σχετίζονται άμεσα με το φαινολικό κλάσμα και συγκεκριμένα με την περιεκτικότητα σε καρνοσικό και ροσμαρινικό οξύ, τα οποία αποτελούν συστατικά που βρίσκονται σε αφθονία.<sup>[10]</sup> Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου περιέχει κυρίως μονοτερπένια και παράγωγα μονοτερπενίου (95-98%), ενώ το υπόλοιπο (2-5%) είναι σεσκιτερπένια.<sup>[3]</sup>



Εικόνα 2: Χημική δομή των κύριων συστατικών του δενδρολίβανου<sup>[17]</sup>

### 1.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την χημική σύσταση

Έρευνες έχουν δείξει ότι το δενδρολίβανο που αναπτύσσεται κάτω από υδατικό στρες, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό στην περιοχή της Μεσογείου, παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων (καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη) κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης.<sup>[18]</sup> Ακόμη, έχει παρατηρηθεί μία θετική συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης των φαινολικών συστατικών του δενδρολίβανου και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας, αν και η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος στα φύλλα του μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλιακή ακτινοβολία και η θερμοκρασία.<sup>[15, 18]</sup> Υψηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών παρατηρείται, επίσης, κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης του φυτού, εξαιτίας της έντονης κυτταρικής διαίρεσης που λαμβάνει χώρα. Μάλιστα, όταν η ανάπτυξη των φύλλων ολοκληρωθεί, ορισμένα φαινολικά συστατικά όπως το καρνοσικό οξύ εμφανίζονται μειωμένα, γεγονός που αποδεικνύει τη μεταφορά τους στα στελέχη και στα λουλούδια, μέσω του αγγειακού συστήματος. Τέλος, η φαινολική σύνθεση του δενδρολίβανου σχετίζεται άμεσα με τη μέθοδο εκχύλισης και το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται. Στα λιπιδικά συστήματα, τα εκχυλίσματα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά διτερπένια είναι πιο αποτελεσματικά, ενώ στα υδατικά συστήματα ευνοείται η εκχύλιση του ροσμαρινικού οξέος.<sup>[15]</sup>

### 1.3 Βιολογικές δράσεις-Θεραπευτικές ιδιότητες

Το δενδρολίβανο εμφανίζει πληθώρα δράσεων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ευρέως. Αρχικά, είναι γνωστό για την ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση, τις αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές του ιδιότητες, καθώς και τον χημειοπροληπτικό του παράγοντα.<sup>[2]</sup> Χρησιμοποιείται επιπλέον ως αντικαταθλιπτικό,<sup>[11]</sup> αντιμικροβιακό και αντικαρκινικό.<sup>[12]</sup> Συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται κυρίως σε συστατικά όπως το α-πινένιο, η καμφορά, η 1,8 κινεόλη και το οξικό βορνύλιο.<sup>[13]</sup> Όσον αφορά την αντικαρκινική του δράση, έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντικές αντιπολλαπλασιαστικές δραστηριότητες έναντι μίας ποικιλίας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, της λευχαιμίας, του προστάτη, του πνέμονα και του ήπατος. Η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ έχουν εμφανίσει ένα σημαντικό αριθμό *in vitro* και *in vivo* βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως η *in vitro* αντι-μετάσταση σε κύτταρα μελανώματος και η *in vitro* αναστολή της ογκογένεσης σε μοντέλα τρωκτικών.<sup>[19]</sup>

Σύμφωνα με την ESCOP (European Society Cooperative on Phytotherapy), τα εκχυλίσματά του (υδατικά ή αιθανολικά) χρησιμοποιούνται ως κολλαγόνα, διουρητικά, αντιλυτικά, αντινεοπλασματικά και αντιικά.<sup>[5, 14]</sup> Το δενδρολίβανο εμφανίζει επίσης αντιφλεγμονώδη δράση και συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες εξαιτίας της δράσης της καρνοσόλης και του καρνοσικού

οξέος.<sup>[10, 14]</sup> Αυτά τα συστατικά, σε συνδυασμό με τα ισοπρενοειδή (στερόλες, ισοπρένια, μονό και δι-τερπένια, τοκοφερόλες και καροτονοειδή) παίζουν φωτοπροστατευτικό ρόλο και θεωρούνται βιοδραστικά συστατικά.<sup>[9]</sup> Χρησιμοποιείται, ακόμη, για την καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών όπως η ατοπική δερματίτιδα, η νόσος Alzheimer, η παχυσαρκία ή για την φωτοπροστασία των κερατινοκυττάρων.<sup>[20]</sup> Τέλος, εκτός από τη θεραπευτική εφαρμογή, το αιθέριο έλαιο αυτού εφαρμόζεται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικό και αρωματικό σε σαμπουάν, λοσιών για τα μαλλιά, έλαια του μπάνιου, αλοιφές, απολυμαντικά και εντομοκτόνα, αλλά και ως συστατικό για την καταπολέμηση της αρθρίτιδας, των μυϊκών πόνων, των εκζεμάτων, της νευραλγίας, των ρευματισμών, της ισχιαλγίας και της αλλωπεκίας.<sup>[2, 4]</sup>

## 2. Εκχύλιση

---

### 2.1 Τεχνικές εκχύλισης

Η εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων από φυτικά υλικά είναι το πρώτο βήμα για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμακευτικών ή καλλυντικών προϊόντων. Τα φαινολικά συστατικά μπορούν να εξαχθούν από φρέσκα, κατεψυγμένα ή αποξηραμένα δείγματα φυτών. Συνήθως, πριν από την εκχύλιση τα δείγματα επεξεργάζονται είτε με άλεση, λείανση και ομογενοποίηση, είτε με απλή ξήρανση. Η ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε υπό κατάψυξη είτε παρουσία αέρα. Γενικά, η ξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφιλοποίηση) διατηρεί τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών στα φυτά υψηλότερα συγκριτικά με την ξήρανση με αέρα.<sup>[21]</sup>

Η εκχύλιση των φυτικών υλικών μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές, οι οποίες διακρίνονται σε συμβατικές και μη συμβατικές. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται πολλές διεργασίες, όπως η έγχυση, η διαβροχή, η έκπλυση, η εκχύλιση υγρού-υγρού ή υγρού-στερεού και η μέθοδος Soxhlet.<sup>[22]</sup> Οι μη συμβατικές μέθοδοι, οι οποίες είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης χρήσης οργανικών χημικών ουσιών, του μειωμένου χρόνου λειτουργίας και της καλύτερης απόδοσης και ποιότητας του εκχυλίσματος, αναπτύχθηκαν τα τελευταία πενήντα χρόνια. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι υπέρηχοι, τα μικροκύματα, το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα, η ωμική θέρμανση, η χρήση υπερκρίσιμων φθοριούχων διαλυμάτων και οι επιταχυνόμενοι διαλύτες.<sup>[23]</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει διαδικασία εκχύλισης που να θεωρείται κατάλληλη για την εξαγωγή όλων των φαινολικών συστατικών, καθώς τα φυτά μπορούν να περιέχουν από απλά φαινολικά (όπως φαινολικά οξέα και ανθοκυανίνες) έως υψηλές πολυμερισμένες ουσίες (όπως ταννίνες) σε διαφορετικές ποσότητες, οι οποίες μάλιστα συχνά συσχετίζονται με άλλα φυτικά συστατικά (όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες). Ως αποτέλεσμα, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης, αλλά και τις συνθήκες που επιλέγονται κάθε φορά, δίνεται έμφαση στην εκχύλιση μίας (ή ορισμένων) κατηγορίας φαινολικών συστατικών, χωρίς να θεωρείται εφικτή η εξαγωγή όλων των βιοενεργών συστατικών. Ως απόρροια των παραπάνω, συχνά συνίσταται ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων, με σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης των επιθυμητών συστατικών.<sup>[21]</sup>

## 2.2 Παράμετροι εκχύλισης

### 2.2.1 Παράμετροι

Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως ο τύπος του διαλύτη (και η αντίστοιχη πολικότητα αυτού), ο χρόνος εκχύλισης, η θερμοκρασία, ο λόγος του δείγματος προς το διαλύτη, καθώς και η χημική σύνθεση και τα φυσικά χαρακτηριστικά του δείγματος.<sup>[21, 22]</sup> Συνήθως, η αύξηση του χρόνου επιδρά θετικά στην αποτελεσματικότητα του διαλύτη.<sup>[21, 24-26]</sup> Αντίστοιχα, αύξηση στη θερμοκρασία εκχύλισης συνδέεται με αύξηση στη διαλυτότητα και στην ταχύτητα μεταφοράς μάζας. Επιπροσθέτως, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση των διαλυτών μειώνονται με αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που επιτρέπει στους διαλύτες να διειδύσουν στα δείγματα και να αυξήσουν το βαθμό της εκχύλισης. Βέβαια, δεδομένου ότι πολλές φαινολικές ενώσεις υδρολύονται, οξειδώνονται εύκολα ή υφίστανται ανεπιθύμητες δράσεις όπως η ενζυμική αμάρωση, οι δύο αυτές παράμετροι δεν πρέπει να υπερβαίνουν κάποιες τιμές.<sup>[21, 24, 25]</sup> Για παράδειγμα, όσον αφορά τις ανθοκυανίνες, έχει βρεθεί ότι η θερμοκρασία εκχύλισης πρέπει να κυμαίνεται από 20-50°C, καθώς για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70°C προκαλείται ταχεία αποικοδόμηση των ανθοκυανινών. Η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από φυτά επηρεάζεται επίσης από το λόγο του διαλύτη προς στερεό και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος. Η αύξηση του λόγου διαλύτη προς στερεό και η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την απόδοση της εκχύλισης.<sup>[21]</sup>

### 2.2.2 Επιλογή διαλύτη

Η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση πληθώρας διαλυτών, όπως μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ισοπροπανόλη, ακετόνη και μίγματα αυτών με νερό. Η επιλογή του σωστού διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την ποσότητα και το ρυθμό εκχύλισης των φαινολικών συστατικών.<sup>[26]</sup> Για την επιλογή αυτού εξετάζονται διάφοροι παράγοντες, ανάλογα με τις ανάγκες και το επιθυμητό αποτέλεσμα που αναμένεται από την εκχύλιση, όπως:

- Πολικότητα
- Σημείο βρασμού, το οποίο πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα ο διαλύτης από το προϊόν
- Δραστηκότητα, ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με το εκχύλισμα, αλλά ούτε και να διασπάται εύκολα
- Ιξώδες, το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό
- Ασφάλεια κατά τη χρήση, ο διαλύτης δεν πρέπει να είναι εύφλεκτος, τοξικός, αλλά να είναι φιλικός προς το περιβάλλον
- Καταλληλότητα για επαναχρησιμοποίηση

- Κόστος
- Διαθεσιμότητα<sup>[27]</sup>

Οι λιπόφιλες ενώσεις συχνά εκχυλίζονται με μη πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως το εξάνιο ή το διχλωρομεθάνιο. Αντίθετα, υδρόφιλα συστατικά συμπεριλαμβανομένων των λιγνάνων εκχυλίζονται με πολικούς διαλύτες όπως η ακετόνη, η μεθανόλη ή η αιθανόλη.<sup>[28]</sup> Γενικά, επιλέγονται διαλύτες με υψηλή πολικότητα, καθώς είναι πιο αποτελεσματικοί σε σχέση με τους μη πολικούς.<sup>[26]</sup> Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι η μεθανόλη θεωρείται πιο αποτελεσματική για την εκχύλιση φαινολών χαμηλού μοριακού βάρους, η αιθανόλη προτιμάται για την εκχύλιση πολυφαινολών, ενώ οι φλαβονόλες υψηλότερου μοριακού βάρους εκχυλίζονται πιο ικανοποιητικά με τη χρήση μίγματος ακετόνης-νερού. Η χρήση μίγματος αλκοόλης-νερού προτιμάται στην περίπτωση της εκχύλισης φαινολικών οξέων. Όσον αφορά την εκχύλιση φυτικών υλικών πλούσιων σε ανθοκυανίνες, προτιμάται η χρήση οξυσιμένου οργανικού διαλύτη και συνηθέστερα αιθανόλης ή μεθανόλης, καθώς αυτές αποδιατάσσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, εκχυλίζουν τις ανθοκυανίνες και ταυτόχρονα τις σταθεροποιούν.<sup>[21, 25]</sup> Βέβαια, τονίζεται ότι πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις ποσότητες των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, καθώς ορισμένοι, όπως η μεθανόλη, σε αρκετά μεγάλες ποσότητες είναι δυνατό να προκαλέσουν αποσύνθεση κάποιων φαινολικών ενώσεων.<sup>[26]</sup> Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πιο κοινοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοενεργών ουσιών στα φυτά και τα αντίστοιχα προϊόντα που εκχυλίζουν:

Πίνακας 3: οι πιο κοινοί διαλύτες και τα αντίστοιχα προϊόντα εκχύλισης<sup>[28]</sup>

Πολικότητα διαλυτών	Διαλύτης	Προϊόν
<b>Μη πολικοί</b>	Κυκλοεξάνιο, εξάνιο, τολουένιο, βενζόλιο, αιθέρας, χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρας	Αλκαλοειδή, τερπενοειδή, κουμαρίνες, φλαβονοειδή, λιπαρά οξέα
<b>Πολικοί</b>	Ακετόνη, ακετονιτρίλιο, βουτανόλη, προπανόλη, αιθανόλη, μεθανόλη	Φλαβανόλες, λεκτίνες, αλκαλοειδή, ταννίνες, φλαβόνες, πολυφαινόλες, σαπωνίνες

## 2.3 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

### 2.3.1 Συμβατική εκχύλιση υγρού-στερεού

Η συμβατική εκχύλιση είναι μία διεργασία σχεδιασμένη να διαχωρίζει διαλυτές ενώσεις από ένα στερεό δείγμα, μέσω διάχυσης, χρησιμοποιώντας υγρό διαλύτη. Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει τη διόγκωση των στερεών σωματιδίων του φυτού, λόγω της ρόφησης του διαλύτη από τη στερεή φάση. Η ρόφηση οφείλεται σε ωσμωτικές δυνάμεις, τριχοειδή φαινόμενα και στη διάλυση των ιόντων στα κύτταρα. Μάλιστα, ένα ποσοστό από τις ενώσεις που έχουν υποστεί φθορά από την προεπεξεργασία του φυτού είναι δυνατό να εκχυλιστούν απευθείας, με την έκπλυση, σε αυτό το στάδιο. Κατά το δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται διάχυση τόσο στο εσωτερικό της στερεής φάσης, όσο και στα εξωτερικά στρώματα των στερεών σωματιδίων.<sup>[29, 30]</sup>

Οι συνθήκες λειτουργίας όπως ο χρόνος της εκχύλισης, ο λόγος υγρού προς στερεό και το είδος του διαλύτη εκχύλισης παίζουν σημαντικό ρόλο στη μέθοδο της συμβατικής εκχύλισης. Σημαντικές παράμετροι θεωρούνται και το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, το pH και η θερμοκρασία.<sup>[29, 31]</sup> Για παράδειγμα, όσον αφορά το δενδρολίβανο, τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ όταν χρησιμοποιούνται μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης και μικρή αναλογία υγρού προς στερεό. Γενικά, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών, καθώς είναι ασφαλής, οικονομική και παρουσιάζει ευκολία στην κλιμάκωση.<sup>[29]</sup>

## 2.4 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

### 2.4.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

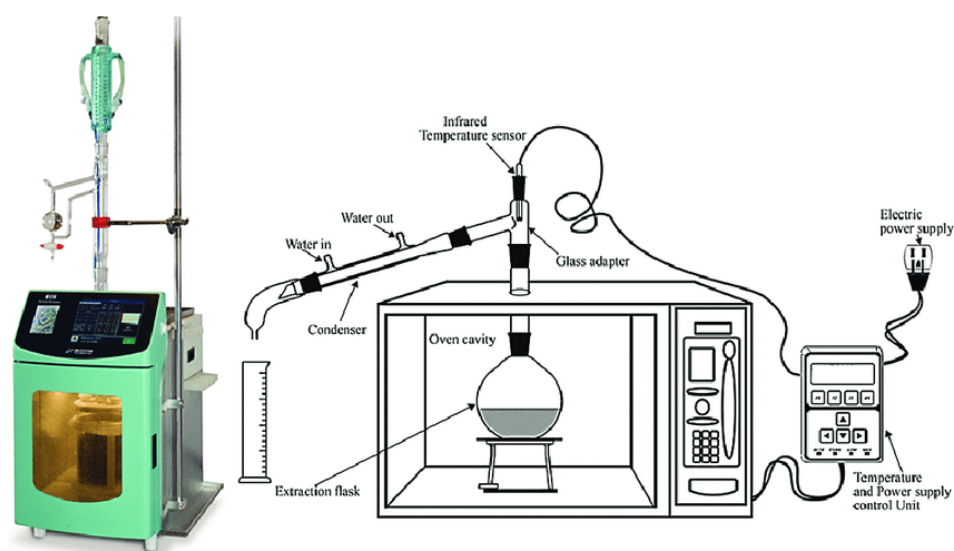
#### 2.4.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Microwave Assisted Extraction, MAE) είναι μία διαδικασία που εκμεταλλεύεται την ενέργεια των μικροκυμάτων για τη διευκόλυνση της εισχώρησης του διαλύτη στη μήτρα του δείγματος.<sup>[21]</sup> Τα μικροκύματα είναι μη ιονισμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα συχνότητας από 300MHz έως 300GHz και τοποθετούνται μεταξύ των ακτίνων X και της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.<sup>[24]</sup>

Κατά τη διάρκεια της MAE, τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα θερμαίνουν το διηλεκτρικό υλικό μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος βασίζεται στη δόνηση/περιστροφή των πολικών μορίων στο υγρό μίγμα υπό την επίδραση του ταλαντευόμενου ηλεκτρικού πεδίου, ενώ ο δεύτερος στην ευθυγράμμισή τους με το συνεχώς μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Συγκεκριμένα, η διπολική



περιστροφή σχετίζεται με τις κινήσεις των δίπολων μορίων του διαλύματος λόγω της προσπάθειάς τους να ευθυγραμμιστούν με τη φορά του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Οι δονήσεις και οι περιστροφές συμβαίνουν σε συχνότητες της τάξης MHz/GHz, δημιουργώντας διαμοριακές και ενδομοριακές τριβές. Αυτή η διπολική περιστροφή, σε συνδυασμό με την κίνηση ενός μεγάλου αριθμού φορτισμένων ιόντων στις ίδιες συχνότητες (δεύτερος μηχανισμός) έχει ως αποτέλεσμα την άμεση θέρμανση όλου του υγρού. Οι ταχύτητες θέρμανσης επιτυγχάνονται σε δευτερόλεπτα, ενώ το μέγεθος της αύξησης της θερμοκρασίας εξαρτάται από τις διηλεκτρικές ιδιότητες του υλικού. Η θέρμανση οδηγεί στην απώλεια της υγρασίας των κυττάρων και σε ταχεία αύξηση της πίεσης σε κυτταρικά επίπεδα, προκαλώντας τη διόγκωση και τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και τελικά την απελευθέρωση των ενεργών συστατικών τους. Τα υψηλά ηλεκτρικά πεδία παράγουν ένα δυναμικό μεμβράνης, το οποίο δημιουργεί ανοιχτές οπές στη μεμβράνη (ηλεκτροδιάτρηση).<sup>[24, 32, 33]</sup>



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της MAE σε εργαστηριακή κλίμακα <sup>[34]</sup>

### 2.4.1.2 Παράμετροι εκχύλισης

Η αποτελεσματικότητα της MAE εξαρτάται από πλήθος παραγόντων. Σημαντικότεροι παράγοντες θεωρούνται η φύση και η ποσότητα του διαλύτη, η θερμοκρασία, το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος (συνήθως 100μm-2mm),<sup>[35]</sup> ο χρόνος της εκχύλισης και η ισχύς των μικροκυμάτων.<sup>[33]</sup> Επιπλέον, η διπολική περιστροφή των μορίων υπό την ταχεία αλλαγή του ηλεκτρικού πεδίου παίζει σημαντικό ρόλο στη MAE.<sup>[24]</sup> Ακόμη, όταν η MAE διεξάγεται σε κλειστά δοχεία, η θερμοκρασία μπορεί να φτάσει πολύ πάνω από το σημείο βρασμού του διαλύτη. Αυτές οι αυξημένες θερμοκρασίες οδηγούν σε αυξημένη αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Όσον αφορά τους διαλύτες, αυτοί έχουν



μεγαλύτερη ικανότητα διαλυτοποίησης ουσιών σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς η επιφανειακή τάση και το ιξώδες τους μειώνεται με τη θερμοκρασία. Σε πολλές έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι η χρήση θερμοκρασιών υψηλότερες από 100°C οδηγεί σε αυξημένες ανακτήσεις. Τέλος, αναφορικά με τον χρόνο, ακόμα και μερικά λεπτά μπορεί να θεωρηθούν επαρκή για την εκχύλιση δειγμάτων. Μάλιστα, συχνά, οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης μπορεί να οδηγήσουν σε υποβάθμιση του δείγματος.<sup>[36]</sup>

### 2.4.1.3 Επιλογή διαλύτη

Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, η οποία εξαρτάται από τη διαλυτότητα του εκχυλίσματος, το σημείο βρασμού τους, την αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύτη και του φυτού και την ικανότητα απορρόφησης των μικροκυμάτων από το διαλύτη. Τα παραπάνω καθορίζονται από τη διηλεκτρική του σταθερά και το συντελεστή διασποράς.<sup>[24, 35]</sup> Ο συντελεστής διασποράς ( $\tan\beta$ ) είναι ένα μέτρο της ικανότητας του διαλύτη να απορροφά την ενέργεια των μικροκυμάτων και να τη μεταφέρει ως θερμότητα στα περιβάλλοντα μόρια.<sup>[33, 37]</sup> Ακόμη, οι διαλύτες πρέπει να έχουν υψηλή διηλεκτρική σταθερά, διότι κατά αυτόν τον τρόπο έχουν μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης και μεταβίβασης της ενέργειας των μικροκυμάτων, με αποτέλεσμα τον ταχύτερο ρυθμό θέρμανσης του διαλύτη.<sup>[38]</sup> Ο συντελεστής διασποράς δίνεται από την παρακάτω εξίσωση (1):

$$\tan\beta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

Όπου,

$\epsilon''$ : η διηλεκτρική απώλεια, που δείχνει την αποτελεσματικότητα μετατροπής της ενέργειας μικροκυμάτων σε θερμότητα

$\epsilon'$ : η διηλεκτρική σταθερά, που είναι το μέτρο της ικανότητας απορρόφησης της ενέργειας των μικροκυμάτων<sup>[37]</sup>

Με βάση τα προαναφερθέντα, κατάλληλοι διαλύτες θεωρούνται η αιθανόλη, η μεθανόλη και το νερό, οι οποίοι είναι πολικοί. Αντίθετα, διαλύτες με μικρή διηλεκτρική σταθερά όπως το τολουένιο και το εξάνιο, που είναι μη πολικοί, δεν είναι κατάλληλοι για τη ΜΑΕ.<sup>[35]</sup> Συχνά, όπως στην περίπτωση της εκχύλισης διαφορετικών φαινολικών ενώσεων, απαιτείται χρήση μίγματος αιθανόλης ή μεθανόλης με νερό.<sup>[32]</sup> Συγκεκριμένα, ο ρυθμός θέρμανσης αυτών των διαλυτών αναμένεται να είναι αρκετά υψηλός, λόγω των υψηλών διηλεκτρικών ιδιοτήτων. Επομένως, η αραίωση αυτών με νερό εκτιμάται ότι αυξάνει περαιτέρω τη θερμαντική ικανότητα, οδηγώντας στην αποικοδόμηση πολλών συστατικών του δείγματος.<sup>[39]</sup> Τονίζεται επίσης ότι για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων υλικών συνίσταται η χρήση συνδυασμού διαλυτών με σχετικά χαμηλότερες τιμές

διηλεκτρικής σταθεράς.<sup>[38]</sup> Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι τιμές για τη διηλεκτρική σταθερά και το συντελεστή διασποράς των βασικότερων διαλυτών:

Πίνακας 4: φυσικές παράμετροι ορισμένων διαλυτών που χρησιμοποιούνται συχνά στη ΜΑΕ<sup>[33]</sup>

Διαλύτης	Διηλεκτρική σταθερά στους 20°C	Συντελεστής διασποράς στα 2,45GHz
Νερό	80,4	0,123
Μεθανόλη	33,7	0,659
Αιθανόλη	25,7	0,941
Ακετόνη	21,4	-
Χλωροφόρμιο	4,8	-
Εξάνιο	1,88	-

#### 2.4.1.4 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής περιλαμβάνουν το μειωμένο χρόνο εκχύλισης, που μπορεί να φτάσει μόλις τα λίγα λεπτά και να συμβάλλει στη μείωση της καταναλώμενης ενέργειας, τη χρήση μικρών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών και τις αυξημένες αποδόσεις της διεργασίας. Εξίσου σημαντικό θεωρείται το γεγονός ότι το τελικό προϊόν εμφανίζει αυξημένη καθαρότητα, εξαλείφοντας την ανάγκη για περαιτέρω κατεργασία.<sup>[24, 40]</sup> Επιπρόσθετα, παρά το γεγονός ότι τα φυτικά υλικά χρησιμοποιούνται συχνά σε αποξηραμένη μορφή, αυτά περιέχουν ίχνη υγρασίας. Αυτό αποτελεί βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής, καθώς η υγρασία χρησιμεύει ως στόχος για τη θέρμανση μέσω μικροκυμάτων. Συγκεκριμένα, η υγρασία εξατμίζεται, λόγω θέρμανσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πίεσης στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και εν τέλει τη διάρρηξή τους, διευκολύνοντας έτσι την έκπλυση των δραστικών συστατικών.<sup>[37]</sup>

Από την άλλη μεριά, η συγκεκριμένη μέθοδος εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μπορεί να μην είναι ικανοποιητική αν οι διαλύτες είναι μη πολικοί ή αν είναι πτητικοί.<sup>[35]</sup> Ακόμη, η ΜΑΕ χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μικρών μορίων όπως φαινολικά οξέα (π.χ. γαλλικό και ελλαγικό οξύ), ισοφλαβόνες και trans-ρεσβερατρόλη. Ως αποτέλεσμα, αυτή η μέθοδος πιθανόν να μην είναι κατάλληλη για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων με υψηλότερο αριθμό υποκαταστατών υδροξυλίου (π.χ. ταννίνες) ή ενώσεων που εμφανίζουν ευαισθησία σε αυξημένη θερμοκρασία (π.χ. ανθοκυανίνες), καθώς μπορεί να επέλθει η αποικοδόμησή τους.<sup>[21]</sup> Τέλος, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στον χρόνο της εκχύλισης διότι παρά το γεγονός ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου της εκχύλισης και της αποτελεσματικότητάς της, σε πολλές περιπτώσεις η παρατεταμένη εφαρμογή μικροκυμάτων μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση των στοχευμένων ενώσεων.<sup>[41]</sup>

## 2.4.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

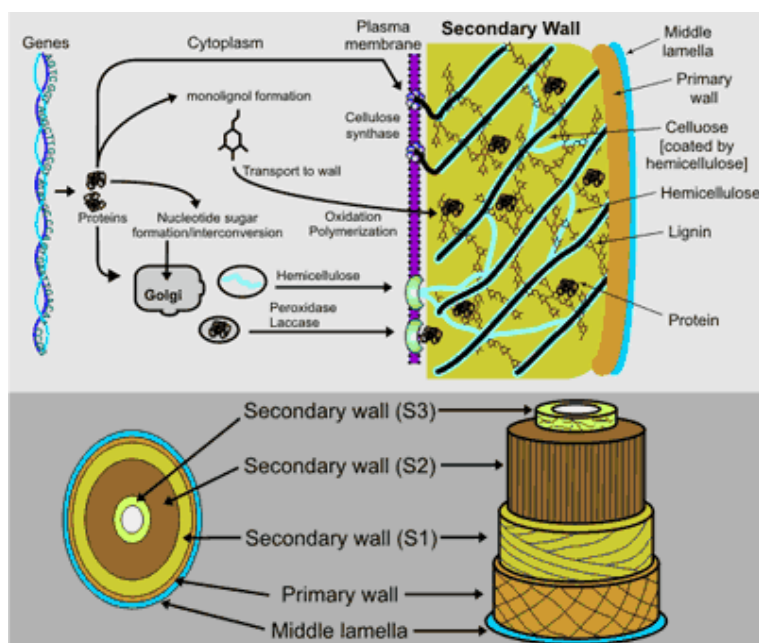
### 2.4.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται αρκετά στη βιομηχανία λόγω της πληθώρας των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η λακκάση η οποία χρησιμοποιείται για τη λεύκανση στη βιομηχανία χαρτιού, η πρωτεάση που χρησιμοποιείται στα δερμάτινα προϊόντα, η λιπάση που εφαρμόζεται στην παραγωγή προϊόντων φροντίδας του δέρματος και η φωσφολιπάση που χρησιμοποιείται για την αποκομμίωση του σογιέλαιου.<sup>[28, 42]</sup> Η εκχύλιση που πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμων αποτελεί μία πιθανή εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης και θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον, καθώς συνδέεται με τη χρήση πράσινης χημείας στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό με κάποια άλλη μέθοδο. Η αρχή της συγκεκριμένης διεργασίας βασίζεται τόσο στη δράση των ενζύμων, όσο και στον τρόπο με τον οποίο οι βιοενεργές ουσίες βρίσκονται συνδεδεμένες στα φυτά.<sup>[28]</sup>

Όσον αφορά την πρώτη παράμετρο, τα ένζυμα θεωρούνται ιδανικοί καταλύτες για να ενισχύσουν την εκχύλιση, τη σύνθεση ή την τροποποίηση σύνθετων βιοενεργών ενώσεων φυσικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα βασίζεται στην εγγενή ικανότητα αυτών να καταλύουν αντιδράσεις με εξαιρετική εξειδίκευση και εκλεκτικότητα και να λειτουργούν υπό ήπιες συνθήκες σε υδατικά διαλύματα. Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα επίσης να αποικοδομούν ή να διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες και να υδρολύουν τα συστατικά που βρίσκονται σε αυτό, επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη απελευθέρωση και εν τέλει εκχύλιση των βιοενεργών ουσιών.<sup>[28, 43]</sup> Γενικά, όταν τα ένζυμα και το υπόστρωμα συνδέονται μεταξύ τους, το σχήμα του μορίου του ενζύμου αλλάζει προκειμένου να είναι δυνατή η αλληλεπίδρασή τους. Αυτή η αλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα την καταπόνηση και παραμόρφωση του υποστρώματος, προκαλώντας θραύση των δεσμών και προωθώντας την αντίδραση. Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι υψηλή, η προσθήκη του ενζύμου ενισχύει το ρυθμό της αντίδρασης, μέχρις ότου η συγκέντρωση του υποστρώματος να περιοριστεί.<sup>[43]</sup>

Όσον αφορά τη δεύτερη παράμετρο, αξίζει να σημειωθεί ότι το κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων φυτικών κυττάρων αποτελείται από τρία στρώματα που διαφέρουν ως προς τη σύνθεση των πολυσακχαριτών. Το μεσαίο στρώμα αποτελείται κυρίως από πηκτίνη, ένα πολυμερές του γαλακτουρονικού οξέος συνδεδεμένο σε μονάδες γλυκόζης, ξυλόζης, αραβινόζης και γαλακτόζης. Το κύριο κυτταρικό τοίχωμα σχηματίζεται από μία θεμελιώδη δομή κυτταρίνης-

ξυλογλυκάνης, ενσωματωμένη σε ένα σύμπλεγμα πηκτίνης και δομικών πρωτεϊνών, ενώ το δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από παράλληλα μικροϊνίδια κυτταρίνης, μαζί με ημικυτταρίνες, πηκτίνες και ορισμένες λιγνίνες.<sup>[44]</sup>



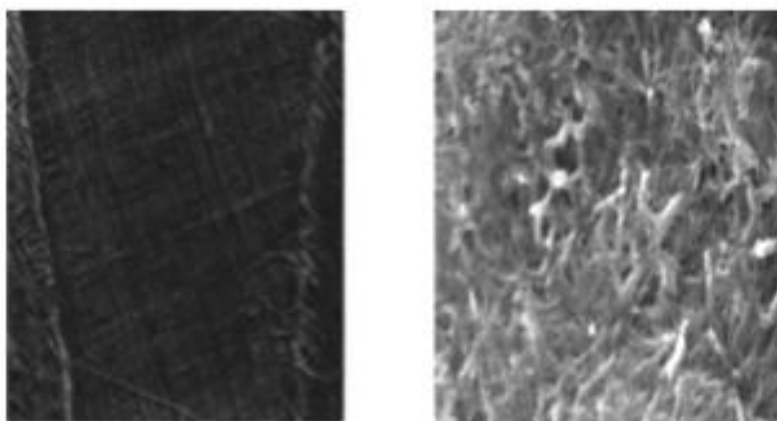
Εικόνα 4: Τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών

Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτές που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα και συνδέονται με δομικές πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (όπως η κυτταρίνη ή η ημικυτταρίνη), με εστερικούς δεσμούς, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου και σε αυτές που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων.<sup>[44-46]</sup> Παρόλ'αυτά, οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης εξάγουν κυρίως τις πιο προσιτές και ασθενώς συγκρατημένες φαινολικές ενώσεις των φυτών που μπορούν εύκολα να απελευθερωθούν από τη φυτική μήτρα.<sup>[46-48]</sup> Αντίθετα, τα ένζυμα, που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, είναι ικανά να βελτιώσουν τη διεργασία της εκχύλισης καθώς απελευθερώνουν τόσο αυτές που είναι στην εξωτερική επιφάνεια και είναι ασθενώς συγκρατημένες, όσο και τα ενδοκυτταρικά συστατικά και τις φαινολικές ενώσεις που συγκρατούνται ισχυρά και συνδέονται με άλλα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος.<sup>[47, 48]</sup> Συγκεκριμένα, αυτά προωθούν τη διάσπαση της μήτρας του κυτταρικού τοιχώματος, διατηρώντας παράλληλα τη σταθερότητα των φαινολικών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.<sup>[45]</sup>

Ο παραπάνω μηχανισμός βασίζεται στη χρήση ενζύμων που είναι ικανά να διασπασούν το κυτταρικό τοίχωμα και να προκαλέσουν τον αποπολυμερισμό των πολυσακχαριτών που βρίσκονται σε αυτό, αλλά και την υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος. Κατά αυτόν τον τρόπο, η διαπερατότητα και το

πορώδες των φυτικών κυττάρων αυξάνονται, βελτιώνοντας έτσι τη διαλυτότητα των συστατικών που βρίσκονται στο εσωτερικό τους. Ως αποτέλεσμα, όχι μόνο η δομή του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να αποδυναμωθεί και τελικά να σπάσει, αλλά ευνοείται και η εκχύλιση των ενδοκυτταρικών υλικών. Συνεπώς, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση χρησιμοποιείται για τη μείωση της απώλειας των βιοενεργών συστατικών και τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης.<sup>[45]</sup>

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η διαφορά στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος ενός φυτού χωρίς επεξεργασία και μετά από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση:



Εικόνα 5: εικόνα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του κυτταρικού τοιχώματος ενός φυτού 1) χωρίς επεξεργασία 2) μετά από επεξεργασία με ένζυμο<sup>[43]</sup>

### 2.4.2.2 Παράμετροι εκχύλισης

Οι λειτουργικές συνθήκες της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (Enzyme Assisted Extraction, EAE) είναι οι ακόλουθες:

- η θερμοκρασία της αντίδρασης
- ο χρόνος της εκχύλισης
- το pH του συστήματος
- η συγκέντρωση του ενζύμου
- η αναλογία ενζύμου/υποστρώματος
- το είδος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη
- το είδος του ενζύμου
- το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος<sup>[43, 44, 49]</sup>

Το pH του μέσου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενζυμική δραστηριότητα, καθώς επηρεάζει το σχήμα και το φορτίο των ενζύμων κι επομένως τη δραστηκότητά τους. Γενικά, η αύξηση στο pH, στη θερμοκρασία και στη συγκέντρωση των ενζύμων προκαλεί αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης.<sup>[50]</sup> Αντίθετα, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος έχει θετική επίδραση στην ανάκτηση των φαινολών, καθώς επιτρέπει την καλύτερη

διείσδυση του ενζύμου στις δραστικές θέσεις και συνεπώς αυξάνει την υδρόλυση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος.<sup>[42, 44, 49]</sup> Ωστόσο, έρευνες αναφέρουν ότι η υπερβολική μείωση του μεγέθους των σωματιδίων θα πιθανόν να εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύτη και του υποστρώματος.<sup>[44]</sup> Πρέπει ακόμη να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του ενζύμου, καθώς η ενεργότητα του νερού παίζει σημαντικό ρόλο στη διόγωση των ινών του δείγματος.<sup>[42]</sup> Επιπλέον, η συγκέντρωση του ενζύμου παίζει καθοριστικό ρόλο στην απόδοση της εκχύλισης, καθώς παρότι αυτά τα δύο μεγέθη έχουν αναλογική σχέση, η υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης δεν είναι επιθυμητή. Συγκεκριμένα, μπορεί να οδηγήσει σε ανταγωνιστική προσρόφηση στον πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα τη στερική παρεμπόδιση των ανταγωνιστικών θέσεων των ενζύμων, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη διάσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος.<sup>[45]</sup>

Είναι επίσης γνωστό ότι η παρουσία λιγνίνης μπορεί να επιβραδύνει τη δράση των ενζύμων, εξαιτίας της μη παραγωγικής απορρόφησης των ενζύμων από τη λιγνίνη.<sup>[44, 49]</sup> Αντίστοιχα αποτελέσματα προκαλούνται και από την παρουσία ορισμένων φαινολικών συστατικών, φλαβονοειδών και ταννινών. <sup>[44, 45, 49]</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαφορελική γέφυρα των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος μειώνει την προσβασιμότητα και τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων.<sup>[44, 49]</sup> Για αυτό το λόγο, συχνά, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση είναι περισσότερο αποδοτική όταν πριν από την εκχύλιση προηγηθεί προκατεργασία, προκειμένου οι αναστολές των ενζύμων (π.χ. πολυφαινόλες) να οξειδωθούν.<sup>[50]</sup>

### **2.4.2.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα**

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης και για αυτό χρησιμοποιείται ως εναλλακτική μέθοδος για την απελευθέρωση των βιοενεργών συστατικών των φυτών.<sup>[51]</sup> Ορισμένα εκ των βασικών της πλεονεκτημάτων είναι η μειωμένη απαιτούμενη ποσότητα διαλύτη, ο μειωμένος χρόνος εκχύλισης, η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, ο υψηλός ρυθμός ανάκτησης και η αυξημένη απόδοση της εκχύλισης.<sup>[28, 52]</sup> Η μειωμένη χρήση διαλύτη είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο για κανονιστικούς όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους, καθώς αποτελεί μία πιο «πράσινη επιλογή» συγκριτικά με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης.<sup>[28]</sup> Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μία τεχνολογία υψηλής βιοδραστικής απόδοσης με την οποία διασπώνται τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνονται τα επιθυμητά βιοδραστικά προϊόντα. Απομακρύνει επίσης τα ανεπιθύμητα συστατικά από τα κυτταρικά τοιχώματα και τα εμπόδια που προκύπτουν από τη διαλυτότητα του νερού ή την αδιαλυτότητα του δείγματος, με σκοπό τη βελτίωση της εκχύλισης. Εμφανίζει ακόμη υψηλή καταλυτική



αποτελεσματικότητα, διατηρώντας παράλληλα, σε υψηλο βαθμό, την αρχική δραστηριότητα των συστατικών.<sup>[43]</sup>

Η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση χρησιμοποιείται είτε για να αυξήσει την απόδοση του τελικού προϊόντος είτε για να βελτιώσει την ποιότητά του. Αυτό πραγματοποιείται είτε με την προσθήκη ενζύμων στην ίδια την εκχύλιση είτε με απλή προκατεργασία με ένζυμα. Η ενζυμική προεπεξεργασία πραγματοποιείται για να διευκολύνει την επακόλουθη εκχύλιση του επιθυμητού προϊόντος. Βέβαια, επιτρέπει και τη βελτίωση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του υπολλείματος.<sup>[53]</sup> Υδρολυτικά ένζυμα όπως οι πηκτινάσες, οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρινάσες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διάσπαση των δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και οι πηκτικές ύλες, με σκοπό την αποικοδόμησή τους και την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών όπως οι φαινολικές ενώσεις, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα του προϊόντος.<sup>[28, 49, 51, 52]</sup> Αντίθετα, οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης με τη χρήση διαλύτη εκχύλιζουν κυρίως τα πιο προσιτά βιοενεργά συστατικά. Συνεπώς, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση αποτελεί πιθανή εναλλακτική λύση καθώς είναι ιδιαίτερα αποδοτική και συγχρόνως είναι μία απλοποιημένη αλλά και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος εκχύλισης.<sup>[52]</sup> Τέλος, ορισμένα συστατικά των φυτών εμφανίζουν μικρή ή και μηδενική βιοδραστικότητα, αλλά η δομή τους μπορεί να είναι παρόμοια με αυτή των συστατικών-στόχων. Ωστόσο, υποστηρίζεται ότι τα ένζυμα που προστίθενται μπορούν να αλλάξουν τη χημική δομή αυτών των συστατικών σε δομή αντίστοιχη με την επιθυμητή. Αυτό το χαρακτηριστικό του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος.<sup>[43]</sup>

Παρόλ'αυτά, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, στην περίπτωση της επεξεργασίας μεγάλων όγκων πρώτης ύλης, το κόστος των ενζύμων είναι σχετικά υψηλό. Επιπλέον, τα μέχρι τώρα διαθέσιμα παρασκευάσματα ενζύμων δεν είναι δυνατό να υδrolύσουν πλήρως τα κυτταρικά τοιχώματα, περιορίζοντας έτσι τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων. Τέλος, η ανακλιμάκωση σε βιομηχανικό επίπεδο (scale-up) αυτής της διεργασίας θέλει ιδιαίτερη προσοχή, διότι η συμπεριφορά των ενζύμων είναι πιθανό να παρουσιάσει διαφοροποιήσεις, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η εκχύλιση. Ωστόσο, σε περίπτωση που οι παραπάνω περιορισμοί ξεπεραστούν, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση προσφέρει την ευκαρία να αυξήσει τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων, αλλά και να βελτιώσει την ποιότητα του προϊόντος, επιτρέποντας τη χρήση πιο ήπιων συνθηκών επεξεργασίας, όπως για παράδειγμα τη χρήση χαμηλότερης θερμοκρασίας.<sup>[28]</sup>

#### 2.4.2.4 Είδη ενζύμων

Τα ένζυμα είναι ιδανικοί καταλύτες για την εκχύλιση σύνθετων βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης, καθώς αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των τοιχωμάτων και οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης.<sup>[43]</sup> Λαμβάνονται συνήθως από βακτήρια, μύκητες, καλλιέργειες μικροοργανισμών και ιστών θηλαστικών, εκχυλίσματα φυτών ή ακόμη και από μικροοργανισμούς που έχουν υποβληθεί στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA.<sup>[28, 43, 53]</sup> Από περίπου 3000 αναγνωρισμένους ενζυμικούς καταλύτες, περισσότερα από 150-170 είδη ενζύμων έχουν εμπορική χρήση. Αυτά χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων, όπως η κλωστοϋφαντουργία, η βιομηχανία δέρματος, η παρασκευή προϊόντων όπως τρόφιμα, βιοαιθανόλη, απορρυπαντικά, καλλυντικά και η φαρμακοβιομηχανία. Τα ένζυμα, ανάλογα με τη δράση τους, κατατάσσονται στους ακόλουθους τύπους:

- **υδρολάσες:** ένζυμα που καταλύουν υδρολυτικές διασπάσεις (διάσπαση δεσμού παρουσία νερού)
- **λιγάσες ή συνθετάσες:** ένζυμα που καταλύουν την ένωση δύο μορίων, με ταυτόχρονη διάσπαση ATP
- **τρανσφεράσες:** ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά ομάδας από ένα μόριο σε ένα άλλο
- **λυάσες:** ένζυμα που καταλύουν τη δημιουργία διπλού δεσμού με απόσπαση μικρών μορίων
- **ισομεράσες:** ένζυμα που καταλύουν την ενδομοριακή μετακίνηση ομάδων ώστε το προϊόν που θα σχηματιστεί να είναι ισομερές με το υπόστρωμα
- **οξειδοαναγωγάσες:** ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση ή την αναγωγή ενός υποστρώματος<sup>[43, 54]</sup>

Ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου το 75%) των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι υδρολυτικά. Μάλιστα, τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα είναι οι γλυκοζιδάσες, οι πηκτινάσες, οι αμυλάσες, οι γλυκοαμυλάσες, οι πρωτεάσες, οι λιπάσες, οι γλυκανάσες, οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες και οι οξειδάσες.<sup>[53]</sup>

Ένζυμα όπως οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες και οι πηκτινάσες χρησιμοποιούνται για να διαταράξουν τη δομική ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, ενισχύοντας έτσι την εκχύλιση των βιοενεργών ουσιών.<sup>[28]</sup> Συγκεκριμένα, τα πηκτινολυτικά παρασκευάσματα θεωρούνται τα πιο αποτελεσματικά και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών. Αντίθετα, σε ορισμένες έρευνες οι χρήση κυτταρινασών δεν έχει οδηγήσει σε θετικό αποτέλεσμα όσον αφορά την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών και την απελευθέρωση φαινολικών



συστατικών. Ωστόσο, η χρήση κυτταρινασών σε συνδυασμό με πηκτινάσες έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε πλήρη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και μάλιστα πιο αποτελεσματικά συγκριτικά με τη χρήση πηκτινάσης αποκλειστικά. Η χρήση πρωτεασών θεωρείται επίσης ιδιαίτερα αποτελεσματική για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών.<sup>[44]</sup>

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται ορισμένα ένζυμα που, σύμφωνα με έρευνα, χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων σε βιομηχανική κλίμακα:

Πίνακας 5: Ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση διάφορων προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα<sup>[28]</sup>

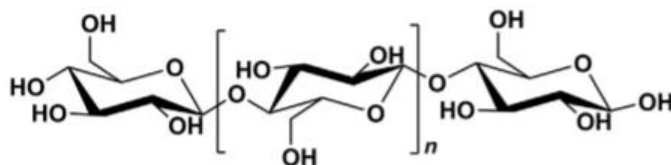
Προϊόν	Πηγή	Ένζυμο
Φλαβονοειδή	Φλούδα μανταρινιού	Ανασυνδυασμένη ραμνοζιδάση
Φαινολικά	Φλούδα εσπεριδοειδών	Κυτταρινάση
Πολυφαινόλες	Σταφύλι	Πηκτινολυτικά ένζυμα
Λιγνάνες	Λινάρι	Κυτταρινάση και γλυκοσιδάση
Καροτονοειδή	Κατιφές	Πηκτινολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα

Παρακάτω θα αναλυθούν οι κατηγορίες των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική:

i. Κυτταρίνες-κυτταρινάσες:

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που περιέχει μεγάλο αριθμό μορίων γλυκόζης και αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Πρόκειται για ένα γραμμικό ομοιοπολυμερές από μονάδες β-d-γλυκο-πυρανόζης, συνδεδεμένων με β-(1-4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς και σχηματίζει ινίδια που προσδίνουν αντοχή στο φυτό.<sup>[50, 55]</sup> Οι κυτταρινάσες αποτελούν μία οικογένεια ενζύμων που εκτελούν τη διαδικασία της αποσύνθεσης της κυτταρίνης σε πρωτογενή προϊόντα όπως η γλυκόζη.<sup>[50, 56]</sup> Είναι ευρέως διαδεδομένες και παράγονται από μία ευρεία κατηγορία βακτηρίων ή μυκήτων, αερόβια ή αναερόβια.<sup>[50]</sup> Οι κυτταρινάσες υδρολύουν τους β-1,4 δεσμούς της κυτταρίνης ή των χημικώς τροποποιημένων μορφών της.<sup>[57, 58]</sup> Τυπικά, τρία είδη ενζύμων δρουν συνεργιστικά, με σκοπό την υδρόλυση της κυτταρίνης: οι ενδο-β-1,4-γλουκανάσες (προσβάλλουν εσωτερικά τις άμορφες περιοχές της αλυσίδας της κυτταρίνης), οι κελλοβιοϋδρολάσες ή εξωγλουκανάσες (προσβάλλουν τα άκρα του πολυμερούς, απελευθερώνοντας κελλοβιόζη, η οποία τελικά διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης) και οι β-γλυκοζιδάσες (συμμετέχουν στη διάσπαση της κελλοβιόζης σε γλυκόζη). Οι

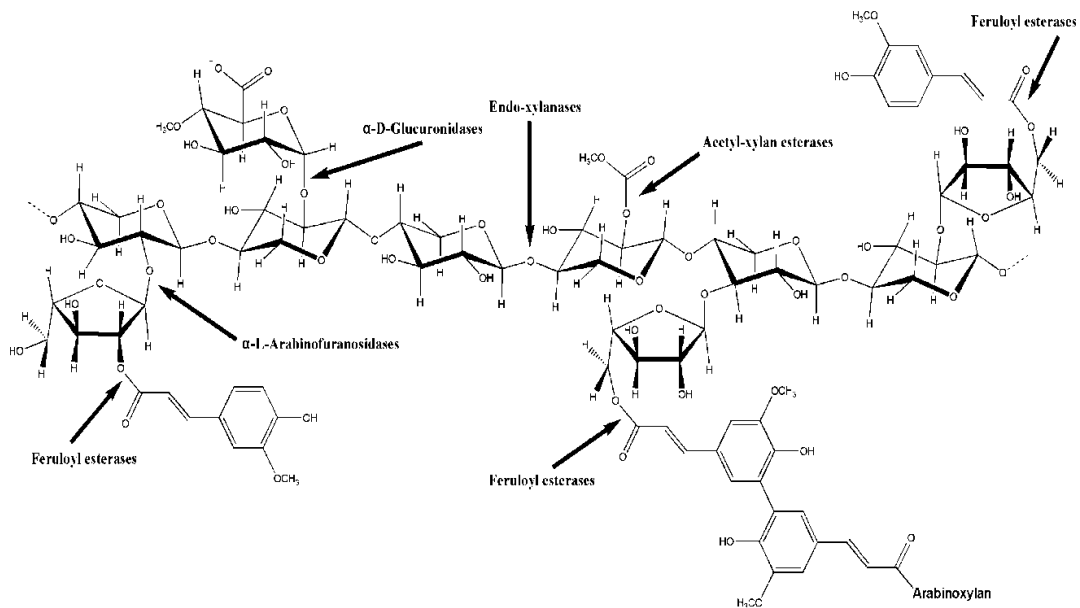
κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα όπως οι πηκτινάσες και οι β-γλυκανάσες.<sup>[58]</sup>



Εικόνα 6: Η χημική δομή της κυτταρίνης<sup>[59]</sup>

## ii. Ημικυτταρίνες-ημικυτταρινάσες:

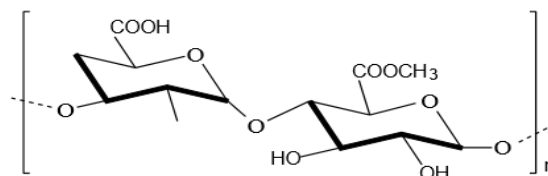
Η ημικυτταρίνη είναι μία ετερογενής ομάδα διακλαδισμένων και γραμμικών πολυσακχαριτών που βρίσκονται μαζί με την κυτταρίνη στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών.<sup>[50, 58]</sup> Η ημικυτταρίνη συνδέεται επίσης ομοιοπολικά με τη λιγνίνη, σχηματίζοντας μία περίπλοκη δομή. Ενώ η κυτταρίνη είναι κρυσταλλική, ισχυρή και ανθεκτική στην υδρόλυση, η ημικυτταρίνη έχει τυχαία και άμορφη δομή, με μικρή αντοχή. Οι ημικυτταρινάσες είναι μία ομάδα ενζύμων που παράγονται από αερόβιους, αναερόβιους μύκητες και βακτήρια και προκαλούν την υδρόλυση της ημικυτταρίνης.<sup>[50]</sup> Συγκεκριμένα, οι μύκητες αποτελούν τις συνηθέστερες βιομηχανικές πηγές για ημικυτταρινάσες, όπως οι γλυκανάσες, οι ξυλανάσες, οι γαλακτανάσες, οι μαννανάσες, γαλακτομαννανάσες και οι πεντοζανάσες. Μάλιστα αυτά τα ένζυμα είναι συχνά παραπροϊόντα της παραγωγής κυτταρινάσης ή πηκτινάσης και αποτελούν πολύτιμα εργαλεία στη βιομηχανία τροφίμων.<sup>[58]</sup> Η δράση τους βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ημικυτταρινασών, όπως οι ξυλανάσες, οι μαννάσες και οι αραβινάσες, να απομακρύνουν τους υποκαταστάτες της ημικυτταρίνης, με αποτέλεσμα την εξασθένηση του δικτύου κυτταρίνης-ημικυτταρίνης. Πιο αναλυτικά, η ξυλάνη, το βασικό πολυμερές της ημικυτταρίνης, υδρολύεται σε ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από ενδο-β-1,4-ξυλανάσες και στη συνέχεια οι β-ξυλοζιδάσες υδρολύουν τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες (κυρίως την ξυλοβιόζη) σε μόρια ξυλόζης. Άλλα ένζυμα που συνεισφέρουν στην αποικοδόμηση της ημικυτταρίνης είναι οι α-γλυκουρονιζάσες (*α*-glucuronidases), οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες (*α*-L-arabinofuranosidases), οι ακετυλ-εστεράσες και οι εστεράσες του φερουλικού οξέος. Η αποικοδόμηση των γλυκομαννάνων γίνεται από β-μαννανάσες (*β*-mannanases) και β-μαννοζιδάσες (*β*-mannosidases).<sup>[60, 61]</sup>



Εικόνα 7: Η χημική δομή της αραβοξιλάνης και τα ένζυμα που συμμετέχουν στην υδρόλυσή της<sup>[59]</sup>

### iii. Πηκτίνες-πηκτινάσες:

Οι πηκτίνες είναι πολύπλοκα και μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοσιδικά μακρομόρια, που συμβάλλουν σε σύνθετες φυσιολογικές διεργασίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση ή η κυτταρική ανάπτυξη, αλλά και η δομική ακεραιότητα και συνοχή των φυτικών ιστών. Οι πηκτίνες είναι στην πραγματικότητα ένα ετερογενές μίγμα πολυσακχαριτών με διαφορετικό μοριακό βάρος και βαθμό εστεροποίησης. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα (πηκτινάσες), τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τις πρωτοπηκτινάσες, τις εστεράσες και τις αποπολυμεράσες.<sup>[50]</sup> Οι πηκτινάσες είναι ουσιαστικά μία ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αποικοδόμηση των πηκτικών ουσιών (αποπηκτινοποίηση) και συνεπώς του κυτταρικού τοιχώματος, μέσω των αντιδράσεων αποπολυμερισμού και αποεστεροποίησης.<sup>[42, 57]</sup> Τα ένζυμα αυτά αυξάνουν το ρυθμό ροής και απελευθέρωσης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης και ταυτόχρονα μειώνουν το ιξώδες του δείγματος και συμβάλλουν στην αύξηση της καθαρότητας του τελικού προϊόντος.<sup>[42, 50]</sup>



Εικόνα 8: Η χημική δομή της ομογαλακτορουανής, ενός εκ των τριών συστατικών της πηκτίνης<sup>[62]</sup>

#### iv. Πρωτεάσες:

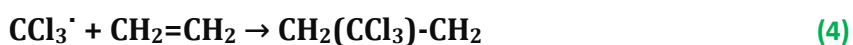
Οι πρωτεάσες ταξινομούνται ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους (φυτικές, ζωικές ή μικροβιακές) και την καταλυτική τους δράση και διακρίνονται σε ενδοπεπτιδάσες, εξωπεπτιδάσες και πρωτεϊνάσες. Οι ενδοπεπτιδάσες είναι οι πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις η δράση τους συμπληρώνεται με αυτή των εξωπεπτιδασών. Συγκεκριμένα, οι ενδοπεπτιδάσες προσβάλλουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα στο εσωτερικό της, ενώ οι εξωπεπτιδάσες απομακρύνουν αμινοξέα ή διπεπτίδια από κάποιο από τα αμινικά άκρα.<sup>[58]</sup> Γενικά, οι πρωτεάσες αποτελούν μία περίπλοκη ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών.<sup>[57]</sup> Προωθούν, τη διάσπαση των δομικών πρωτεϊνών που ενισχύουν τη δομή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και παράλληλα συμβάλλουν στην απελευθέρωση των φαινολών από τα κενοτόπια των κυττάρων, διασπώντας τη μεμβράνη που τις περιβάλλει.<sup>[44]</sup> Οι πρωτεάσες, ακόμη, μπορούν να αποικοδομούν συστατικά πλούσια σε υδροξυπρολίνη, τα οποία βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα, συμβάλλοντας έτσι στην αποδυνάμωσή του. Κατά συνέπεια, τα συγκεκριμένα ένζυμα μεταβάλλουν με διαφορετικό τρόπο το κυτταρικό τοίχωμα, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση διαφορετικών συστατικών του φυτικού δείγματος.<sup>[60]</sup>

## 3. Αντιοξειδωτικά

---

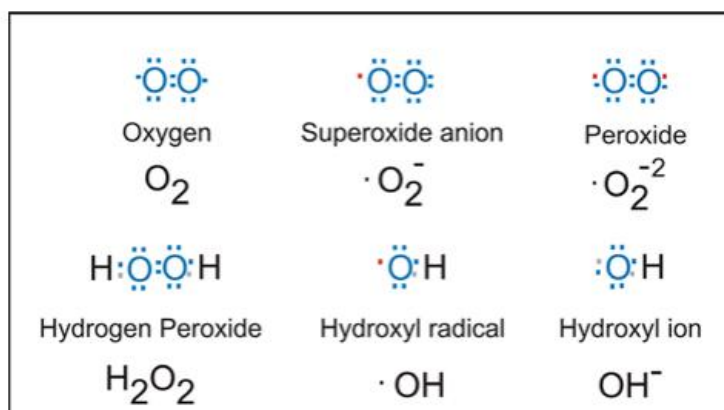
### 3.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία είναι ασταθή και ιδιαίτερα δραστικά κατά τις χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια και θεωρούνται κύρια πηγή γήρανσης.<sup>[63, 64]</sup> Στα βιολογικά συστήματα, οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται συχνά από μόρια οξυγόνου, αζώτου και θείου. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι μέρη ομάδων μορίων που ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και δραστικές μορφές θείου (RSS). Παρότι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού εμπλέκονται σε μία σειρά ρυθμιστικών διαδικασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η απόπτωση και η έκφραση γονιδίων, η δραματική αύξηση των επιπέδων τους (σε περιόδους περιβαλλοντικού στρες και κυτταρικής δυσλειτουργίας) συνδέεται με πληθώρα προβλημάτων.<sup>[64, 65]</sup> Εξωτερικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανεξέλεγκτη παραγωγή των ελεύθερων ριζών είναι το κάπνισμα, οι περιβαλλοντικοί ρύποι, η ακτινοβολία, τα φάρμακα, τα παρασιτοκτόνα και το όζον.<sup>[66]</sup> Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζουν πολλούς μηχανισμούς αντίδρασης με τα περιβάλλοντα μόρια, όπως, αναγωγή των ριζών με αποβολή ηλεκτρονίου και αποδοχή ηλεκτρονίων, οξειδωτικές ρίζες (i), απόσπαση υδρογόνου (ii), αντιδράσεις προσθήκης (iii), αντιδράσεις «αυτοκαταστροφής» (iv) και αυτοοξειδοαναγωγής(v):



Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν στην παραγωγή ROS, RNS και RSS, τα οποία έχουν συνδεθεί με πολλές σοβαρές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης της αρτηριοσκλήρυνσης και του εγκεφαλικού επεισοδίου, οι νευρολογικές και ηπατικές διαταραχές, η υπέρταση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι ασθένειες ανοσοανεπάρκειας, οι εκφυλιστικές

διαταραχές που σχετίζονται με τη γήρανση, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και οι νόσοι όπως το Alzheimer, το Parkinson κλπ.<sup>[66]</sup>



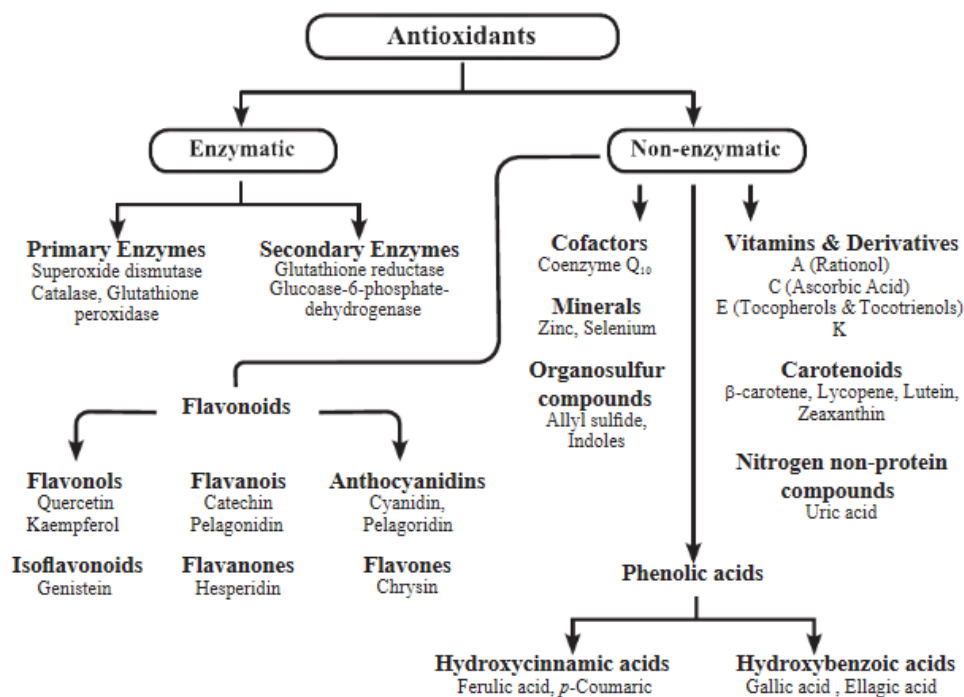
Εικόνα 9: Η ηλεκτρονιακή δομή δραστικών ειδών οξυγόνου (το κόκκινο  $\cdot$  υποδηλώνει ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο)<sup>[67]</sup>

Ως αποτέλεσμα, ο οργανισμός έχει αναπτύξει ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα για την εξουδετέρωση αυτών των ριζών.<sup>[63]</sup> Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία ειδική κατηγορία ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά, τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από αυτές. Τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της διαδικασίας της οξείδωσης άλλων μορίων, δηλαδή της μεταφοράς ηλεκτρονίων από μία ουσία σε μία άλλη.<sup>[64]</sup>

### 3.2 Γενικά χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που μπορούν να δώσουν ή να πάρουν ηλεκτρόνια, με σκοπό να περιορίσουν την ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων στις ρίζες και επομένως να τις εξαλείψουν. Μπορούν, δηλαδή, να αντιδράσουν άμεσα με τις δραστικές ρίζες και είτε να τις καταστρέψουν είτε να τις μετατρέψουν σε λιγότερο επικίνδυνες και δραστικές είτε να διακόψουν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης.<sup>[5, 63]</sup> Με άλλα λόγια, αντιοξειδωτικές ορίζονται οι ενώσεις που αναστέλλουν, επιβραδύνουν ή εμποδίζουν την οξείδωση των υποστρωμάτων όταν βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το συγκεκριμένο υπόστρωμα.<sup>[5, 68]</sup> Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες αντιοξειδωτικών, τα φυσικά και τα συνθετικά. Η ακριβής ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών βασίζεται στον τρόπο λειτουργίας τους. Ανάλογα με τις χημικές τους ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται και η δράση τους, διακρίνονται σε πρωτοταγή και δευτεροταγή.<sup>[69]</sup> Οι κατηγορίες αυτές θα αναλυθούν εν συντομία, ενώ θα γίνει εκτενέστερη αναφορά σε κάποια φυσικά αντιοξειδωτικά και συγκεκριμένα στις φαινολικές ενώσεις και στα φλαβονοειδή, τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διπλωματικής.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ακριβής κατηγοριοποίηση των αντιοξειδωτικών:



Εικόνα 10: κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών<sup>[70]</sup>

## 3.3 Είδη αντιοξειδωτικών

### 3.3.1 Φυσικά-συνθετικά αντιοξειδωτικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε φυσικά και συνθετικά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά αποτελούν το βασικό μέρος του αμυντικού μηχανισμού των κυττάρων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες, η βιταμίνη D, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι μεταβολίτες υψηλού μοριακού βάρους όπως οι τανίνες.<sup>[65]</sup> Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δημιουργήθηκαν προκειμένου να υπάρχει ένα τυπικό σύστημα μέτρησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας με σκοπό τη σύγκριση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Αυτές οι ενώσεις προστίθενται στα τρόφιμα έτσι ώστε αυτά να μπορούν να αντέξουν σε διάφορες συνθήκες και επεξεργασίες, καθώς και για να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής τους. Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και BHA βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) είναι τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά αντιοξειδωτικά.<sup>[66]</sup> Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά δεν προτιμώνται για φαρμακολογική χρήση εξαιτίας τοξικολογικών ανησυχιών. Συνεπώς, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων που περιέχουν φυσικά αντιοξειδωτικά.



Αυτά τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων παθήσεων.<sup>[63]</sup> Τα περισσότερα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι φαινολικές ενώσεις, όπως λακτόνες, κινόνες ή πολυφαινόλες, οι οποίες, με εξαίρεση τις τοκοφερόλες, περιέχουν ορθο-υποκατεστημένες δραστικές ομάδες, ενώ τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, με εξαίρεση τους εστέρες του γαλλικού οξέος, είναι φαινολικές ενώσεις, παρα-υποκατεστημένες, με ποικίλους βαθμούς αντικατάστασης αλκυλίου.<sup>[69, 71]</sup> Ο τρόπος παραλαβής των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι είτε σε μορφή εκχυλίσματος είτε σε μορφή αιθέριου ελαίου. Στην πρώτη περίπτωση, η αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται από:

- Τις συνθήκες εκχύλισης
- Την πολικότητα του διαλύτη<sup>[12, 72]</sup>

### 3.3.2 Πρωτοταγή-δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

#### 3.3.2.1 Γενικά

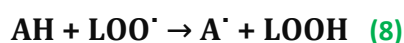
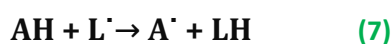
Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε πέντε βασικές κατηγορίες:

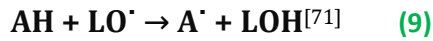
- Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά
- Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά
- Ενζυμικά αντιοξειδωτικά
- Δεσμευτές οξυγόνου
- Χηλικοί παράγοντες<sup>[73]</sup>

Γενικά, τα πρωτοταγή (chain-breaking) αντιοξειδωτικά, μπορούν να αντιδράσουν με τις λιπιδικές ρίζες και να τις μετατρέψουν σε πιο σταθερά προϊόντα, ενώ τα δευτεροταγή ή προληπτικά αντιοξειδωτικά μειώνουν το ρυθμό έναρξης της αλυσιδωτής αντίδρασης με διάφορους μηχανισμούς.<sup>[73]</sup>

#### 3.3.2.2 Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά τερματίζουν την αλυσιδωτή αντίδραση των ελεύθερων ριζών, παρέχοντας άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τη μετατροπή των τελευταίων σε πιο σταθερά προϊόντα.<sup>[65, 71]</sup> Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά παράγονται από δευτεροταγή αντιοξειδωτικά, μέσω της παροχής ηλεκτρονίων υδρογόνου στις πρωτοταγείς αντιοξειδωτικές ρίζες.<sup>[64]</sup> Αυτά είναι αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερα επίπεδα μπορούν να μετατραπούν σε προ-οξειδωτικά. Οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά φαίνονται παρακάτω:





Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά έχουν κατά κύριο λόγο φαινολική δομή και διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

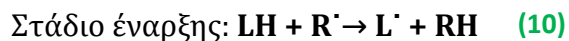
- i. Αντιοξειδωτικά ένζυμα
- ii. Αντιοξειδωτικές βιταμίνες
- iii. Αντιοξειδωτικά μεταλλικά στοιχεία
- iv. Φυτοχημικά<sup>[65]</sup>

### 3.3.2.3 Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Οι ενώσεις που καθυστερούν το ρυθμό αυτοοξειδωσης των λιπιδίων, με μεθόδους διαφορετικές από εκείνες της διακοπής της αντίδρασης αυτό-οξειδωσης μέσω της μετατροπής των ελευθέρων ριζών σε πιο σταθερά είδη, ονομάζονται δευτεροταγή αντιοξειδωτικά.<sup>[64, 73]</sup> Αυτά έχουν προληπτικό ρόλο και δρουν μειώνοντας το ρυθμό έναρξης της αλυσιδωτής αντίδρασης μέσω διάφορων μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ενώσεις που δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και οξυγόνο, αντιδρούν με χηλικά μέταλλα, αναστέλλουν οξειδωτικά ένζυμα, μετατρέπουν τα υδροπεροξειδία σε μη ριζικά είδη ή απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία.<sup>[64, 65, 73]</sup>

## 3.4 Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών

Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης έχει τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης και περιλαμβάνει τα στάδια έναρξης, διάδοσης και τερματισμού. Στην έναρξη των συγκεκριμένων αντιδράσεων συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η θερμότητα, το φως, ηιονίζουσα ακτινοβολία, η ύπαρξη μεταλλικών ιόντων και οι μεταλλοπρωτεΐνες. Παρακάτω καταγράφεται ο συγκεκριμένος μηχανισμός:

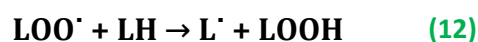
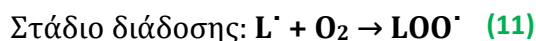


Όπου,

LH: το λιπαρό υπόστρωμα

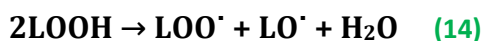
R<sup>•</sup>: ο αντιοξειδωτικός παράγοντας

L<sup>•</sup>: η ρίζα, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή δραστηριότητα



Στο συγκεκριμένο στάδιο, οι ρίζες (L<sup>•</sup>) αντιδρούν με το οξυγόνο προς το σχηματισμό υπεροξειδικών ριζών (LOO<sup>•</sup>), οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνουν

περαιτέρω το υπόστρωμα, δημιουργώντας υπεροξειδία (LOOH). Τα υπεροξειδία αυτά μπορούν να διασπαστούν σε αλδεΐδες, αλκοόλες, κετόνες, υδρογονάνθρακες και αλκοξυλ-ρίζες:



Στάδιο τερματισμού:  $\text{LO}^\bullet + \text{LO}^\bullet \rightarrow$  αδρανή προϊόντα



Στο συγκεκριμένο στάδιο, πραγματοποιείται ο συνδυασμός ριζών προς το σχηματισμό αδρανών προϊόντων.<sup>[65]</sup>

### 3.5 Παράμετροι αντιοξειδωτικής δράσης

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται με τον τύπο και τη δομή των φαινολικών ενώσεων και όχι μόνο με την ποσότητα αυτών. Αυτό συμβαίνει επειδή πιθανότατα όλες οι φαινολικές ενώσεις δεν διαθέτουν συνθετικές ρίζες. Είναι επίσης πιθανό ότι η ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων αποδίδεται στην ύπαρξη υδροξυλίων. Επικρατεί, δηλαδή, η άποψη ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται με αύξηση του αριθμού των ελεύθερων υδροξυλίων και με σύζευξη των πλευρικών αλυσίδων με τους αρωματικούς δακτύλιους.<sup>[68]</sup> Ως αποτέλεσμα, τα φαινολικά οξέα, που διαθέτουν πολλά υδροξύλια, τα οποία δρουν και ως δωρητές υδρογόνου, θεωρούνται ιδανικά για την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών και χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.<sup>[72]</sup> Ακόμη, η θέση των φαινολικών ομάδων υδροξυλίου και η παρουσία άλλων λειτουργικών ομάδων σε ολόκληρο το μόριο, όπως οι διπλοί δεσμοί και η σύζευξή τους με υδροξυλομάδες και κετονικές ομάδες, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την αντιοξειδωτική δράση. Τέλος, η πολικότητα και η υδροφοβικότητα των αντιοξειδωτικών έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική τους δράση, ειδικά στα συστήματα με βιομεμβράνες.<sup>[74]</sup>

### 3.6 Αντιοξειδωτική δράση δενδρολίβανου

Η αντιοξειδωτική δράση του δενδρολίβανου αποδίδεται κυρίως στο καρνοσικό οξύ, την καρνοσόλη και το ροσμαρινικό οξύ.<sup>[74]</sup> Τα παραπάνω συστατικά εντάσσονται στην κατηγορία των πρωτοταγών αντιοξειδωτικών.<sup>[69]</sup> Ακόμη, η παρουσία μίας ομάδας κατεχόλης στον αρωματικό δακτύλιο (C11 C12) του σκελετού των φαινολικών διτερπενίων του δενδρολίβανου είναι ένα από τα πιο σημαντικά δομικά στοιχεία όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα

αυτού.<sup>[15]</sup> Όσον αφορά το καρνοσικό οξύ, η φαινολική περιοχή του είναι κυρίως υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική του δράση. Όπως και σε άλλες φαινολικές ενώσεις, ο πιο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο το καρνοσικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό είναι η προσφορά υδρογόνου ή η θραύση της αλυσίδας. Ως αποτέλεσμα, σχηματίζεται ένα ριζικό είδος, το οποίο συνδέεται με τις αναδιατάξεις στη δομή του καρνοσικού οξέος. Η πιο πιθανή αντίδραση ή αναδιάταξη είναι η δωρεά του δεύτερου υδρογόνου προς το σχηματισμό μίας ο-κινόνης που μπορεί στη συνέχεια να σχηματίσει την καρνοσόλη.<sup>[69]</sup>

Αντίστοιχα, η πολυφαινολική δομή του ροσμαρινικού οξέος έχει συσχετισθεί με την αντιοξειδωτική του ικανότητα.<sup>[75]</sup> Το ροσμαρινικό οξύ έχει δύο δακτυλίους κατεχόλης, Α και Β, συζευγμένους με μία ομάδα καρβοξυλικού οξέος, οι οποίοι μπορούν να οξειδωθούν στις αντίστοιχες ο-κινόνες, μέσω αυτοοξείδωσης, δημιουργώντας ROS.<sup>[15, 75]</sup> Η αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να σχετίζεται και με την ικανότητα της κατεχόλης να σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου μεταξύ του ελεύθερου υδρογόνου της υδρόξυ- και της φαινόξυ-ρίζας του, βελτιώνοντας έτσι τη ριζική του σταθερότητα.<sup>[69]</sup> Το πλεονέκτημα του ροσμαρινικού οξέος είναι η παρουσία τεσσάρων φαινολικών υδρογόνων, τα οποία μπορούν να εμπλακούν σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, ενώ το καρνοσικό οξύ περιέχει δύο φαινολικές ομάδες υδροξυλίου.<sup>[69, 74]</sup> Επιπλέον, η παρουσία φλαβονών στο εκχύλισμα δενδρολίβανου υποδεικνύει μια πιθανή συνεργιστική συμπεριφορά στη διάσπαση των ελευθέρων ριζών.<sup>[15]</sup>

## 3.7 Μέθοδοι εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης

### 3.7.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η αντιοξειδωτική δράση των φυσικών και συνθετικών ενώσεων προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας διάφορες μεθοδολογίες. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον τύπο των αντιοξειδωτικών που προσδιορίζονται (λιπόφιλα ή υδρόφιλα, ενζυματικά ή μη ενζυματικά), το χαρακτήρα του διαλύτη (υδατικός ή οργανικός), τον τύπο του αντιδραστήριου (ριζικό ή μη ριζικό) και το μηχανισμό της αντίδρασης (μεταφορά ατόμων υδρογόνου, μεταφορά ηλεκτρονίων κλπ).<sup>[76]</sup> Γενικά, οι διάφορες αναλυτικές μέθοδοι χωρίζονται σε τρεις διακριτές κατηγορίες, τις φασματομετρικές, τις ηλεκτροχημικές και τις χρωματογραφικές.<sup>[70]</sup> Όλες οι μέθοδοι βασίζονται είτε στην αντίδραση μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου είτε στην αντίδραση μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό σε μία ελεύθερη ρίζα. Η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης του αντιοξειδωτικού μετράται για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης.<sup>[63]</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι παρότι έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι, τα αποτελέσματα αυτών πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή, καθώς πολλές μεταβλητές είναι ικανές να επηρεάσουν την ακρίβεια της κάθε μεθόδου. Συνεπώς, δεν υπάρχει καθολικό σύστημα, ικανό να παρέχει

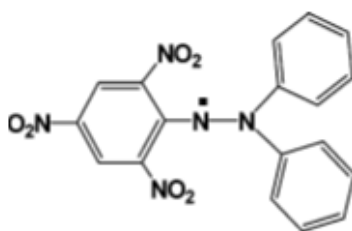
πληροφορίες σχετικά με την ακριβή αντιοξειδωτική ισχύ ενός μόνο αντιοξειδωτικού ή ενός πολύπλοκου μείγματος αντιοξειδωτικών. Τέλος, δεδομένου ότι η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται από το υπόστρωμα, τις συνθήκες οξείδωσης και τα διεπιφανειακά φαινόμενα, η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων συχνά δεν συνίσταται.<sup>[77]</sup>

### 3.7.2 Μέθοδος DPPH

Η δοκιμή DPPH, ή αλλιώς μέτρηση της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου, είναι μία από τις πιο δημοφιλείς και συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.<sup>[76, 78]</sup> Αναπτύχθηκε από τον Blois το 1958 και τροποποιήθηκε από τους Brand-Williams et al. το 1995.<sup>[76, 79]</sup> Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην φασματομετρική μέτρηση της καταστροφής του DPPH κατά την αντίδρασή του με ένα αντιοξειδωτικό ή στον ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό (EPR).<sup>[78]</sup> Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αντιδράσεις:



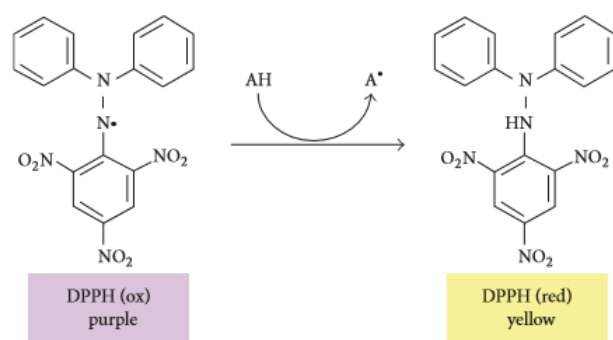
Όπως φαίνεται παραπάνω, αυτή η μέθοδος μετρά την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μειώνουν τη ρίζα του 2,2-διφαινυλο-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH<sup>·</sup>), μία ρίζα που δεν απαντάται συνήθως στα βιολογικά συστήματα.<sup>[70]</sup> Πιο αναλυτικά, η DPPH<sup>·</sup> είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα αζώτου, εμπορικά διαθέσιμη, που εμφανίζει βαθύ πορφυρό χρώμα και ισχυρή απορρόφηση στα 515nm.<sup>[74, 76, 80]</sup> Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που εμφανίζονται στο μέσο μετατρέπουν τη ρίζα DPPH<sup>·</sup> σε ένα πιο σταθερό μόριο DPPH, δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Συνεπώς, παρατηρείται αλλαγή χρώματος από πορφυρό σε ανοιχτό κίτρινο, το οποίο επιτρέπει τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης.<sup>[74, 76]</sup>



Εικόνα 11: η δομή της ρίζας DPPH<sup>·</sup><sup>[80]</sup>

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν είτε μέσω του δείκτη IC<sub>50</sub>, που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που προκαλεί 50% μείωση της ρίζας DPPH<sup>·</sup>, είτε ως ποσοστό αναστολής της ρίζας DPPH<sup>·</sup> σε σταθερή

συγκέντρωση αντιοξειδωτικού για όλα τα δείγματα, είτε ως ισοδύναμα L-ασκορβικού οξέος.<sup>[76, 78, 80]</sup>



Εικόνα 12: Η αρχή της ικανότητας δέσμευσης των ριζών DPPH<sup>[81]</sup>

### 3.7.2.1 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα της μεθόδου DPPH

Η μέθοδος DPPH θεωρείται απλή, αποδοτική, σχετικά φθηνή και γρήγορη.<sup>[76]</sup> Απαιτεί τη χρήση μόνο ενός φασματόμετρου UV-Vis, γεγονός που πιθανώς να εξηγεί τη διαδεδομένη χρήση της.<sup>[80]</sup> Ακόμα ένα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το DPPH αφήνεται να αντιδράσει με όλο το δείγμα, ακόμη και με τα ασθενή αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σύνθετα βιολογικά συστήματα, για στερεά ή υγρά δείγματα, σε πολικούς και σε υδατικούς διαλύτες και για την εξέταση τόσο λιπόφιλων όσο και υδρόφιλων αντιοξειδωτικών.<sup>[82]</sup>

Ωστόσο, η ερμηνεία της είναι δύσκολη όταν οι μετρούμενες ενώσεις περιλαμβάνουν φάσματα που υπερκαλύπτουν το DPPH στα 515nm. Πολλά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν γρήγορα με τις ρίζες υπεροξυλίου, μπορεί να αντιδράσουν αργά ή ακόμα και να είναι αδρανή στο DPPH, εξαιτίας στερικής παρεμπόδισης. Επιπλέον, το DPPH αποχρωματίζεται είτε από αναγωγικούς παράγοντες, όπως το φως, είτε από τη μεταφορά υδρογόνου, γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία ανακρίβειών.<sup>[80]</sup> Τέλος, συχνά είναι σημαντική η σύγκριση των αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων των φυτικών εκχυλισμάτων, τα οποία μπορεί να περιέχουν περισσότερα από ένα αντιοξειδωτικά συστατικά, με την αντίστοιχη των μεμονωμένων καθαρών αντιοξειδωτικών, προκειμένου να προσδιορισθεί η πιθανή αλληλεπίδραση (συνεργική δράση) μεταξύ των αντιοξειδωτικών. Επομένως, αν το παραπάνω δεν πραγματοποιηθεί, είναι πιθανό να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα.<sup>[74]</sup>

## 4. Φαινολικές ενώσεις

---

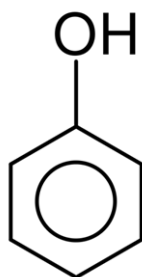
### 4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα φυτά συνθέτουν μία ποικιλία οργανικών μορίων που ορίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτοί συμμετέχουν σε πολλές λειτουργίες που αφορούν τόσο τη δομή όσο και την προστασία των φυτών.<sup>[83]</sup> Συγκεκριμένα, πρόκειται για οργανικές ενώσεις που δεν εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξη ενός οργανισμού, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών, καθώς τα προστατεύουν από κινδύνους όπως η μόλυνση, ο τραυματισμός και η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανίες, ως αντιοξειδωτικά τροφίμων, αντιμικροβιακά συστατικά και φαρμακευτικά προϊόντα.<sup>[76]</sup>

Τα φυτά περιέχουν διάφορους τύπους ενώσεων με αντιοξειδωτικές δράσεις, όπως βιταμίνες (A, C, E), καροτονοειδή, φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, τανίνες, λιγνίνες κλπ.<sup>[76]</sup> Μεταξύ όλων των δευτερογενών μεταβολιτών, τα φαινολικά είναι αυτά που παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Τα φυτικά φαινολικά ταξινομούνται κυρίως στις εξής πέντε ομάδες:

- Φαινολικά οξέα
- Λιγνάνες
- Φλαβονοειδή
- Στιλβένια
- Τανίνες<sup>[68]</sup>

Αυτά χρησιμοποιούνται στην άμυνα των οργανισμών, στην απομάκρυνση ή στην αποτροπή του σχηματισμού ROS και στην αποφυγή μοριακών και άλλων βλαβών.<sup>[76]</sup>



Εικόνα 13: βασική χημική δομή φαινόλης<sup>[84]</sup>



Τα φυτά περιέχουν μία μεγάλη και ετερογενή ομάδα βιολογικά δραστικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει μία υποομάδα γνωστή ως φαινολικές ενώσεις. Οι φαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθεται από τα φυτά και υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες σε πολλά φρούτα, φυτά, λαχανικά, δημητριακά, ποτά και άλλα φυτικά προϊόντα.<sup>[85]</sup> Η ποσότητα των φαινολών στους φυτικούς ιστούς ποικίλλει ανάλογα με το είδος, την ηλικία και το βαθμό αποσύνθεσης του φυτού.<sup>[86]</sup> Αυτές ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά και είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στον φαινολικό δακτύλιο.<sup>[87]</sup> Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις των φυτών χαρακτηρίζονται ως αρωματικοί μεταβολίτες που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου.<sup>[86-89]</sup> Ανάλογα με τον αριθμό των υποκαταστατών υδροξυλίου που περιέχουν κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως πολυμερισμένες ενώσεις.<sup>[90]</sup> Με άλλα λόγια, οι φαινόλες μπορούν να θεωρηθούν μονομερή αν περιέχουν μία ομάδα υδροξυλίου, ενώ αυτές που περιέχουν πολλούς φαινολικούς υποκαταστάτες ορίζονται ως πολυφαινόλες.<sup>[86]</sup> Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στη φύση είναι παρούσες ως προϊόντα σύζευξης με μόνο- ή πολυσακχαρίτες ή μπορούν να εμφανισθούν ως λειτουργικά παράγωγα όπως εστέρες ή μεθυλεστέρες.<sup>[90]</sup>

## 4.2 Ταξινόμηση φαινολών

Τα φαινολικά οξέα (υδροξυκινναμωμικά (HCAs) και υδροβενζοϊκά οξέα), τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και οι τανίνες αντιπροσωπεύουν τις κύριες κατηγορίες φαινολικών,<sup>[85, 87-89]</sup> οι οποίες έχει βρεθεί ότι αποτελούν περίπου το 40% του οργανικού άνθρακα στη βιόσφαιρα.<sup>[88]</sup> Αυτά διαφέρουν ως προς το μέγεθος, την πολυπλοκότητα και τη δραστηριότητα.<sup>[89]</sup> Κάθε κατηγορία διαιρείται σε περαιτέρω υποομάδες ανάλογα με τη χημική της δομή.<sup>[85]</sup> Οι διαφορές στη χημική δομή αυτών των συστατικών προσδίδουν διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η διαλυτότητα, η θερμική και η χημική σταθερότητα και η ικανότητα σύνδεσης με άλλες ενώσεις. Για παράδειγμα, το μοριακό βάρος και η ελαστικότητα διαμόρφωσης έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν την τάση τους να συγκρατούνται στο κυτταρικό τοίχωμα του φυτού.<sup>[47]</sup> Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων:

Πίνακας 6: κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων<sup>[90]</sup>

Κατηγορία	Δομή
Απλές φαινόλες, βενζοκινόνες	C <sub>6</sub>
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub>
Ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα	C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub>
Υδροξυκινναμωμικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή (π.χ. κουμαρίνες, χρωμόνες)	C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub>
Ναφθοκινόνες	C <sub>6</sub> – C <sub>4</sub>

Ξανθόνες	$C_6 - C_1 - C_6$
Στιλβένια, ανθρακινόνες	$C_6 - C_2 - C_6$
Φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή	$C_6 - C_3 - C_6$
Λιγνάνες, νεολιγνάνες	$(C_6 - C_3)_2$
Διφλαβονοειδή	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Λιγνίνες	$(C_6 - C_3)_n$
Συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανίνες ή φλαβολάνες)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι οι φαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε:

- φαινόλες του κυτταρικού τοιχώματος, οι οποίες συνδέονται με πολυσακχαρίτες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου
- φαινόλες που δεν ανήκουν στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίες είτε βρίσκονται στα κενοτόπια του φυτού είτε σχετίζονται με τον πυρήνα των κυττάρων

Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις του κυτταρικού τοιχώματος, δύο μηχανισμοί σύνδεσης έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τον σχηματισμό του συμπλέγματος πολυσακχαριτών-φαινολών:

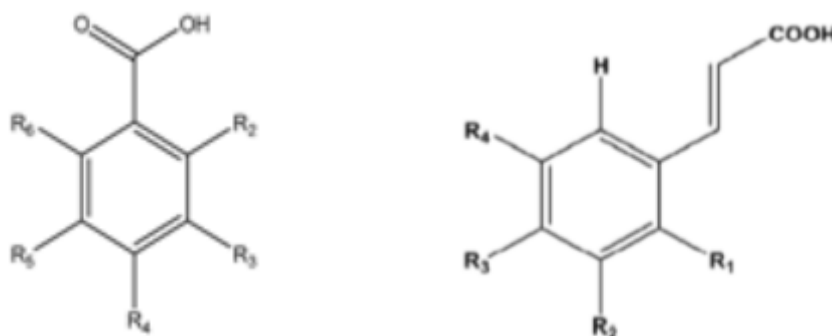
- δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου των φαινολών και των ατόμων υδρογόνου των αιθερικών δεσμών των σακχάρων που υπάρχουν στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος
- υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, που συμβαίνουν εξαιτίας της ικανότητας ορισμένων πολυσακχαριτών να αναπτύσσουν δευτεροταγείς δομές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υδρόφοβων περιοχών.<sup>[49]</sup>

### 4.2.1 Φαινολικά οξέα

Ο όρος «φαινολικά οξέα» αναφέρεται στις φαινόλες που διαθέτουν μία χαρακτηριστική ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα περιέχουν δύο διακριτές δομές άνθρακα: την υδροξυκιναμωμική και την υδροβενζοϊκή δομή (εικόνα 16). Αν και ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, οι αριθμοί και οι θέσεις των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο διαφοροποιούνται και δημιουργούν την ποικιλία των παραπάνω συστατικών.<sup>[83]</sup> Πιο αναλυτικά, τα φαινολικά οξέα συνήθως χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, τα βενζοϊκά οξέα που περιέχουν 7 άτομα άνθρακα (C6-C1) και τα κινναμωμικά οξέα που περιλαμβάνουν 9 άτομα άνθρακα (C6-C3). Αυτά μπορούν να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη είτε σε δεσμευμένη μορφή.<sup>[81]</sup> Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει το γαλλικό, το p-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλικό και το συριγγικό οξύ. Από την άλλη πλευρά, η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από αρωματικές ενώσεις με πλευρική ομάδα τριών ατόμων άνθρακα, όπου τα συνηθέστερα είναι το καφεϊκό, το

φερουλικό, το p-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ.<sup>[90]</sup> Το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το βανιλικό και το φερουλικό είναι οξέα που υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα φυτά.<sup>[83]</sup>

Τα κινναμωνικά οξέα θεωρούνται δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Βρίσκονται σε αφθονία στα φύλλα τσαγιού και καφέ, στο κόκκινο κρασί, σε διάφορα φρούτα και λαχανικά και στα δημητριακά ολικής άλεσης. Έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν θετική επίδραση έναντι ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι φλεγμονές και ο καρκίνος. Η αντιοξειδωτική δράση αυτών συνδέεται με την παρουσία υδροξυλικών ομάδων στην αρωματική τους δομή και με την ικανότητά τους να δίνουν ηλεκτρόνια ή υδρογόνα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα δομικά τους χαρακτηριστικά και τη σταθερότητα των φαινοξυ-ριζών.<sup>[81]</sup> Τα βενζοϊκά οξέα συνήθως δεν βρίσκονται ελεύθερα στα φυτά. Συμμετέχουν στη δομή ταννινών και αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά τους.<sup>[83]</sup>



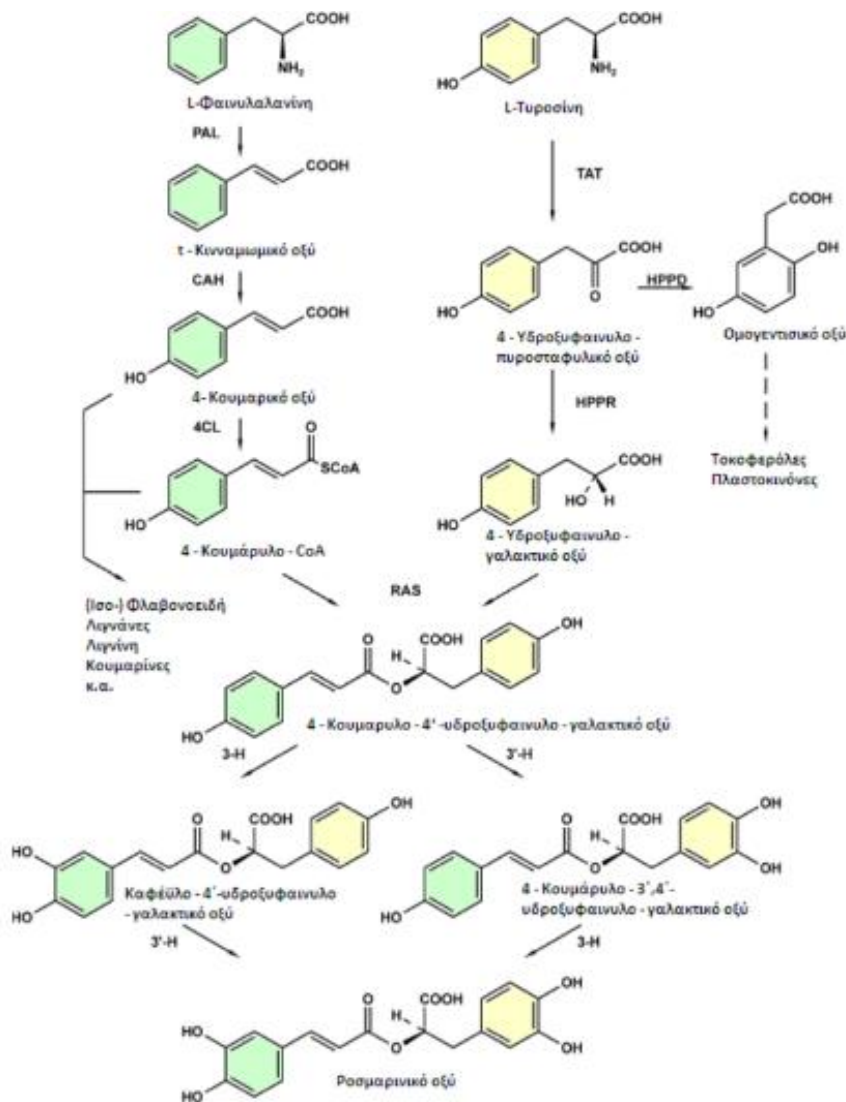
Εικόνα 14: Η χημική δομή του κινναμωμικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος αντίστοιχα<sup>[91]</sup>

#### 4.2.1.1 Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>) είναι μία φαινολική ένωση και συγκεκριμένα ένας οξικός υδατοδιαλυτός εστέρας του καφεϊκού οξέος και του 3,4-διϋδροξυ-φαινυλο-γαλακακτικού οξέος.<sup>[75, 92-94]</sup> Αυτό απαντάται σε πολλά φυτά της οικογένειας Lamiaceae, συμπεριλαμβανομένου του δενδρολίβανου (από το οποίο απομονώθηκε αρχικά το 1958), του φασκόμηλου, του βασιλικού, της ρίγανης και της μαντζουράνας<sup>[92, 95]</sup> και έχει βρεθεί και σε άλλες οικογένειες φυτών όπως η Apiaceae.<sup>[75, 92]</sup> Κύρια πηγή ροσμαρινικού οξέος είναι το δενδρολίβανο.<sup>[75]</sup> Η δομή του προέρχεται από δύο αμινοξέα, το καφεϊκό οξύ από τη φαινυλαλανίνη και το 3,4-διϋδροξυ-φαινυλο-γαλακακτικό οξύ από την τυροσίνη. Το ροσμαρινικό οξύ είναι ένα μόριο με υδρόφιλες ιδιότητες και έχει συνήθως τη μορφή κόκκινης-πορτοκαλί σκόνης. Το σημείο τήξης του είναι στους 171-175°C (340-347°F) και η γραμμομοριακή του μάζα είναι 360,32  $\frac{g}{mol}$ .<sup>[94]</sup>

Το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει πληθώρα ευεργετικών, για την υγεία, δραστηριοτήτων. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι εμφανίζει αντιοξειδωτική,

αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, ανθελμινθική, κοκκιδιοστατική, ενδοκρινική και ανοσοδιεγερτική δράση.<sup>[92, 94]</sup> Έχει βρεθεί ότι μειώνει τα επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα και βελτιώνει την πιθανή ευαισθησία στην ινσουλίνη, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή αντι-διαβητική δράση.<sup>[93]</sup> Εμφανίζει, ακόμη, αντικά, αντιβακτηριακά, αντιηπατικά, αντιαλλεργικά, αντιμυκητιακά και αντικαρκινογόνα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην αναστολή του HIV και της πήξης του αίματος και στην πρόληψη του βρογχικού άσθματος, του καταρράκτη, της ηπατοτοξικότητας και της αρτηριοσκλήρυνσης.<sup>[75]</sup> Η πολυφαινολική δομή του ροσμαρινικού οξέος έχει συσχετισθεί με την προοξειδωτική και την αντιοξειδωτική του δράση. Συγκεκριμένα, αυτό έχει δύο διφαινολικούς δακτυλίους (A και B), με δύο υδροξυλομάδες ο καθένας, οι οποίοι μπορούν να χρησιμεύσουν ως δωρητές υδρογόνου και χηλικών μετάλλων.<sup>[96]</sup> Τέλος, μπορεί να θεωρηθεί και προοξειδωτικό λόγω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>[75]</sup>



Εικόνα 15: Ο προτεινόμενος μηχανισμός βιοσύνθεσης του ροσμαρινικού οξέος<sup>[95]</sup>

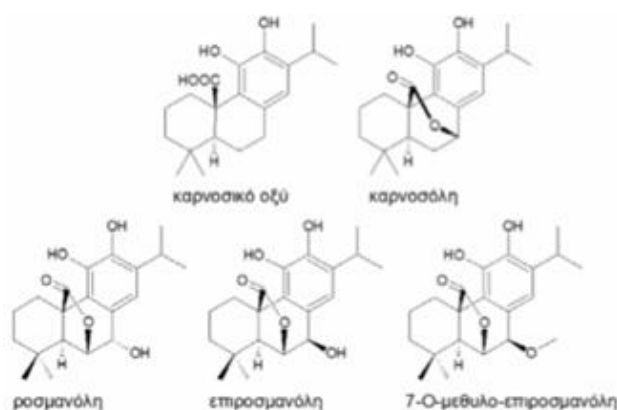
#### 4.2.1.2 Καρνοσικό οξύ

Το καρνοσικό οξύ είναι ένα φαινολικό διτερπένιο με μοριακό τύπο  $C_{20}H_{28}O_4$ .<sup>[92, 97, 98]</sup> Βρίσκεται σε φυτά της οικογένειας *Salvia* ή της οικογένειας *Lamiaceae*, όπως το δενδρολίβανο και το φασκόμηλο, και θεωρείται πρόδρομο συστατικό άλλων διτερπενοειδών ενώσεων.<sup>[92, 97]</sup> Το δενδρολίβανο θεωρείται η κύρια πηγή καρνοσικού οξέος. Το περιεχόμενο των φυτών σε καρνοσικό οξύ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης. Για παράδειγμα, έρευνες έχουν δείξει ότι η ακτινοβολία UV-B οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις καρνοσικού οξέος, ενώ το νερό, η αλατότητα, το έντονο φως και το θερμικό στρες επηρεάζουν αρνητικά τις συγκεντρώσεις του καρνοσικού οξέος. Αυτό ανήκει στη μεγαλύτερη κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών που ονομάζονται τερπενοειδή ή αλλιώς τερπένια ή ισοπρενοειδή. Επειδή το καρνοσικό οξύ περιέχει μία φαινολική ομάδα, συχνά εντάσσεται στις πολυφαινόλες. Ωστόσο, η κυτταρική δομή, η βιοσυνθετική οδός και οι ιδιότητές του διαφέρουν από την πλειοψηφία των πολυφαινολικών ενώσεων και μοιάζουν περισσότερο με αυτές των τερπενίων. Το καρνοσικό οξύ ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τους Linde et al. στο φυτό *Salvia officinalis* L. Αργότερα, βρέθηκε καρνοσικό οξύ σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα του φυτού *Rosmarinus officinalis* L. Το καρνοσικό οξύ έχει τυπική δομή ο-διφαινόλης και οξειδώνεται εύκολα.<sup>[98]</sup>

Υπάρχουν πολλά φαινολικά διτερπένια, με παρόμοια δομή με το καρνοσικό οξύ, που έχουν απομονωθεί από φυτά όπως το δενδρολίβανο. Σε αυτά ανήκουν η καρνοσόλη, η ροσμανόλη και η ροσμαριδιφαινόλη, τα οποία αποτελούν και τα κύρια προϊόντα αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος.<sup>[98]</sup> Μάλιστα, έρευνες υποστηρίζουν ότι το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη μέσω μίας οδού οξειδωσης και ισομερισμού, με το σχηματισμό μίας ενδιάμεσης ο-κινόνης.<sup>[97]</sup> Ο σχηματισμός της λαμβάνει χώρα παρουσία οξυγόνου, τόσο μετά τη συγκομιδή των φύλλων όσο και μετά την ξήρανσή τους. Άλλα δευτερεύοντα παράγωγα είναι η επιροσμανόλη και η 7-μεθυλο-επιροσμανόλη. Ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα παραπάνω παράγωγα δημιουργούνται από το καρνοσικό οξύ κατά τις διεργασίες εκχύλισης. Έχουν υποθέσει, μάλιστα, ότι τα φρέσκα φύλλα δενδρολίβανου δεν περιέχουν κανένα από αυτά τα παράγωγα.<sup>[98]</sup>

Το καρνοσικό οξύ εμφανίζει πληθώρα βιολογικών δράσεων. Συγκεκριμένα, τόσο το καρνοσικό οξύ, όσο και τα φυσικά παράγωγά του, όπως η καρνοσόλη και η ροσμανόλη, έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αλλά το πρώτο θεωρείται το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό μεταξύ αυτών.<sup>[92, 97]</sup> Μάλιστα, έχει προταθεί ότι το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη σχετίζονται με το μεγαλύτερο μέρος των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του εκχυλίσματος δενδρολίβανου. Αυτή η συνεισφορά πιθανώς να οφείλεται στην αφθονία του καρνοσικού οξέος σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φαινολικά διτερπένια που υπάρχουν στο δενδρολίβανο.<sup>[98]</sup> Το καρνοσικό οξύ, επίσης, περιέχει έναν αρωματικό δακτύλιο

με δύο υδροξυλομάδες στις ορθο-υποκατεστημένες θέσεις C11 και C12, γεγονός που συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην αντιοξειδωτική του δράση. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, οι γειτονικές υδροξυλομάδες μπορούν να χηλύνουν προοξειδωτικά μέταλλα, εμποδίζοντας έτσι την οξείδωση.<sup>[96]</sup> Επιπρόσθετα, είναι πιθανό ότι το καρνοσικό οξύ προστατεύει τους χλωροπλάστες και ίσως άλλες μεμβράνες από το οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, κατά την ξηρασία ή την φωτοοξείδωση των φύλλων, μπορεί να αποικοδομήσουν τα ROS, με αποτέλεσμα την παραγωγή διτερπενικών αλκοολών, όπως η ισοροσμανόλη και προϊόντων οξείδωσης, συμπεριλαμβανομένων των Ο-μεθυλιωμένων ενώσεων. Έρευνες έχουν δείξει επίσης ότι το καρνοσικό οξύ σταθεροποιεί, προστατεύει και συνεργάζεται με τις τοκοφερόλες και τα καροτονοειδή με σκοπό την φωτοπροστασία των φυτών.<sup>[98]</sup>



Εικόνα 16:: Οι δομές των κύριων και των δευτερευόντων φαινολικών διτερπενίων στα εκχυλίσματα δενδρολίβανου<sup>[99]</sup>

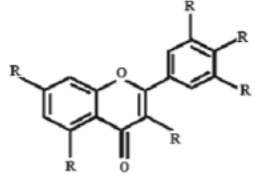
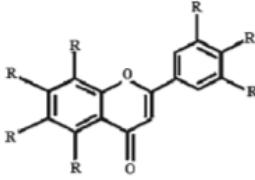
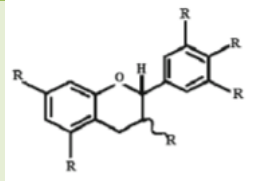
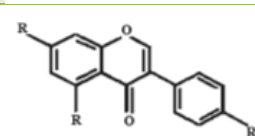
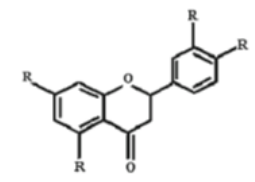
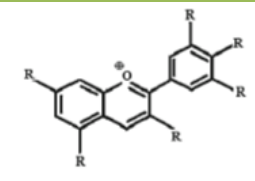
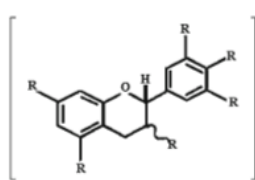
## 4.2.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φυτικών φαινολικών συστατικών. Περισσότερα από 5000 διακριτά φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά.<sup>[85]</sup> Πρόκειται για ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενες από 15 άτομα άνθρακα, διατεταγμένα σε διαμόρφωση C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> (πίνακας 7). Ουσιαστικά, αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτύλιους A και B, ενωμένους με μία γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα, συνήθως σε μορφή οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου, C, με εξαίρεση τις περιπτώσεις των χαλκονών και των διϋδροχαλκονών.<sup>[23, 41, 85, 90, 92, 100]</sup> Ο αρωματικός δακτύλιος A προέρχεται από την acetate/malonate οδό, ενώ ο δακτύλιος B προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της shikimate οδού.<sup>[90]</sup> Παραλλαγές στον τρόπο υποκατάστασης του δακτυλίου C οδηγούν στη διαμόρφωση των βασικότερων κατηγοριών των φλαβονοειδών, στις οποίες ανήκουν οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανόλες (ή κατεχίνες), οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανίνες (γλυκοζυλιωμένο παράγωγο ανθοκυανιδίνης που βρίσκεται σε πολύχρωμα λουλούδια και φρούτα).<sup>[23, 85, 90, 100]</sup> Αυτή η δομική τους διαφοροποίηση οφείλεται εν μέρει στο βαθμό και στο μοντέλο υδροξυλίωσης, μεθοξυλίωσης,

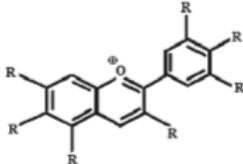
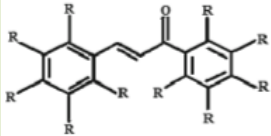


πρενυλίωσης ή γλυκοζιλίωσης.<sup>[23, 41]</sup> Από τις παραπάνω, οι φλαβονόλες και οι φλαβόνες αποτελούν τις πιο συχνά απαντώμενες κατηγορίες φλαβονοειδών.<sup>[90]</sup> Οι ισοφλαβόνες χαρακτηρίζονται από προσάρτηση του δακτυλίου Β στη θέση 2 αντί της θέσης 3. Οι προανθοκυανιδίνες είναι ολιγομερή των φλαβαν-3-ολών. Οι ανθοκυανιδίνες διακρίνονται από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν κατιόντα φλαβυλίου.<sup>[85]</sup> Παρακάτω φαίνεται η χημική δομή των κύριων κατηγοριών των φλαβονοειδών:

Πίνακας 7: χημική δομή κύριων κατηγοριών φλαβονοειδών<sup>[41]</sup>

Τάξεις φλαβονοειδών	Βασική χημική δομή
Φλαβονόλες	
Φλαβόνες	
Κατεχίνες	
Ισοφλαβόνες	
Φλαβανόνες	
Ανθοκυανίνες	
Προανθοκυανιδίνες	



<p style="text-align: center;"><b>Ανθοκυανιδίνες</b></p>	
<p style="text-align: center;"><b>Χαλκόνες</b></p>	

Τα επίπεδα των φλαβονοειδών στα φρούτα και στα λαχανικά εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως ο γονότυπος, οι αγρονομικές πρακτικές (άρδευση, γονιμοποίηση, απομάκρυνση επιβλαβών οργανισμών), οι κλιματολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, φωτισμός, υγρασία και υπεριώδης ακτινοβολία), ο χειρισμός μετά τη συγκομιδή και οι συνθήκες αποθήκευσης.<sup>[85]</sup> Όσον αφορά τις βιολογικές τους δράσεις, αυτά ενισχύουν την αντοχή των κυττάρων κατά του οξειδωτικού στρες, καθώς προλαμβάνουν ή μειώνουν τα επιβλαβή αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες όπως η αρτηριοσκλήρυνση, ο καρκίνος, τα εγκεφαλικά επεισόδια και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.<sup>[100]</sup> Θεωρούνται σημαντικά προστατευτικά θρεπτικά συστατικά έναντι νευρολογικών και καρδιαγγειακών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφαλικού επεισοδίου. Εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και κυτταροπροστατευτική δράση. Άλλη μία ευεργετική δράση είναι η ικανότητά τους να βελτιώνουν τη μνήμη και τη μάθηση.<sup>[92]</sup> Τέλος, παρουσιάζουν, αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς προκαλούν την αδρανοποίηση των δραστικών ριζών, χάρη στην αφθονία των φαινολικών υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο.<sup>[100]</sup> Μάλιστα, αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έχει παρατηρηθεί στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. παρουσία ομάδων υδροξυλίου στις θέσεις 3',4' και 5' του δακτυλίου B
2. παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ του C-2 και C-3 στο δακτύλιο C
3. υποκατάσταση των υδροξυλομάδων στο δακτύλιο B από μεθοξυ-ομάδες.<sup>[90]</sup>

#### 4.2.2.1 Μέθοδος εκτίμησης φλαβονοειδών

Η μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών πραγματοποιείται με τη χρωματομετρική μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου. Αυτή προτάθηκε αρχικά το 1960 για την ανάλυση φυτικών δειγμάτων και βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκων χλωριούχου αργιλίου ( $AlCl_3$ ) και στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του σχηματιζόμενου συμπλόκου.<sup>[101]</sup> Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι το αντιδραστήριο  $AlCl_3$  σχηματίζει σταθερά όξινα σύμπλοκα με τις κετονομάδες C-4 και είτε με την υδροξυλομάδα C-3 είτε την υδροξυλομάδα C-5 των φλαβονοειδών. Συνεπώς, σχηματίζει ασταθή όξινα σύμπλοκα με τις

ορθο-διϋδροξυλομάδες του δακτυλίου A ή B των φλαβονοειδών. Ένδειξη της ύπαρξης φλαβονοειδών στο διάλυμα αποτελεί ο ροζ χρωματισμός του εκάστοτε δείγματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς παράγοντες, όπως ο χρόνος της αντίδρασης και η χημική δομή της πολυφαινόλης, μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Τέλος, σημειώνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα πολλές ενώσεις, όπως η κατεχίνη, η ρουτίνη ή η κερσετίνη, με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση των φλαβονοειδών να εκφράζεται σε ισοδύναμα της επιλεγόμενης ένωσης.<sup>[102, 103]</sup>

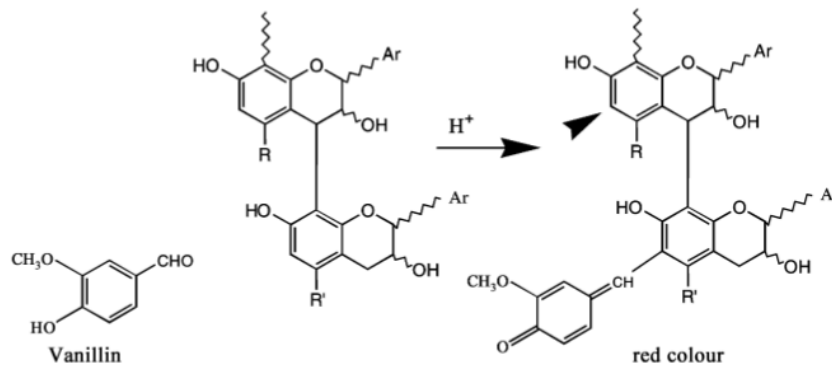
### 4.2.3 Τανίνες

Οι τανίνες, οι σχετικά υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις που αποτελούν την τρίτη σημαντική ομάδα φαινολών, μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες.<sup>[21, 90]</sup> Οι πρώτες είναι εστέρες του γαλλικού οξέος (γαλλο- και ελλαγι- τανίνες), ενώ οι τελευταίες (γνωστές και ως προανθοκυανιδίνες) είναι πολυμερή φλαβαν-3-όλης συνδεδεμένα με δεσμούς άνθρακα.<sup>[90]</sup> Πιο αναλυτικά, η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις που περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή μία πολυόλη εστεροποιημένη με γαλλικό οξύ. Η μεγάλη ποικιλία στη δομή αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές πιθανότητες σχηματισμού οξειδωτικής σύνδεσης. Οι διαμοριακές αντιδράσεις οξείδωσης δημιουργούν πολλές oligομερείς ενώσεις με μοριακό βάρος 2000-5000 Daltons.<sup>[21]</sup> Το βασικό χαρακτηριστικό στο οποίο οφείλουν οι τανίνες τις ιδιότητές τους φαίνεται να είναι η ασυνήθιστα υψηλή συγκέντρωση των ορθο-φαινολικών υδροξυλικών ομάδων. Στις υδρολυόμενες τανίνες, αυτές συνδέονται κυρίως με υπολείμματα γαλλικού ή ελλαγικού οξέος, ενώ στις συμπυκνωμένες τα φαινολικά υδροξύλια του δακτυλίου B παίζουν αυτό το ρόλο.<sup>[104]</sup> Υπάρχει, βέβαια, και μία τρίτη υποομάδα, οι φλοροτανίνες, που αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από φλορογλυκινόλη και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή.<sup>[90]</sup> Η ποικιλία της δομής των τανινών είναι αποτέλεσμα της μεταβολής του πρότυπου υδροξυλίωσης, της στερεοχημείας στα τρία χειρόμορφα κέντρα, της θέσης και του τύπου του δεσμού που αναπτύσσουν, καθώς και του τρόπου μεθοξυλίωσης και γλυκοζυλίωσης.<sup>[21]</sup>

#### 4.2.3.1 Μέθοδος εκτίμησης συμπυκνωμένων τανινών

Η μελέτη των συμπυκνωμένων τανινών έχει δημιουργήσει προβλήματα εξαιτίας της δομικής πολυπλοκότητας αυτών των ενώσεων. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των τανινών είναι η μέθοδος της οξινισμένης βανιλίνης, κατά την οποία η συγκεκριμένη αλδεύδη αντιδρά με τις συμπυκνωμένες τανίνες προς το σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων (εικόνα 19). Σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι ο τύπος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, η φύση και η συγκέντρωση του οξέος, ο χρόνος της αντίδρασης, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της βανιλίνης και ο

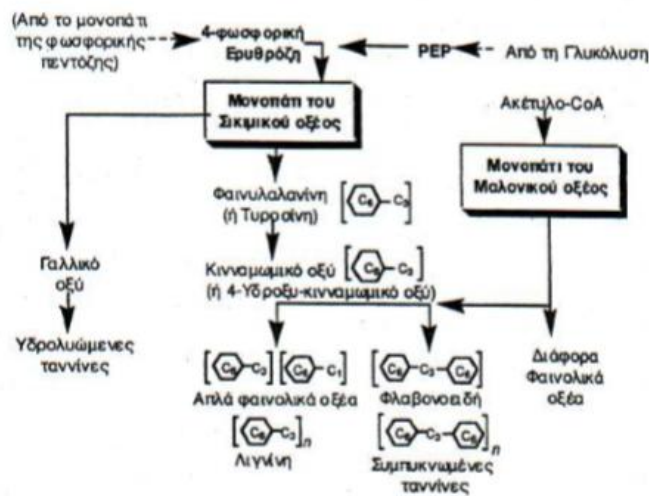
τύπος του χρησιμοποιούμενου πρότυπου αναφοράς.<sup>[104]</sup> Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ο μηχανισμός αντίδρασης που ακολουθείται στην αναφερόμενη μέθοδο:



Εικόνα 17:Ο μηχανισμός μεθόδου βανιλίνης για τον προσδιορισμό των συμπυκνωμένων τανινών<sup>[104]</sup>

### 4.3 Βιοσύνθεση φαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα της οδού των φωσφορικών πεντοζών, της οδού του σικιμικού οξέος, της φαινυλοπροπανοειδούς μεταβολικής οδού ή του μαλονικού οξέος.<sup>[90]</sup>

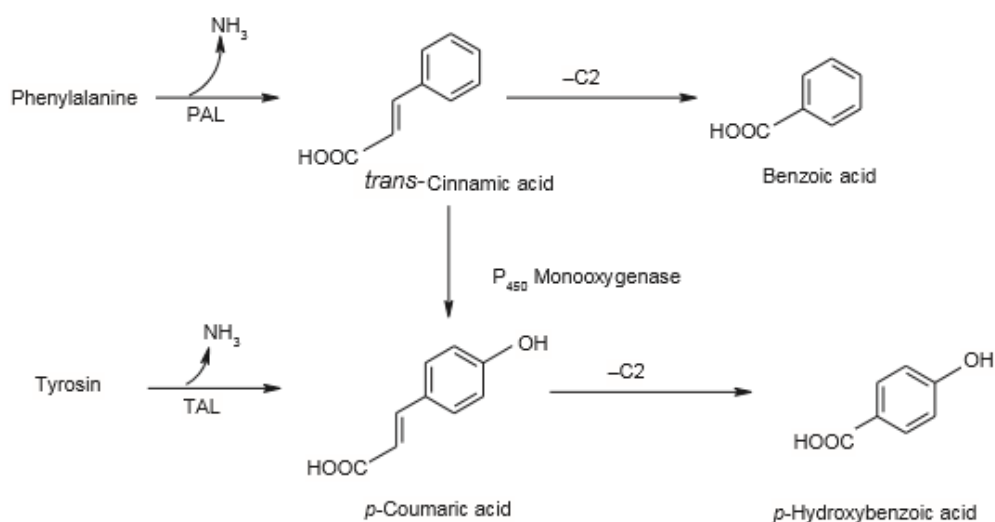


Εικόνα 18: Η βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διάφορα μονοπάτια<sup>[105]</sup>

Η συντριπτική πλειοψηφία των φυτικών φαινολικών ενώσεων συντίθεται από την φαινυλοπροπανοειδή οδό, μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος.<sup>[88]</sup> Δεδομένου ότι ένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα είναι το σικιμικό οξύ, αυτό το μονοπάτι πήρε το συγκεκριμένο όνομα. Οι πρόδρομοι των φαινολικών ενώσεων είναι η φαινυλαλανίνη και, σε μικρότερο βαθμό, η τυροσίνη. Η απομάκρυνση ενός μορίου αμμωνίας από αυτά τα αμινοξέα συμβαίνει μέσω της δράσης της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL) ή της αμμωνιακής λυάσης της τυροσίνης (TAL) αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φαινυλαλανίνη

μπορεί να μετατραπεί σε π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, γαλλικό, πρωτοκατεχικό, χλωρογενικό ή κινναμωμικό οξύ. Τα οξέα αυτά θεωρούνται σπουδαία όχι μόνο γιατί βρίσκονται σε αφθονία σε ελεύθερη μορφή, αλλά διότι μπορούν, μέσω υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης, ενζυματικής τροποποίησης ή προσθήκης υποκαταστατών, να μετατραπούν σε άλλα παράγωγα.<sup>[105, 106]</sup>

Τα κύρια προϊόντα αυτής της οδού είναι τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (HCAs), τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως εστέρες ή να χρησιμεύσουν ως πρόδρομοι για άλλους φαινολικούς μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και της λιγνίνης.<sup>[88]</sup> Η απώλεια ενός τμήματος δύο ατόμων άνθρακα από αυτά οδηγεί στο σχηματισμό της οικογένειας των υδροβενζοϊκών οξέων. Επιπλέον, τα φαινυλοπροπανοειδή μπορούν να αντιδράσουν με τρία μόρια του μηλονυλο συνενζύμου Α προς τον σχηματισμό χαλκονών, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να κυκλοποιηθούν και να οδηγήσουν στο σχηματισμό διάφορων υποκατηγοριών των φλαβονοειδών. Η συμπύκνωση των φαινολών μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό τανινών, τόσο υδρολύσιμων όσο και συμπυκνωμένων.<sup>[106]</sup>



Εικόνα 19: Η παραγωγή φαινολικών οξέων από φαινυλαλανίνη και τυροσίνη<sup>[106]</sup>

## 4.4 Ιδιότητες φαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν καθοριστική φυσιολογική και μορφολογική σημασία για τα φυτά. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή τους, προσφέρουν προστασία έναντι των παθογόνων οργανισμών και συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.<sup>[86, 90]</sup> Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων και χαρακτηρίζονται ως αντι-αλλεργιογόνα, αντι-αρτηριογόνα, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά, αντιθρομβωτικά, καρδιοπροστατευτικά και αγγειοδιασταλτικά. Για αυτό το λόγο, η κατανάλωση υψηλών επιπέδων φρούτων και λαχανικών που περιέχουν φαινολικά συστατικά έχει συσχετιστεί

με πολλά οφέλη για την υγεία. Τα ευεργετικά αυτά αποτελέσματα οφείλονται κυρίως στην αντιοξειδωτική δράση αυτών των συστατικών, καθώς αποτελούν φυσική πηγή αντιοξειδωτικών.<sup>[90]</sup>

#### **4.4.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολών**

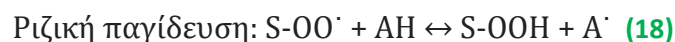
Οι φαινόλες συμπεριφέρονται ως αντιοξειδωτικά λόγω της δραστηριότητας του φαινολικού τμήματος (υποκαταστάτης υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο) και συγκεκριμένα του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων.<sup>[83, 87]</sup> Αν και υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί, ο κύριος τρόπος αντιοξειδωτικής δράσης πιστεύεται ότι είναι η ριζική σάρωση μέσω παροχής ατόμων υδρογόνου. Άλλοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σχετίζονται με την παροχή ηλεκτρονίων, το σχηματισμό χηλικών μεταλλικών κατιόντων και την απόσβεση μονήρους οξυγόνου<sup>[87, 90]</sup> Οι φαινολικές ενώσεις ανάγουν σε μεγάλο βαθμό τις ρίζες οξυγόνου επειδή το δυναμικό αναγωγής ηλεκτρονίων της φαινολικής ρίζας είναι χαμηλότερο από το δυναμικό αναγωγής ηλεκτρονίων των ριζών οξυγόνου και επειδή οι φαινοξυλικές ρίζες είναι λιγότερο δραστικές από τις ρίζες οξυγόνου. Επομένως, αυτές μπορούν να ανάγουν δραστικά τα ενδιάμεσα οξυγόνου χωρίς να προωθήσουν περαιτέρω οξειδωτικές αντιδράσεις.<sup>[87]</sup>

Οι υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο επηρεάζουν τη σταθερότητα και επομένως την ικανότητα απόσβεσης ριζών των φαινολικών οξέων.<sup>[87]</sup> Συγκεκριμένα, ο αριθμός των φαινολικών ομάδων -OH που υπάρχουν στη δομή των φαινολών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αντιοξειδωτική τους δράση. Παράλληλα, οι θέσεις των φαινολικών ομάδων -OH, η παρουσία άλλων λειτουργικών ομάδων σε ολόκληρο το μόριο, όπως οι διπλοί δεσμοί και η σύζευξή τους σε ομάδες -OH, αλλά και οι κετονικές ομάδες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα.<sup>[74]</sup> Για παράδειγμα, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα εμφανίζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία δεσμών CH=CH-COOH που εξασφαλίζει μεγαλύτερη ικανότητα δοτών H-, και σταθεροποίηση των ριζών, συγκριτικά με την ομάδα -COOH των υδροξυβενζοϊκών οξέων. Παράλληλα, έρευνες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με αυξανόμενο βαθμό υδροξυλίωσης.<sup>[90]</sup> Συνεπώς, τα διάφορα φαινολικά οξέα εμφανίζουν διαφορετική αντιοξειδωτική δράση.<sup>[83]</sup>

##### **4.4.1.1 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών**

Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν ιδανική χημική δομή για την αδρανοποίηση της δράσης των ελεύθερων ριζών επειδή διαθέτουν φαινολικές υδροξυλομάδες που είναι επιρρεπείς στην παροχή ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου σε μία ελεύθερη ρίζα.<sup>[21]</sup> Ένας πρωταρχικός μηχανισμός για την αντιοξειδωτική δράση των φαινολών περιλαμβάνει την παγίδευση και την σταθεροποίηση των

ειδών που παράγονται από την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης των ριζών. Η αλυσιδωτή αντίδραση διαιρείται στα ακόλουθα δύο στάδια:



Ριζικός τερματισμός:  $\text{A}\cdot \rightarrow$  μη ριζικά προϊόντα (όπως A-A, SOOA και Aox)

Όπου:

S: υπόστρωμα οξείδωσης

AH: αντιοξειδωτικό

A $\cdot$ : αντιοξειδωτική ρίζα

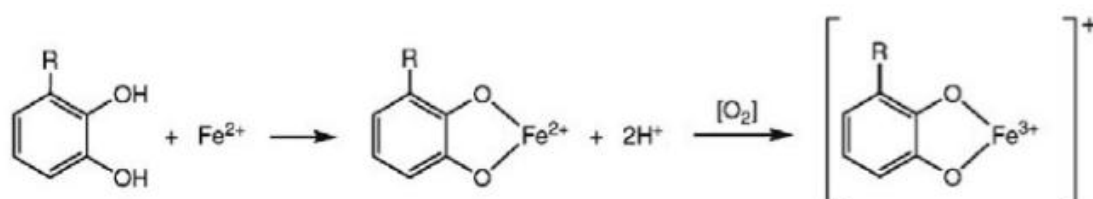
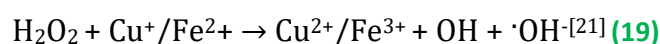
A-A: διμερές του A

SOOA: υπόστρωμα αντιοξειδωτικού υπεροξειδίου

Aox: οξειδωμένη αντιοξειδωτική ρίζα

Αν και το πρώτο στάδιο είναι αναστρέψιμο, το δεύτερο είναι μη αναστρέψιμο, καθώς παράγονται σταθερές ρίζες τερματισμού.<sup>[97]</sup>

Επιπλέον, μερικές φαινολικές ενώσεις με διυδροξυ-ομάδες μπορούν να συζευχθούν με μεταβατικά μέταλλα, εμποδίζοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Συγκεκριμένα, ενεργά οξειδοαναγωγικά ιόντα όπως  $\text{Cu}^+$  και  $\text{Fe}^{2+}$  αλληλεπιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) προς το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ( $\text{OH}$ ), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Εικόνα 20: Ο μηχανισμός σύζευξης φαινολών με χηλικά μέταλλα<sup>[21]</sup>



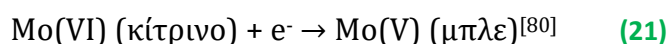
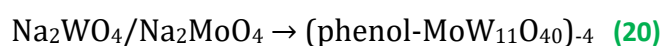
## 4.5 Μέθοδοι εκτίμησης φαινολικών ενώσεων

### 4.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Λαμβάνοντας υπόψιν την ετερογένεια των φυσικών φαινολών και την πιθανότητα παρεμβολής από άλλες εύκολα οξειδωμένες ουσίες, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά και μάλιστα καμία από αυτές δεν οδηγεί σε ακριβή αποτελέσματα. Μεταξύ αυτών των μεθόδων είναι η υπερμαγγανική τιτλοδότηση, η χρωματομετρία με άλατα και η υπεριώδης απορρόφηση.<sup>[107]</sup> Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην αντίδραση των φαινολικών ενώσεων με ένα δείκτη, ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση στο ορατό τμήμα του φάσματος.<sup>[87]</sup> Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες διαδικασίες για τη μέτρηση των συνολικών διαλυτών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων είναι η μέθοδος Folin-Denis και η μέθοδος Folin-Ciocalteu.<sup>[89]</sup>

### 4.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

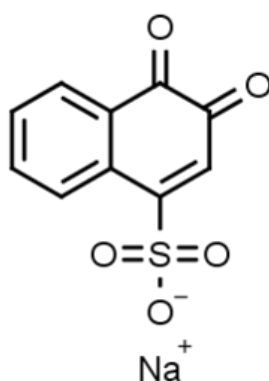
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C) έχει προταθεί εδώ και πολλά χρόνια ως μία τυποποιημένη μέθοδος για τον ποιοτικό έλεγχο και τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου.<sup>[87]</sup> Η μέθοδος F-C προτάθηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών και συγκεκριμένα τη χρωματομετρική εκτίμηση της τυροσίνης, το 1927 από τους O. Folin και V. Ciocalteu, καθώς η εισαγωγή του αντιδραστήριου F-C έδινε λύση στα προβλήματα καθίζησης και θολότητας που εμφανίζονταν.<sup>[108]</sup> Αυτή βασιζόταν στην οξείδωση των φαινολών από ένα μολυβδοβολφραμικό αντιδραστήριο που έδινε έγχρωμο προϊόν στα 745-750nm σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Η ανάλυση αυτή στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, σε αλκαλικό μέσο, από τα φαινολικά συστατικά σε σύμπλοκα φωσφορομολυβδενικού/φωσφοροβολφραμικού οξέος, προς το σχηματισμό μπλε συμπλόκων που προσδιορίζονται φασματομετρικά περίπου στα 765nm. Αν και η ακριβής χημική φύση της αντίδρασης F-C είναι άγνωστη, πιστεύεται ότι η αλληλουχία των αναστρέψιμων αντιδράσεων αναγωγής ενός ή δύο ηλεκτρονίων οδηγούν στο σχηματισμό μπλε προϊόντων (πιθανώς  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$ ).<sup>[80, 87]</sup> Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) και φωσφο-βολφραμικά ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu



ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα  $Na_2CO_3$ . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με το δείκτη F-C εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.<sup>[87]</sup> Βέβαια, σε πολλές έρευνες αυτό έχει αντικατασταθεί από ισοδύναμα κατεχίνης, ταννικού, καφεϊκού ή φερρουλικού οξέος.<sup>[80]</sup> Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού φορτίου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.<sup>[87]</sup>



Εικόνα 21: Το αντιδραστήριο F-C

Βέβαια, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Πιο αναλυτικά, είναι ευαίσθητη, αργή σε όξινο pH και δεν παρουσιάζει εξειδίκευση.<sup>[80]</sup> Ακόμη, υπάρχει περίπτωση το αποτέλεσμα να μην είναι ακριβές εξαιτίας ουσιών που παρεμβαίνουν στα φυσικά δείγματα. Αυτές οι παρεμβολές μπορεί να είναι τριών τύπων: ανασταλτικές, προσθετικές ή επαυξητικές. Τα ανασταλτικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε οξειδωτικά που ανταγωνίζονται το αντιδραστήριο F-C. Για παράδειγμα, η οξείδωση λόγω αέρα, μετά την προσθήκη αλκαλίων, είναι πιθανό να μειώσει την περιεκτικότητα σε φαινόλες. Για αυτό τον λόγο η προσθήκη του αντιδραστηρίου F-C πραγματοποιείται πριν την προσθήκη του αλκαλικού διαλύματος. Όσον αφορά τις προσθετικές παρεμβολές, αυτές μπορεί να οφείλονται στη μη αναμενόμενη παρουσία άλλων φαινολών, όπως αρωματικές αμίνες ή μικροβιακοί μεταβολίτες. Συνεπώς, αν είναι δυνατόν, προτείνεται η μέτρηση αυτών πριν την προσθήκη του αλκαλίου. Τέλος, τα σάκχαρα παρότι δεν αντιδρούν αισθητά σε θερμοκρασία δωματίου, είναι δυνατό να παρέμβουν στη συγκεκριμένη μέθοδο αν βρίσκονται σε υψηλό ποσοστό.<sup>[87, 107]</sup>

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

# 5. Πειραματική μεθοδολογία

## 5.1 Υλικά, αντιδραστήρια και συσκευές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα, αντιδραστήρια και πρώτες ύλες:

### Πρώτες ύλες:

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν φρέσκα φύλλα δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.). Αυτά συλλέχθηκαν από το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο τον Σεπτέμβριο του 2017. Μετά τη συλλογή τους πραγματοποιήθηκε καθαρισμός αυτών, ξήρανση υπό αέρα και αποφύλλωση, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα που ακολούθησαν. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

### Όργανα:

Πίνακας 8: Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα όργανα και συσκευές

Όργανα και Συσκευές	Μοντέλο	Κατασκευαστής
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 110g)	Explorer	OHAUS
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)	M2P	Sartorius
Σύστημα freeze drying	Freeze dryer Alpha RVC	Christ
Λουτρό υπερύχων	2210 Ultrasonic Bath	Branson
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	V-770 UV-Vis/NIR	Jasco
Φυγόκεντρος	3200	Zentrifuge
Αναδευτήρας τύπου Vortex	ZX4	Velp
Αέριος χρωματογράφος (GC)	450-GC	Varian
Φασματόμετρο μάζας (MS)	220-MS	Varian
Πεχάμετρο	537, WTW	
Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού	Rotavapor R-114/ Waterbath B-480	Buchi
Συσκευή χώνευσης δειγμάτων με μικροκύματα	Start D	Milestone
Μαγνητικός αναδευτήρας	RCT basic	IKA

### Αντιδραστήρια:

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς και η ονομασία του αντίστοιχου προμηθευτή καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 9: Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα υλικά και αντιδραστήρια

<b>Υλικά και αντιδραστήρια</b>	<b>Προμηθευτής</b>
Φύλλα δενδρολίβανου	Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Αιθανόλη (EtOH), (absolute grade)	Sigma - Aldrich
Μεθανόλη (MeOH)	Carlo Erba
DPPH	Aldrich
Γαλλικό οξύ	Merck Millipore
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	Merck Millipore
Νιτρώδες νάτριο (NaNO <sub>2</sub> )	Fluka AG. Buchs SG
Χλωριούχο αργίλιο (AlCl <sub>3</sub> )	Sigma- Aldrich
Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)	Panreac
Κατεχίνη	Sigma - Aldrich
Βανιλίνη	Fluka
Πυκνό υδροχλώριο (HCl)	Fisher Scientific
Ένζυμο Alcalase 2.4 L FG (Protease Subtilisin)	Novozymes
Ένζυμο Cellic CTec2	Novozymes
Ένζυμο Viscozyme L	Novozymes
Ένζυμο Cellic HTec2	Novozymes
Ένζυμο Bioprep 3000L	Novozymes
Πυριδίνη	Panreac
BSTFA (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NOSi <sub>2</sub> )	Fluorochem
χλωρο τριμεθυλο σιλάνιο ( (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> SiCl )	Alfa Aesar
Βενζοϊκό οξύ	Sigma - Aldrich
Καφεϊκό οξύ	Sigma - Aldrich

## 5.2 Πειραματικές τεχνικές

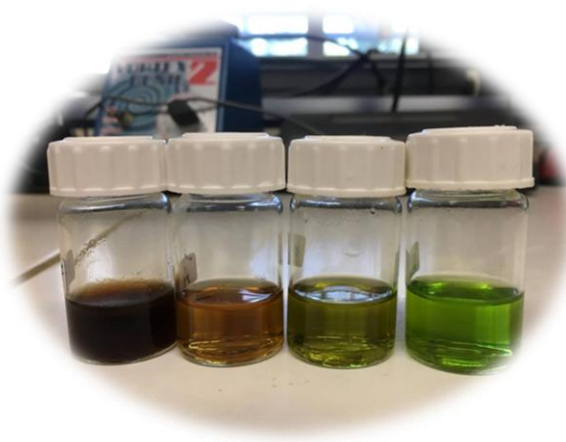
### 5.2.1 Συμβατική εκχύλιση

Μετά την ξήρανση και την αποφύλλωση, τα αποξηραμένα φύλλα οδηγήθηκαν σε περαιτέρω τεμαχισμό, για να χρησιμοποιηθούν κατά τις εκχυλίσεις.



Εικόνα 22: Τα αποξηραμένα φύλλα δενδρολίβανου πριν αυτά οδηγηθούν σε τεμαχισμό

Όσον αφορά τη συμβατική εκχύλιση υγρού-στερεού, αρχικά, για κάθε δείγμα, ζυγίστηκαν 0,5g φυτικού υλικού με ζυγό ακριβείας. Σε αυτό προστέθηκαν 10mL του επιλεγόμενου διαλύτη, ώστε να επιτευχθεί μία αρχική συγκέντρωση  $50 \frac{g}{L}$ . Ακόμη, ως διαλύτης επιλέχθηκε νερό και η αιθανόλη σε ποσοστό 95% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH και 100% H<sub>2</sub>O, με σκοπό να ελεγχθεί πως επηρεάζει η πολικότητα του διαλύτη την ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών. Η συμβατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, κάτω από συνθήκες ήπιας ανάδευσης χωρίς τη χρήση θέρμανσης, ώστε να μην επηρεαστεί η δομική ακεραιότητα των φυτικών δειγμάτων. Ο χρόνος έκχυλισης που επιλέχθηκε για όλα τα δείγματα ήταν 24h.



Εικόνα 23: Τα δείγματα έπειτα από συμβατική εκχύλιση (από αριστερά προς τα δεξιά- περιεκτικότητα διαλύτη: 100% H<sub>2</sub>O, 50% EtOH, 70% EtOH και 95% EtOH)

## 5.2.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Όπως και στην περίπτωση της συμβατικής εκχύλισης, αντίστοιχα και στη ΜΑΕ, για κάθε δείγμα ζυγίστηκε 0,5g φυτικού υλικού με ζυγό ακριβείας και σε αυτό προστέθηκαν 10mL διαλύτη. Αντίστοιχα, ως διαλύτης επιλέχθηκε το νερό και αιθανόλη στις ίδιες αναλογίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Σε αυτήν την περίπτωση, σκόπος ήταν να ελεγχθεί πως επηρεάζει η πολικότητα, η διηλεκτρική σταθερά και ο συντελεστής διασποράς την ανάκτηση των επιθυμητών συστατικών, αλλά και να παρατηρηθούν τυχόν διαφορές από τη χρήση των ίδιων διαλυτών στις δύο μεθόδους εκχύλισης. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία  $T=50^{\circ}\text{C}$ , ενώ ο χρόνος εκχύλισης ήταν 1h.

Τόσο στη ΜΑΕ όσο και στη συμβατική εκχύλιση, μετά το πέρας της καθορισμένης ώρας, έγινε εξάτμιση του οργανικού διαλύτη με τη χρήση περιστρεφόμενου εξατμιστήρα κενού και ακολούθησε η λυοφιλοποίηση (freeze-drying) του δείγματος για  $t=1-2\text{d}$ . Τέλος, αυτά τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα, για την αποφυγή απορρόφησης υγρασίας.



Εικόνα 24: Η διήθηση των δειγμάτων έπειτα από ΜΑΕ

### 5.2.3 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

Η τρίτη μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση. Σε αυτήν την περίπτωση, αναμίχθηκε 1g ξηρού φυτικού υλικού, 25μL του εκάστοτε ενζύμου και 20mL του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

**Πίνακας 10: Τα στοιχεία για τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα. Για την ενεργότητα των ενζύμων:**

<sup>1</sup>β-γλουκανάση (ένδο-1,3(4)-) (FBG/ml, FBG: Fungal Beta-Glucanase Units)

<sup>2</sup>ολική ενεργότητα κυτταρινασών (FPU/ml, FPU: Filter Paper Units)

<sup>3</sup>ενεργότητα ξυλανάσης (XU/ml, XU: xylanase Units)

<sup>4</sup>ενεργότητα πηκτικής λυάσης (PL/ml)

<sup>5</sup>Ενεργότητα πρωτεάσης εκφρασμένη σε AU-A/ml (AU=Anson Unit)

Όνομα	Είδος ενζύμου	Περιεχόμενο	Βέλτιστες συνθήκες	Ενεργότητα ενζύμου (Units/mL <sub>σκ</sub> ευάσματος)
Viscozyme L (vo 3) <sup>1</sup>	Κυτταρινολυτικό	Μίγμα καρβοϋδρασών (αραβινάση, κυτταρινάση, β-γλουκανάση, ημικυτταρινάση και ξυλανάση)	T=25-55°C, pH=3.3-5.5	121
Cellic CTec2 (vo 2) <sup>2</sup>	Κυτταρινολυτικό	Κυτταρινάσες, β-γλυκοζιδάσες και ημικυτταρινάσες	T=45-50°C, pH=5.0-5.5	221
Cellic HTec2 (vo 4) <sup>3</sup>	Ημικυτταρινολυτικό	Ημικυτταρινάσες	T=45-50°C, pH=5.0	9685
Bioprep 3000L (vo 5) <sup>4</sup>	Πηκτινολυτικό	Αλκαλική πηκτινάση (EC 4.2.2.2, πηκτική λυάση)	T=50-60°C, pH=8.0	417
Alcalase 2.4 L FG (vo 1) <sup>5</sup>	Πρωτεολυτικό	Πρωτεάση (σουμππυλίσινη)	T=30-65°C, pH=7.0-9.0	2.8



Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, η θερμοκρασία που επιλέχθηκε ήταν  $T=50^{\circ}\text{C}$ , ενώ προκειμένου η τιμή του pH να είναι κοντά στη βέλτιστη δημιουργήθηκαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα. Όσον αφορά το πρώτο ( $\text{pH}=5.0$ ) παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $C=100\text{mM}$ ,  $\text{MB}=141,9\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) και κιτρικού οξέος ( $C=100\text{mM}$ ,  $\text{MB}=210,14\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ), ενώ για το δεύτερο ( $\text{pH}=8.0$ ) παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris), ( $C=100\text{mM}$ ,  $\text{MB}=157,6\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) και υδροχλωρίου. Τονίζεται ότι όλα τα δείγματα έγιναν εις διπλούν, ώστε να εξασφαλισθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια, ενώ ταυτόχρονα παρασκευάστηκαν και «τυφλά» δείγματα (απουσία ενζύμων). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (shaker), όπου ρυθμίστηκε η κατάλληλη θερμοκρασία και οι στροφές ( $N=150\text{rpm}$ ). Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου εκχύλισης, αλλά και η κινητική της διεργασίας, δείγματα λαμβάνονταν κάθε 1 ώρα ( $t=0-6\text{h}$ ) και για  $t=24\text{h}$ . Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα οδηγήθηκαν σε φυγόκεντρο για  $t=10\text{min}$ , ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του μίγματος και να είναι εφικτός ο προσδιορισμός των βιοενεργών συστατικών που βρίσκονται στο υπερκείμενο.



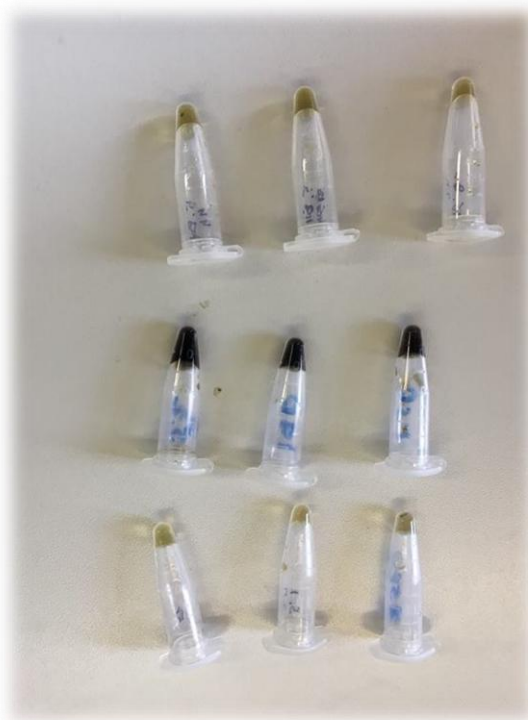
Εικόνα 25: Ο διαχωρισμός δειγμάτων έπειτα από ΕΑΕ για 24h (αριστερά: διήθημα, δεξιά: υπερκείμενο). Στη δεξιά φωτογραφία φαίνονται από αριστερά προς δεξιά τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με τα ακόλουθα ένζυμα: 5,1,3,4,2

Αφού ολοκληρώθηκαν τα παραπάνω πείραματα, ακολούθησε η ΕΑΕ, με τη χρήση του πηκτινολυτικού ενζύμου στις ποσότητες που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 11: Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στη ΜΑΕ

Δείγμα	Ποσότητα ξηρού φυτικού υλικού (g)	Ποσότητα H <sub>2</sub> O (mL)	Ποσότητα ενζύμου (μL)
1	1	20	25
2	1	20	50
3	1	20 (προσθήκη 20mL EtOH μετά από t=1h εκχύλισης)	25
4	1	20 (προσθήκη 20mL EtOH μετά από t=1h εκχύλισης)	50

Τα παραπάνω δείγματα τοποθετήθηκαν στο shaker σε θερμοκρασία T=50°C και σε N=150 rpm. Η δειγματοληψία γινόταν κάθε 1 ώρα (για t=0-6h και για t=24h) και ακολουθούσε τοποθέτηση των δειγμάτων σε φυγόκεντρο για t=10min, με σκοπό τη μελέτη της κινητικής της εκάστοτε εκχύλισης, αλλά και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα των προηγούμενων πειραμάτων.



Εικόνα 26: Τα δείγματα μετά την τοποθέτησή τους σε φυγόκεντρο (ανοιχτόχρωμα εμφανίζονται τα δείγματα που έχει γίνει προσθήκη αιθανόλης, ενώ σκουρόχρωμα αυτά που ως διαλύτη έχουν μόνο νερό)

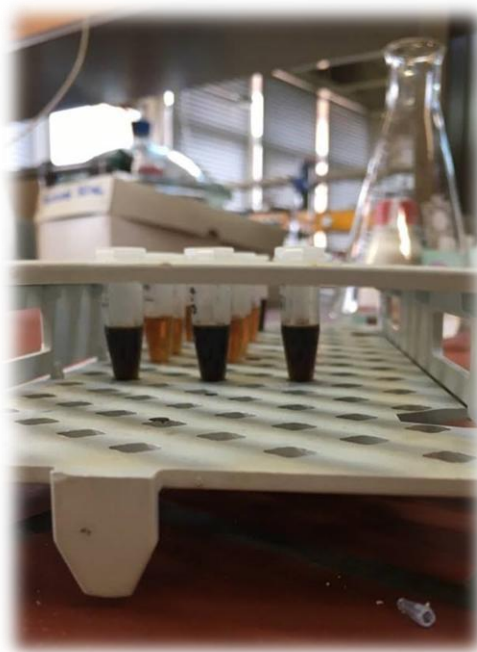
## 5.2.4 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης

Μετά το πέρας των αρχικών εκχυλίσεων, ακολούθησε ο συνδυασμός της συμβατικής εκχύλισης και της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης. Συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα προηγούμενα πειράματα, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθούν οι ακόλουθες δοκιμές στις βέλτιστες συνθήκες, όπως αυτές διαπιστώθηκαν προηγουμένως:

- 1h ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από 24h συμβατική εκχύλιση
- 5h ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από 24h συμβατική εκχύλιση

Πιο αναλυτικά, έγινε χρήση του πηκτινολυτικού ενζύμου και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος (pH=8), ενώ οι συνθήκες εκχύλισης και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες με τα προηγούμενα πειράματα (1g ξηρού φυτικού υλικού, 25μL ενζύμου και 20mL ρυθμιστικού διαλύματος). Μετά το πέρας της ΕΑΕ, το δείγμα διηθήθηκε και το υπερκείμενο οδηγήθηκε προς εξάτμιση ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή του. Το διήθημα συλλέχθηκε για περαιτέρω εκχύλιση. Πιο αναλυτικά, σε προζυγισμένη ποσότητα αυτού προστέθηκε διαλύτης περιεκτικότητας 50% EtOH (σε ποσότητα ώστε  $C_{\text{στερεού}}=1 \frac{g}{L}$ ), και ακολούθησε συμβατική εκχύλιση, υπό ήπια ανάδευση χωρίς θέρμανση, για 24h. Μόλις ολοκληρώθηκε η εκχύλιση, έγινε διήθηση των δειγμάτων, με σκοπό τη συλλογή του υπερκείμενου, την εξάτμιση και τη λυοφιλοποίησή του.

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η μελέτη της κινητικής των παραπάνω πειραμάτων. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε ΕΑΕ για 1h με χρήση του πηκτινολυτικού ενζύμου στις συνθήκες εκχύλισης και στις ποσότητες που αναγράφηκαν προηγουμένως και ακολούθησε η διήθηση αυτού. Στο διήθημα προστέθηκε 50% EtOH σε αντίστοιχη ποσότητα με προηγουμένως, και ακολούθησε η συμβατική εκχύλιση στις προαναφερόμενες συνθήκες. Προκειμένου να μελετηθεί η κινητική, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία κάθε μία ώρα (για t=1-5h και για t=24h). Μετά από κάθε δειγματοληψία, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο, με σκοπό τη διευκόλυνση της περαιτέρω ανάλυσης.



Εικόνα 27: Τα δείγματα που συλλέγονταν ανά 1h (τα σκουρόχρωμα είναι τα δείγματα μετά από 1h EAE, ενώ τα υπόλοιπα είναι από τη συμβατική εκχύλιση που ακολούθησε)

## 5.3 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

### 5.3.1 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού

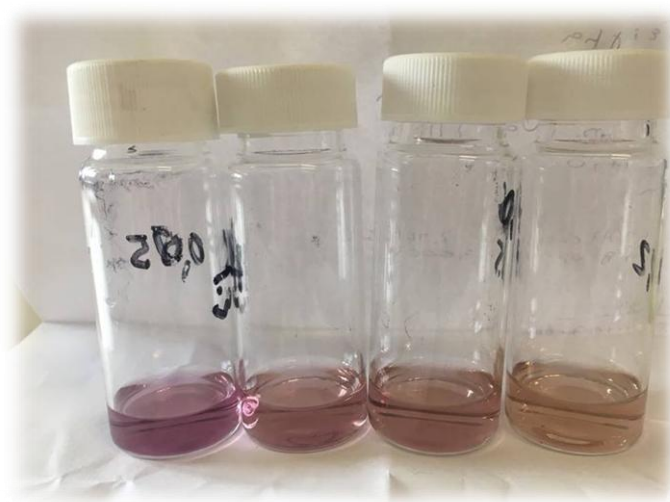
Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των δειγμάτων βασίστηκαν στη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis, που συνδέεται με τη μέτρηση της απορρόφησης. Η ζώνη απορρόφησης χωρίζεται σε δύο περιοχές, αυτή του εγγύς υπεριώδους στα 190-400nm και αυτή του ορατού στα 400-800nm. Η τεχνολογία του συγκεκριμένου οργάνου βασίζεται στις μεταπτώσεις των μορίων, που συνδέονται με τη μεταβολή της κατάστασης τους από σταθερή σε διεγερμένη, λόγω της ακτινοβολίας που προσδίδεται σε αυτά. Συνεπώς, λαμβάνουν χώρα μεταπηδήσεις τροχιακών από τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στα μοριακά δεσμικά ή μη δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας προς τα αντιδεσμικά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας. Το όργανο αυτό αποτελείται από μία πηγή φωτός, ένα μονοχρωμάτορα, που επιλέγει το εύρος του μήκους κύματος που εκπέμπεται και έναν ανιχνευτή, ο οποίος λαμβάνει την ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα. Για την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται μία λάμπα δευτερίου, ενώ για την ορατή περιοχή χρησιμοποιείται μία λάμπα βολφραμίου. Τα φασματοφωτόμετρα χωρίζονται σε μονής και διπλής δέσμης, ανάλογα με το αν το ποσοστό ακτινοβολίας διέρχεται ολοκληρωτικά διαμέσου του δείγματος ή

αν χωρίζεται σε δύο δέσμες πριν φτάσει στο δείγμα, αντίστοιχα. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται και κυψελίδα αναφοράς.<sup>[109, 110]</sup>

### 5.3.2 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης - δοκιμή DPPH

Αρχικά, τονίζεται ότι σε όλες τις μεθόδους, τα ξηρά δείγματα διαλυτοποιήθηκαν με συγκεκριμένη ποσότητα νερού (ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση) και χρησιμοποιήθηκαν σε υγρή μορφή για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Για τις δοκιμές DPPH χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Brand-Williams et al. (1995). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, ζυγίστηκαν 2.50 mg DPPH, τα οποία μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Αρχικά, προστέθηκε ορισμένη ποσότητα αιθανόλης και ακολούθησε έντονη ανακίνηση, μέχρι την πλήρη διάλυση του αντιδραστήριου. Έπειτα, έγινε η προσθήκη και της υπόλοιπης ποσότητας αιθανόλης, μέχρι τη χαραγή της φιάλης.<sup>[79]</sup> Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευαζόταν καθημερινά, ώστε να διατηρείται φρέσκο. Τονίζεται ακόμη ότι επειδή το αντιδραστήριο είναι φωτοευαίσθητο, τόσο το διάλυμα όσο και τα προς εξέταση δείγματα, διατηρούνταν στο σκοτάδι. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων (αρχικής συγκέντρωσης  $C_0$ ), ώστε να μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα σε συγκεντρώσεις:  $C_0$ ,  $0.8C_0$ ,  $0.6C_0$ ,  $0.4C_0$  και  $0.2C_0$ .

Μετά την παρασκευή αυτού του αντιδραστήριου, 3.9mL του διαλύματος DPPH αναμίχθηκαν με 0.1mL του διαλύματος του εκάστοτε αντιοξειδωτικού/εκχυλίσματος και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν για  $t=30\text{min}$ , χρόνος επαρκής για την ολοκλήρωση της αντίδρασης οξείδωσης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στο UV-Vis, σε  $\lambda=515\text{nm}$ , στην οποία η απορρόφηση ήταν μέγιστη.<sup>[79]</sup>



Εικόνα 28: Οι χρωματικές διαφοροποιήσεις των δειγμάτων μετά το πέρας των  $t=30\text{min}$ , ανάλογα με τη συγκέντρωση (από αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται το δείγμα σε συγκέντρωση:  $C_0$ ,  $0.8C_0$ ,  $0.6C_0$  και  $0.4C_0$ )



Το σύνολο των υπολογισμών βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH (διάγραμμα  $A_{DPPH} - C_{DPPH}$ ), η οποία κατασκευάστηκε με χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο. Βάσει της καμπύλης αυτής, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος DPPH καθώς και του μη ανηγμένου DPPH, μετά το τέλος της εκάστοτε αντίδρασης. Για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αντιοξειδωτικού-DPPH, αρχικά έγινε αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων σε τιμές συγκέντρωσης DPPH (μέσω της καμπύλης αναφοράς) και έπειτα έγινε κατασκευή του γραφήματος  $C_{ant} - \Delta C_{DPPH}$ . Τέλος, έγινε προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας, από την οποία υπολογίστηκε το πλήθος των αναγόμενων ριζών ανά μόριο (μέσω της κλίσης), αλλά και ο δείκτης  $IC_{50}$ .

### 5.3.3 Μέτρηση ολικών φαινολικών - μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu του Waterman, κατά την οποία χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες, με την αναγραφόμενη σειρά:

- 100μL του εκάστοτε δείγματος
- 6mL H<sub>2</sub>O
- 0,5mL του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (επώαση για t=1-8min)
- 1,5mL κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ρυθμιστής pH)
- 1,9mL H<sub>2</sub>O

Μετά την παρασκευή των δειγμάτων, αυτά επώαστηκαν για t=1h, χωρίς θέρμανση στο σκοτάδι, καθώς το αντιδραστήριο F-C θεωρείται φωτοευαίσθητο. Η απορρόφηση προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε  $\lambda_{max}=755nm$ . Τονίζεται ότι, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, οι συγκεκριμένες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, καθώς εξαιτίας της ευαισθησίας των αντιδραστηρίων, ήταν πιθανή η ανακριβής ένδειξη.

Το σύνολο των υπολογισμών βασίστηκε στην καμπύλη αναφοράς του αντιδραστηρίου FC (διάγραμμα A - C), η οποία κατασκευάστηκε με χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο. Στη συνέχεια, από τα δεδομένα της συγκεκριμένης καμπύλης, μέσω της απορρόφησης που καταγράφονταν για κάθε δείγμα, υπολογίστηκαν τα ολικά φαινολικά, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Total Phenolic Content (TPC)} \left( \frac{\mu g}{g} \right) = \frac{C_{ga} \cdot V_{ext}}{m_{ext}} \quad (22)$$

Όπου:

$C_{ga}$ : η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς

$V_{\text{ext}}$ : ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα

$m_{\text{ext}}$ : η μάζα του δείγματος

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η περιεκτικότητα φαινολικών στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.



Εικόνα 29: Τα δείγματα μετά από  $t=1\text{h}$  επώαση (ο μπλε χρωματισμός αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης φαινολικών στο δείγμα, οπότε από αριστερά προς δεξιά αυξάνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικά)

### 5.3.4 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών - χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε ολικά φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη συμπλοκοποίηση των υδροξυλίων των φλαβονοειδών με το αργίλιο και περιλαμβάνει την ανάμιξη:

- 125μL του εκάστοτε εκχυλίσματος
- 75μL  $\text{NaNO}_2$  (5%) - επώαση για  $t=6\text{min}$
- 150μL  $\text{AlCl}_3$  (10%) - επώαση για  $t=5\text{min}$
- 750μL  $\text{NaOH}$  (1M)
- 1400μL  $\text{H}_2\text{O}$  (ώστε η συνολική ποσότητα του διαλύματος να είναι  $V=2,5\text{mL}$ )

Αφού παρασκευάστηκε το παραπάνω διάλυμα, οδηγήθηκε σε ανάμιξη με αναδευτήρα τύπου Vortex και εν συνεχεία επώαστηκε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για  $t=15\text{min}$ . Έπειτα, προσδιορίστηκε η απορρόφηση σε  $\lambda_{\text{max}}=495\text{nm}$ , με τη χρήση του οργάνου UV-Vis. Αξίζει να σημειωθεί ότι το καυστικό νάτριο λειτούργησε ως ρυθμιστής του pH και προκάλεσε το



χρωματισμό του δείγματος από κίτρινο σε ροζ. Κατά αντίστοιχο τρόπο, για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο, διάλυμα κατεχίνης που παρασκευάστηκε στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε ολικά φλαβονοειδή πραγματοποιήθηκε κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που ακολουθήθηκε για την εύρεση των ολικών φαινολικών. Πιο αναλυτικά, μέσω της καμπύλης αναφοράς, μετατράπηκε η μετρούμενη απορρόφηση σε συγκέντρωση, η οποία εκφράστηκε σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Total Flavonoid Content (TFC)} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{C_{\text{cat}} \cdot V_{\text{ext}}}{m_{\text{ext}}} \quad (23)$$

Όπου:

$C_{\text{cat}}$ : η συγκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς

$V_{\text{ext}}$ : ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα

$m_{\text{ext}}$ : η μάζα του δείγματος

### 5.3.5 Προσδιορισμός ολικών συμπυκνωμένων τανινών- μέθοδος βανιλίνης-υδροχλωρίου

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε συμπυκνωμένες τανίνες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος βανιλίνης-υδροχλωρίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της βανιλίνης με τις συμπυκνωμένες τανίνες, προς το σχηματισμό έγχρωμων (κόκκινων) συμπλόκων. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, πραγματοποιείται η ανάμιξη των ακόλουθων αντιδραστηρίων, κατά σειρά:

- 400μL του εκάστοτε εκχυλίσματος
- 3mL διαλύματος βανιλίνης (4%, διαλυμένη σε MeOH)
- 1,5mL πυκνού HCl

Αφού παρασκευάστηκε το παραπάνω διάλυμα, οδηγήθηκε σε ανάμιξη με αναδευτήρα τύπου Vortex και εν συνεχεία επώαστηκε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για  $t=15\text{min}$ . Έπειτα, προσδιορίστηκε η απορρόφηση σε  $\lambda_{\text{max}}=500\text{nm}$ , με τη χρήση του οργάνου UV-Vis. Κατά αντίστοιχο τρόπο, για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία,

χρησιμοποιώντας ως πρότυπο, διάλυμα κατεχίνης που παρασκευάστηκε στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε συμπυκνωμένες τανίνες πραγματοποιήθηκε κατά αντίστοιχο τρόπο με αυτόν που ακολουθήθηκε για την εύρεση των ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών. Πιο αναλυτικά, μέσω της καμπύλης αναφοράς, μετατράπηκε η μετρούμενη απορρόφηση σε συκέντρωση, η οποία εκφράστηκε σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για τον υπολογισμό του συνολικού περιεχομένου σε συμπυκνωμένες τανίνες χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Total Condensed Tannins (TCT)} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{C_{cat} \cdot V_{ext}}{m_{ext}} \quad (24)$$

Όπου:

$C_{cat}$ : η συκέντρωση του δείγματος σε ισοδύναμα κατεχίνης, όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς

$V_{ext}$ : ο όγκος του διαλύματος που περιέχει το εκχύλισμα

$m_{ext}$ : η μάζα του δείγματος

## 5.3.6 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC-MS)

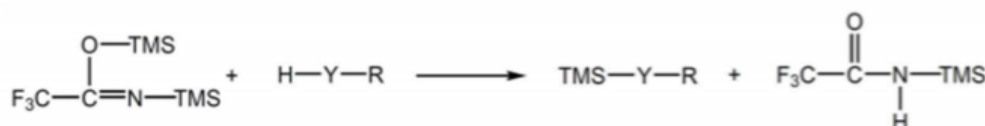
### 5.3.6.1 Παραγωγοποίηση

Ο προσδιορισμός πολικών ενώσεων με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας απαιτεί την παραγωγοποίησή τους. Η παραγωγοποίηση είναι μια χημική διαδικασία με σκοπό την τροποποίηση ενώσεων για την παραγωγή νέων προϊόντων με καλύτερες χρωματογραφικές ιδιότητες. Αρκετοί είναι οι λόγοι, για τους οποίους μπορεί να απαιτείται το στάδιο της παραγωγοποίησης, όπως για παράδειγμα η αύξηση της θερμικής σταθερότητας κάποιων ενώσεων που περιέχουν πολικές λειτουργικές ομάδες, που οδηγεί στη βελτίωση της πτητικότητάς τους. Για την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας (GC), μόρια που περιέχουν λειτουργικές ομάδες όπως -COOH, -OH, -NH και -SH προκαλούν μεγάλη ανησυχία λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ενώσεων. Αυτό οδηγεί σε ασθενή πτητικότητα, σε ανεπαρκή θερμική σταθερότητα ή μπορεί να προκαλέσει αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με το πληρωτικό υλικό της στήλης με αποτέλεσμα τη χαμηλή ανιχνευσιμότητα. Ακόμη, κάποιες φορές, τα μη παραγωγοποιημένα μόρια παράγουν αδρανή χρωματογραφήματα λόγω πολλαπλών κορυφών ή κακών διαχωρισμών των στερεοϊσομερών.<sup>[111]</sup>

Ένας κοινός τρόπος παραγωγοποίησης είναι η σιλυλίωση, η οποία εφαρμόζεται σε αρωματικές και αλειφατικές αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα, αμίνες και αμίδια. Δύο είναι οι κατηγορίες των αντιδράσεων σιλυλίωσης:

- Τα αντιδραστήρια που οδηγούν σε τριμεθυλοσιλυλιωμένα προϊόντα (TMS)
- Τα αντιδραστήρια που οδηγούν σε tert-βουλυλομεθυλοσιλυλιωμένα προϊόντα (TBDMS)<sup>[111]</sup>

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε ο σχηματισμός προϊόντων TMS. Αυτά μπορούν να σχηματιστούν από μία πληθώρα αντιδραστηρίων, όπως το N,O-δισ-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθορο ακεταμίδιο (BSTFA), που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Κατά την αντίδραση αυτή, λαμβάνει χώρα η αντικατάσταση ενός ενεργού υδρογόνου από την ομάδα  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι το BSTFA είναι ιδιαίτερα εύφλεκτη ένωση και εξαιρετικά ευαίσθητη στην υγρασία και για αυτό χρησιμοποιήθηκε κάτω από πολύ προσεκτικές και τελείως ξηρές συνθήκες.



Εικόνα 30: Η αντίδραση παραγωγοποίησης με BSTFA

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παραγωγοποίηση μέσω της αντίδρασης σιλυλίωσης, με χρήση του αντιδραστηρίου BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide). Αρχικά έλαβε χώρα η παραγωγή του απαραίτητου αντιδραστηρίου BSTFA (1% TMS), το οποίο αποτελούνταν από 10μL TMS-Cl (χλωρο τριμεθυλο σιλάνιο) και 990μL BSTFA. Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα, προστέθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- 2,5mg του εκάστοτε δείγματος
- 220μL άνυδρης πυριδίνης
- 80μL διαλύματος BSTFA

Τέλος, τα διαλύματα που σχηματίστηκαν παραπάνω θερμάνθηκαν στους 100°C για t=30min σε ελαιόλουτρο, με τη χρήση μαγνητικής ανάδευσης, προς το σχηματισμό τριμεθυλο-σιλυλιωμένων παραγώγων.<sup>[112]</sup>

### 5.3.6.2 Μέθοδος GC-MS

Αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της παραγωγοποίησης, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση αέριου χρωματογράφου, συζευγμένου με φασματόμετρο μάζας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Varian 450-GC. Ποσότητα 1μl από κάθε παραγωγοποιημένο εκχύλισμα εγχύθηκε στο χρωματογράφο και πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός ροής με λόγο

διαχωρισμού (split ratio) 1:20. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με μια στήλη VF-5ms της Varian με διαστάσεις 30m×0,25mm×0,25μm, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με παροχή 1 ml/min. Ο εισαγωγέας (injector) ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία 250°C και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν το εξής: αρχική θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά, 120°C με ρυθμό 10°C/min και παραμονή για 15 λεπτά, με ρυθμό 3°C/min, σε θερμοκρασία 310°C. Ο συνολικός χρόνος παραμονής ήταν 88 λεπτά. Για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε Mass Spectrometer Varian 220-MS με παγίδα ιόντων (Ion Trap) με εύρος μαζών (Mass Range) 40-650. Τονίζεται, ακόμη, ότι έγινε μία προσπάθεια για την κατασκευή μίας πρότυπης βιβλιοθήκης, δηλαδή την ανάλυση πρότυπων ενώσεων, με σκοπό αυτές να είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν στα δείγματα που εξετάστηκαν.

## 5.4 Δημιουργία καλλυντικής κρέμας- Δοκιμές σταθερότητας

### 5.4.1 Σκοπός δοκιμών σταθερότητας

Κάθε προϊόν μετά την παραγωγή του υφίσταται αλλοιώσεις λόγω γήρανσης και καταπόνησης κατά την διάρκεια της συσκευασίας. Ένα καλλυντικό για να θεωρηθεί αποδεκτό από τους καταναλωτές και κατ' επέκταση να είναι εμπορεύσιμο, θα πρέπει να ικανοποιεί συγκεκριμένα κριτήρια ως προς τη διατήρηση της δραστηριότητας και της καλαισθησίας του. Είναι, επομένως, πολύ σημαντικό να μπορεί να προσδιοριστεί το χρονικό διάστημα, μετά την παραγωγή, για το οποίο το προϊόν θα εξακολουθεί να ικανοποιεί τα παραπάνω κριτήρια.

Για τον σκοπό αυτό οι παρασκευαστές καλλυντικών εξετάζουν τακτικά τη σταθερότητα των προϊόντων, χρησιμοποιώντας διάφορες διαδικασίες. Η πρόβλεψη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας του κάθε προϊόντος βασίζεται, συγκεκριμένα, σε επανειλημμένες εξετάσεις που σχετίζονται με την έκθεσή του σε τεχνητές καταστάσεις στρες. Οι τυπικές αυτές καταστάσεις στρες είναι η θέρμανση, η ψύξη και η φυγοκέντρωση, και χρησιμοποιούνται από τους παρασκευαστές με την ελπίδα ότι η απόδοση και η εμφάνιση του προϊόντος δεν θα επηρεαστούν. Πιο αναλυτικά, κάθε καλλυντικό προϊόν υπόκειται σε δοκιμασίες που ορίζονται από ένα πρωτόκολλο ελέγχου σταθερότητας. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει, το χρονικό διάστημα ελέγχου, τις συνθήκες κατά τη διάρκεια αυτού και τα διάφορα χαρακτηριστικά του προϊόντος που ελέγχονται ως προς την διατήρηση ή την αλλοίωση τους. Σε γενικές γραμμές η νομοθεσία δεν επιβάλλει κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, άλλα κάθε εταιρεία παραγωγής σχεδιάζει το δικό της.

## 5.4.2 Δημιουργία καλλυντικής κρέμας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε συνεργασία με την εταιρία καλλυντικών ΚΟΡΡΕΣ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ, με σκοπό την ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων δενδρολίβανου σε καλλυντικό σκεύασμα και τον έλεγχο της σταθερότητας αυτών. Αρχικά, έλαβε χώρα η εκ νέου παραγωγή δύο εκχυλισμάτων δενδρολίβανου, και συγκεκριμένα αυτών που είχαν εμφανίσει τα μεγαλύτερα ποσοστά βιοενεργών συστατικών, δηλαδή του εκχυλίσματος που προήλθε από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$  και αυτού που προήλθε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης για  $t=5h$ . Για την παραγωγή αυτών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 10g ξηρού δενδρολίβανου και 200mL διαλύτη (EtOH ή ρυθμιστικό διάλυμα αντίστοιχα). Στην περίπτωση της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης πορστέθηκε και το πηκτινολυτικό ένζυμο σε ποσότητα  $V=250\mu L$ . Τα προαναφερόμενα δείγματα, μετά το πέρας της εκχύλισης, οδηγήθηκαν σε σύστημα εξάτμισης και μετά σε freeze-drying, προκειμένου να απομακρυνθεί όλη η περιεχόμενη υγρασία και να είναι κατάλληλα για τη δημιουργία της επιθυμητής καλλυντικής κρέμας.

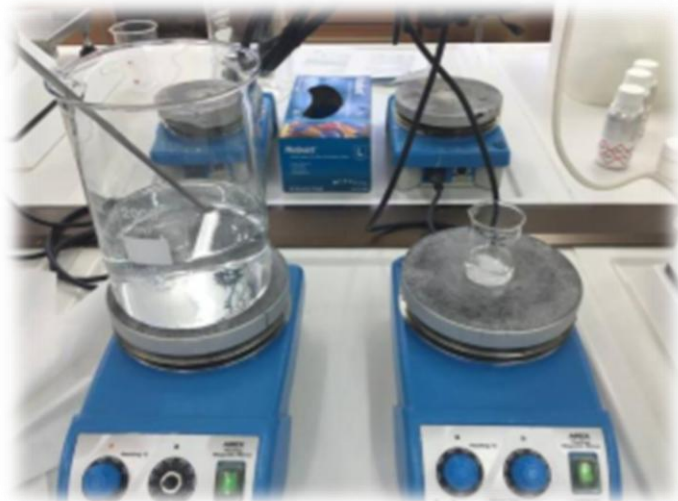
Αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων, αυτά τοποθετήθηκαν σε φόρμουλα κρέμας της εταιρίας, με σκοπό την παρασκευή καλλυντικού σκευάσματος ( $m_{\text{τελικού προϊόντος}} = 300g$ ). Τονίζεται, ακόμη, ότι για την παρασκευή τελικού προϊόντος 300g χρησιμοποιήθηκαν 3g  $H_2O$  και 0,3g του εκάστοτε εκχυλίσματος. Η συγκεκριμένη φόρμουλα αναγράφεται παρακάτω, χωρίς να γίνεται καταγραφή των συστατικών, αλλά με απλή αναφορά στον τύπο αυτών και στη χρησιμότητά τους:

- Δημιουργία υδατικής φάσης. Προσθήκη νερού, χηλικών παραγόντων, γλυκερίνης και xanthan gum (ενισχυτής ιξώδους) και θέρμανση στους  $T=75^\circ C$ . Έλεγχος για πλήρη διασπορά και ομογενοποίηση.



Εικόνα 31: Τα δείγματα που προήλθαν από συμβατική εκχύλιση και ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, αντίστοιχα, μετά την υποβολή τους σε freeze-drying





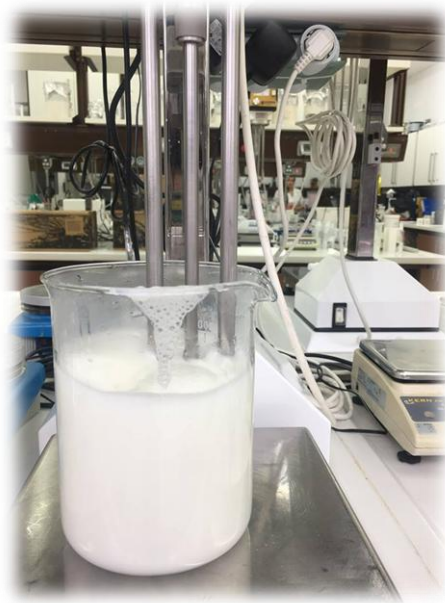
Εικόνα 32: Το δείγμα κατά την παρασκευή της υδατικής φάσης

- Έντονη ανακίνηση με ταυτόχρονη διατήρηση της θερμοκρασίας στους  $T=75^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 33: Το δείγμα πριν οδηγηθεί προς γαλακτωματοποίηση

- Διαδικασία γαλακτωματοποίησης (ομογενοποίηση υδατικής και λιπαρής φάσης). Δημιουργία λιπαρής φάσης, με προσθήκη μίγματος ελαίων, εστέρων, γαλακτωματοποιητών, παραγόντων περιποίησης του δέρματος και μαλακτικών. Προσθήκη, με αργό ρυθμό, της λιπαρής στην υδατική φάση, ανάδευση των δύο φάσεων και ομογενοποίηση για  $t=10\text{min}$  ακριβώς ( $N=2800\text{rpm}$ ).



Εικόνα 34: Το δείγμα μετά τη γαλακτωματοποίηση

- Σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας έως  $T=60^{\circ}\text{C}$  και προσθήκη πολυμερούς με πολύ καλές αισθητικές ιδιότητες, με σκοπό τη σταθεροποίηση του υγρού (thickener agent). Ομογενοποίηση για  $t=2\text{min}$ .
- Σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας έως  $T=45^{\circ}\text{C}$  και προσθήκη βασικού διαλύματος που δρα ως ρυθμιστής του pH. Ανάδευση μέχρι να επιτευχθεί ομογενοποίηση.
- Διατήρηση της θερμοκρασίας στους  $T=40^{\circ}\text{C}$ , με σκοπό την προσθήκη των θερμοευαίσθητων συστατικών. Προσθήκη μίγματος συντηρητικών (όπως propanediol, benzyl alcohol και potassium sorbate) και ομογενοποίηση για  $t=1\text{min}$ .
- Μείωση της θερμοκρασίας έως  $T=27-29^{\circ}\text{C}$ . Προσθήκη βιοενεργών συστατικών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται προσθήκη του εκχυλίσματος δενδρολίβανου.



Εικόνα 35: Η τελική εμφάνιση της καλλυντικής κρέμας μετά την προσθήκη όλων των συστατικών



- Έλεγχος pH και προσθήκη (εάν χρειάζεται) ρυθμιστή pH, ώστε pH=5,2-5,4.



Εικόνα 36: Οι δύο καλλυντικές κρέμες που παρασκευάστηκαν στην εταιρία, μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων δενδρολίβανου

Αξίζει να σημειωθεί ότι ταυτόχρονα με αυτά τα δείγματα, παρασκευάστηκε καλλυντικό σκεύασμα ακριβώς της ίδιας σύστασης που δεν περιείχε όμως εκχύλισμα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στις δοκιμές που ακολούθησαν.

### 5.4.3 Δοκιμές σταθερότητας - Stability tests

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διεξήχθησαν προκαταρκτικές δοκιμές σταθερότητας στα παραπάνω δείγματα, διάρκειας ενός μήνα. Τονίζεται, βέβαια, ότι προκειμένου μία εταιρία να δημιουργήσει ένα εμπορεύσιμο προϊόν, οι δοκιμές σταθερότητας έχουν διάρκεια τουλάχιστον τρεις μήνες. Πιο αναλυτικά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι, στις ακόλουθες θερμοκρασίες: 5°C, 25°C, 40°C, 50°C και σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης 5-45°C (T=5°C για t=2d και 45°C για t=5d).



Εικόνα 37: Τα δείγματα μετά από την τοποθέτησή τους στις διάφορες θερμοκρασίες. Είναι εμφανής η χρωματική τους διαφορά.

Μετρήσεις λήφθηκαν την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων και στις 7, 15, 21 και 29 ημέρες. Οι παραπάνω θερμοκρασίες επιλέχθηκαν προκειμένου να προσομοιαστούν με ακραίες συνθήκες στις οποίες είναι πιθανό να βρεθεί ένα προϊόν (όπως για παράδειγμα υψηλή θερμοκρασία εξαιτίας εκτεταμένης έκθεσης στον ήλιο ή χαμηλή θερμοκρασία εξαιτίας της μεταφοράς του προϊόντος με αεροπλάνο). Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- Οργανοληπτική αξιολόγηση (για έλεγχο συσσωματωμάτων, για χρωματική αλλαγή ή εμφάνιση δυσάρεστης οσμής)
- Μέτρηση pH (σε  $T=25^{\circ}\text{C}$ )
- Μέτρηση ιξώδους
- Φυγοκέντρηση (σε  $N=5000\text{rpm}$  για  $t=10\text{min}$  και σε  $N=7400\text{rpm}$  για  $t=10\text{min}$  επιπλέον)



Εικόνα 38: Οι μετρήσεις στις οποίες υποβλήθηκαν τα δείγματα. Από αριστερά προς δεξιά: φυγοκέντρηση, μέτρηση pH και μέτρηση ιξώδους

## 6. Αποτελέσματα-Συζήτηση

### 6.1 Συμβατική εκχύλιση και MAE

#### 6.1.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίστηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του αντιδραστηρίου DPPH (διάγραμμα ADPPH – CDPPH). Βάση της καμπύλης αυτής, ήταν εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος DPPH, καθώς και του μη ανηγμένου DPPH, μετά το τέλος της εκάστοτε αντίδρασης. Προκειμένου να υπολογιστεί οι τιμές IC<sub>50</sub>, που είναι ενδεικτικός της αντιοξειδωτικής ικανότητας, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Αναγωγή των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων, όπως αυτές μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis, σε τιμές συγκέντρωσης DPPH, μέσω της καμπύλης αναφοράς.
- Κατασκευή του γραφήματος C<sub>antiox.</sub> – ΔC<sub>DPPH</sub>.
- Προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας. Υπολογισμός του IC<sub>50</sub>, μέσω των συντελεστών της παραπάνω ευθείας, σύμφωνα με τον τύπο:

$$IC_{50} \left( \frac{mg}{L} \right) = 0.5 \cdot C_{0(DPPH)} \cdot \alpha + \beta, \quad (25)$$

Όπου,

α: η κλίση της ευθείας του εκάστοτε δείγματος

β: ο σταθερός όρος της ευθείας του εκάστοτε δείγματος

Η καμπύλη αναφοράς, η οποία βρίσκεται στο παράρτημα της συγκεκριμένης εργασίας, κατασκευάστηκε με βάση τις παρακάτω μετρήσεις:

Πίνακας 12: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της αντιοξειδωτικής δράσης

Δείγμα	Αραίωση (%C)	C <sub>DPPH</sub> ( $\frac{g}{L}$ )	A <sub>DPPH</sub>
1	1	0,025	0,5715
2	0,8	0,02	0,5095
3	0,6	0,015	0,3778
4	0,4	0,01	0,2508
5	0,2	0,005	0,1636

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση:

$$C_{DPPH} = 0,046 \cdot A_{DPPH} - 0,0022, \text{ με } R^2=0,9883 \quad (26)$$

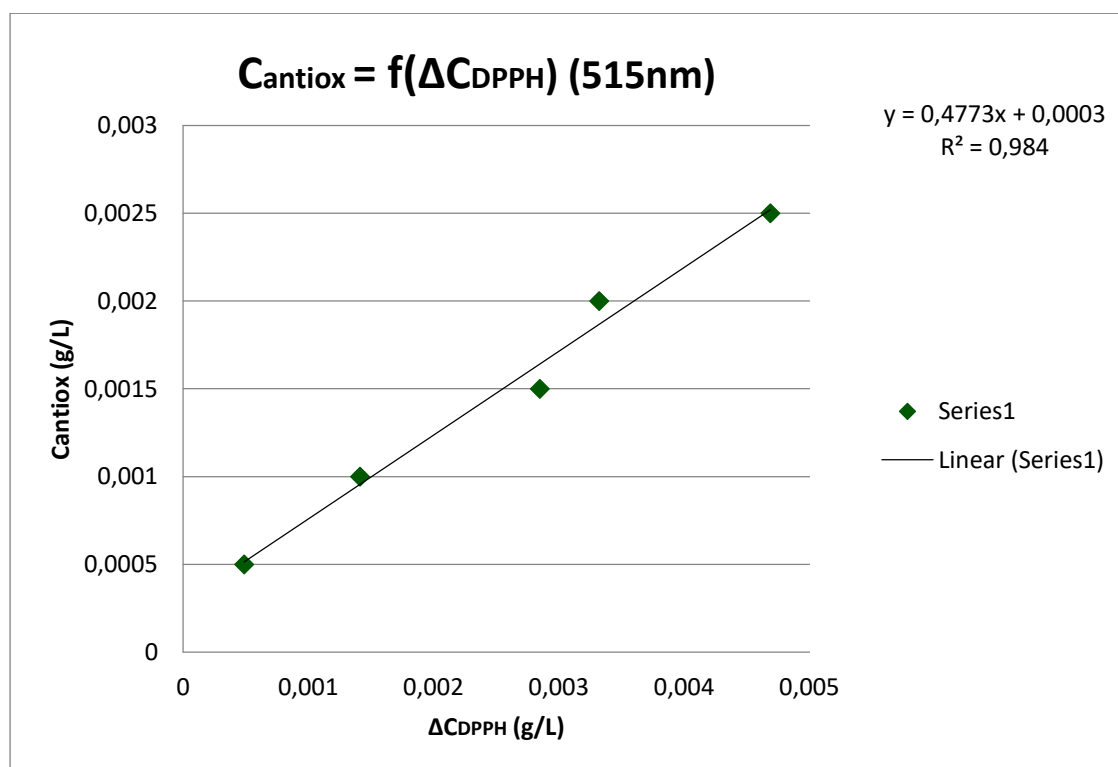
Αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της αρχικής συγκέντρωσης DPPH και επομένως τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του γαλλικού οξέος, το οποίο διαθέτει αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Με βάση τα παραπάνω προέκυψαν τα ακόλουθα:

Πίνακας 13: Τα δεδομένα για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος

Δείγμα	$C_{0,gallic} (\frac{g}{L})$	$A_{DPPH}$
1	0,1	0,4758
2	0,08	0,5055
3	0,06	0,5158
4	0,04	0,547
5	0,02	0,5671

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 1: Το διάγραμμα  $C_{antiox} = f(\Delta C_{DPPH})$  για το γαλλικό οξύ

Από τα δεδομένα της εξίσωσης του παραπάνω διαγράμματος και σύμφωνα με την εξίσωση (25), υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του γαλλικού οξέος, η οποία εκφράζεται μέσω του δείκτη:  $IC_{50} = 6,1 \frac{mg}{L}$ .

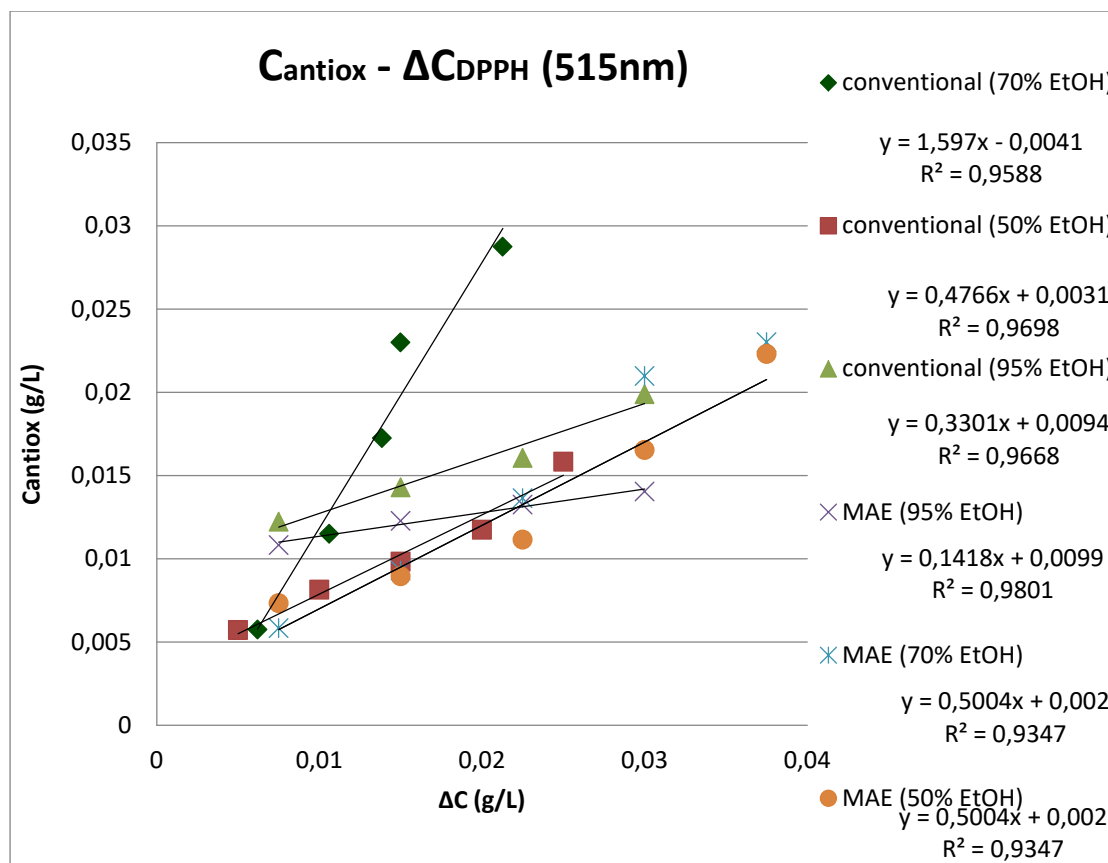
Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ( $C_{antiox}$  και  $A_{antiox}$ ) για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, ένα

συγκεντρωτικό διάγραμμα  $\Delta C_{DPPH} - C_{antiox}$  και ένας τελικός πίνακας με τις τιμές  $IC_{50}$ , όπως αυτός υπολογίστηκε σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία:

Πίνακας 14: Τα δεδομένα για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων

Δείγμα	$C_{0,antiox} (\frac{g}{L})$	$A_{DPPH}$
Conventional (95% EtOH)	1,2	0,1457
	0,9	0,2526
	0,6	0,3021
	0,3	0,3597
Conventional (70% EtOH)	1,15	0,1634
	0,92	0,3208
	0,69	0,3496
	0,46	0,4323
	0,23	0,536
Conventional (50% EtOH)	1	0,2975
	0,8	0,4002
	0,6	0,4484
	0,4	0,4907
	0,2	0,5516
MAE (95% EtOH)	1,2	0,3091
	0,9	0,3311
	0,6	0,3584
	0,3	0,399
MAE (70% EtOH)	1,5	0,0726
	1,2	0,1168
	0,9	0,2764
	0,6	0,3708
	0,3	0,4461
MAE (50% EtOH)	1,5	0,088
	1,2	0,2134
	0,9	0,3305
	0,6	0,3783
	0,3	0,4135

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάστηκε το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 2: Το διάγραμμα  $C_{antiox}=f(\Delta C_{DPPH})$  για τα δείγματα που προέκυψαν από τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Από την εξίσωση που προέκυψε για κάθε δείγμα ακολούθησε ο υπολογισμός των τιμών  $IC_{50}$ , σύμφωνα με την εξίσωση (25). Οι τιμές αυτές καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 15: Οι τιμές  $IC_{50}$  των δειγμάτων που προέκυψαν από τη συμβατική εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Δείγμα	$IC_{50}$ ( $\frac{mg}{L}$ )
Conventional (95% EtOH)	12,1
Conventional (70% EtOH)	16,8
Conventional (50% EtOH)	20,6
MAE (95%)	24,0
MAE (70%)	19,2
MAE (50%)	19,1

Αρχικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει το δείγμα που προέκυψε από τη συμβατική εκχύλιση, με χρήση 95% αιθανόλης, ενώ τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει το δείγμα που προέκυψε από MAE στην ίδια αναλογία διαλύτη. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι και στα δύο είδη εκχυλίσεων η αναλογία του υδροαλκοολικού διαλύτη έχει σημαντική

επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Πιο αναλυτικά, στη συμβατική εκχύλιση διαπιστώνεται ότι η προσθήκη νερού μειώνει την αντιοξειδωτική δράση (μείωση αντιοξειδωτικής δράσης με την ακόλουθη σειρά: 95% EtOH > 70% EtOH > 50% EtOH). Παρόλ'αυτά, στη MAE παρατηρούνται τα αντίθετα αποτελέσματα, καθώς η χρήση νερού φαίνεται να βελτιώνει τη συγκεκριμένη δράση (αύξηση αντιοξειδωτικών με την ακόλουθη σειρά: 95% EtOH < 70% EtOH < 50% EtOH).

Τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνονται λογικά. Όσον αφορά τη συμβατική εκχύλιση, η θετική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης με την περιεκτικότητα σε αιθανόλη πιθανόν να εξηγείται από το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος διαλύτης εμφανίζει αλληλεπίδραση με τις υδροξυλομάδες κάποιων συστατικών του δενδρολίβανου, όπως το ροσμαρινικό οξύ, και επομένως ευνοεί την εξαγωγή τους.<sup>[113]</sup> Δεδομένου, λοιπόν, ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι καλύτερο αντιοξειδωτικό συγκριτικά με άλλα συστατικά του δενδρολίβανου, όπως το καρνοσικό οξύ, η συμβατική εκχύλιση με χρήση αιθανόλης βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.<sup>[114]</sup> Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, έρευνες έχουν δείξει ότι η ύπαρξη νερού προκαλεί μείωση στην αντιοξειδωτική δράση, καθώς, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, παρατηρείται αποικοδόμηση ορισμένων συστατικών, όπως το καρνοσικό οξύ, προς τις οξειδωμένες μορφές του, οι οποίες έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.<sup>[113]</sup>

Όσον αφορά τη MAE, η διακύμανση που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενη. Πιο αναλυτικά, η ύπαρξη νερού αποτελεί κρίσιμη παράμετρο της διεργασίας. Με άλλα λόγια, η υγρασία όταν θερμαίνεται μέσα στο κύτταρο του φυτού, λόγω της επίδρασης των μικροκυμάτων, εξατμίζεται και δημιουργεί τεράστια πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διάρρηξή του και τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης των δραστικών συστατικών από τα κυτταρικά θραύσματα.<sup>[37]</sup> Ακόμη, στη MAE συνιστάται η χρήση διαλύτη που έχει μεγάλη διηλεκτρική σταθερά, αλλά και μεγάλο συντελεστή διασποράς, καθώς διευκολύνεται η μεταφορά θερμότητας. Όπως αναφέρεται και στον πίνακα 4, το νερό έχει την υψηλότερη διηλεκτρική σταθερά σε σχέση με τους υπόλοιπους κοινούς διαλύτες, αλλά ο συντελεστής διασποράς είναι σημαντικά χαμηλότερος. Για αυτό το λόγο, η χρήση μίγματος αιθανόλης-νερού θεωρείται επιθυμητή, καθώς τόσο η διηλεκτρική σταθερά όσο και ο συντελεστής διασποράς έχουν ικανοποιητικές τιμές, ενώ παρατηρείται αύξηση αυτών όσο αυξάνεται η ποσότητα του νερού.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι και με τις δύο μεθόδους εκχύλισης, τα δείγματα παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Μάλιστα, παρότι υπάρχουν διακυμάνσεις μεταξύ των τιμών, οι διαφορές αυτές θεωρούνται μικρές, συγκριτικά με το εύρος των τιμών που μπορεί να πάρει ο δείκτης IC<sub>50</sub>. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες, που απέδειξαν ότι η MAE



αποτελεί μία γρήγορη μέθοδο εκχύλισης, καθώς η ανάκτηση των βιοενεργών ενώσεων, και συνεπώς η αντιοξειδωτική δράση, που προέκυψαν από αυτή σε χρόνους μόλις λίγων λεπτών, είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη ποσότητα που προέκυψε μετά από πολύωρη συμβατική εκχύλιση.<sup>[115]</sup>

### 6.1.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών ενώσεων βασίστηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, με τη χρήση γαλλικού οξέος. Για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Σημειώνεται, επίσης, ότι κατασκευάστηκε και τυφλό δείγμα (απουσία γαλλικού οξέος), προκειμένου η τιμή της απορρόφησής του να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα δείγματα. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα, όπως αυτά προέκυψαν από τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis, στα  $\lambda_{\max}=755\text{nm}$ :

Πίνακας 16: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος

Δείγμα	$C_{0,\text{gallic}}$ ( $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$ )	Abs	Abs (= $\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}$ )
blank	-	0,0362	-
1	2	0,0980	0,0618
2	5	0,1654	0,1292
3	15	0,4490	0,4128
4	20	0,5340	0,4978
5	30	0,7209	0,6847

Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε προέκυψε η εξίσωση:

$$C_{\text{gallic}} = 43,589 \cdot A_{755\text{nm}} - 1,1804, \text{ με } R^2 = 0,9887 \text{ (27)}$$

Αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος (εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος). Στη συνέχεια, σύμφωνα με την εξίσωση (22), υπολογίστηκε το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC).

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ( $C_{0,\text{sample}}$  και  $A_{\text{sample}}$ ) για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν. Τονίζεται ότι επειδή οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, στον πίνακα καταγράφεται ο μέσος όρος αυτών:

Πίνακας 17: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	C <sub>0</sub> ( $\frac{g}{L}$ )	Abs (M.O)	Abs (= Abs <sub>sample</sub> - Abs <sub>blank</sub> )	TPC ( $\frac{\mu g_{gallic}}{g_{extract}}$ )
blank	-	0,0140	-	-
Conventional (95% EtOH)	1	0,1331	0,1191	4014
Conventional (70% EtOH)	1	0,2321	0,2181	8326
Conventional (50% EtOH)	1	0,2955	0,2815	11093
MAE (95%)	1	0,1129	0,0989	3132
MAE (70%)	1	0,2062	0,1922	7197
MAE (50%)	1	0,2437	0,2297	8832

Τέλος, πραγματοποιήθηκε αναγωγή αυτών των τιμών προκειμένου να εκφραστούν σε TPC ( $\frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$ ). Για την επίτευξη αυτού, χρησιμοποιήθηκε το βάρος του κάθε δείγματος που είχε καταγραφεί μετά την εκχύλιση αλλά πριν αυτό υποβληθεί σε περαιτέρω ανάλυση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές του βάρους όλων των δειγμάτων ήταν παραπλήσιες. Από το μέσο όρο που προέκυψε από τα επιμέρους δείγματα (m=0,135g), καθώς και από την ποσότητα που είχε χρησιμοποιηθεί σε κάθε δείγμα πριν την εκχύλιση (m=0,5g), υπολογίστηκε η ποσότητα δενδρολίβανου που αντιστοιχεί σε 1g εκχυλίσματος, η οποία ισούται με m<sub>rosemary</sub>=3,7g. Ως αποτέλεσμα, με βάση τις τιμές του πίνακα (18) και μέσω του τύπου:

$$TPC = \left( \frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}} \right) = \frac{TPC \left( \frac{\mu g_{gallic}}{g_{extract}} \right)}{3,7} \quad (28)$$

υπολογίστηκε το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις:

Πίνακας 18: Οι ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	TPC ( $\frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$ )
Conventional (95% EtOH)	1085
Conventional (70% EtOH)	2250
Conventional (50% EtOH)	<b>2998</b>
MAE (95%)	<b>846</b>
MAE (70%)	1945
MAE (50%)	2387

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται αρχικά το συμπέρασμα ότι υψηλότερο περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις εμφανίζει το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 50%. Αντίθετα, το χαμηλότερο περιεχόμενο σε φαινολικά ανήκει στο δείγμα που προέκυψε από ΜΑΕ με αιθανόλη 95%. Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι στην περίπτωση της εκχύλισης διαφορετικών φαινολικών ενώσεων, απαιτείται η χρήση μίγματος αιθανόλης με νερό, γεγονός που εξηγεί την αύξηση στην περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων με αντίστοιχη αύξηση στην ποσότητα του χρησιμοποιούμενου νερού.<sup>[32]</sup> Μάλιστα τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και άλλες έρευνες, οι οποίες ισχυρίζονται ότι το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις εμφανίζει ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της αιθανόλης στο διαλύτη.<sup>[116]</sup>

Επιπλέον, προκύπτει ότι παρά το γεγονός ότι ορισμένα δείγματα εμφανίζουν συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής τους δράσης και των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν, σε άλλα οι τιμές των δύο αυτών μεγεθών δε συσχετίζονται. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι το δείγμα που προέκυψε από ΜΑΕ με χρήση αιθανόλης 95% παρουσιάζει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση και το χαμηλότερο περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις. Αντίθετα, το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση, στην ίδια αναλογία διαλύτη, ενώ έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση, εμφανίζει χαμηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων είναι πιθανό να οφείλεται και σε άλλα συστατικά, τα οποία δεν ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων. Ακόμη, όπως έχει διαπιστωθεί και σε άλλες έρευνες, η αντιοξειδωτική δράση δεν σχετίζεται μόνο με την περιεκτικότητα σε ορισμένα συστατικά, αλλά και με τη δομή αυτών και την αλληλεπίδραση που εμφανίζουν μεταξύ τους.<sup>[117]</sup>

### 6.1.3 Ολικά φλαβονοειδή

Η μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών βασίστηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, με τη χρήση κατεχίνης. Για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα κατεχίνης. Σημειώνεται, επίσης, ότι κατασκευάστηκε και τυφλό δείγμα (απουσία κατεχίνης), προκειμένου η τιμή της απορρόφησής της να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα δείγματα. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα, όπως αυτά προέκυψαν από τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis, στα  $\lambda_{\max}=495\text{nm}$ :

Πίνακας 19: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης

Δείγμα	$C_0, \text{catechin}$ ( $\frac{mg}{L}$ )	Abs	Abs (= Abs <sub>sample</sub> - Abs <sub>blank</sub> )
blank	-	0,0806	-
1	10	0,3779	0,2973
2	13	0,4857	0,4051
3	15	0,5204	0,4398
4	20	0,6197	0,5391
5	30	0,9728	0,8922

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση:

$$C_{\text{catechin}} = 35,064 \cdot A_{495\text{nm}} - 0,3663, \text{ με } R^2 = 0,9935 \text{ (29)}$$

Αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος (εκφρασμένη σε ισοδύναμα κατεχίνης). Στη συνέχεια, σύμφωνα με την εξίσωση (23), υπολογίστηκε το περιεχόμενο σε ολικά φλαβονοειδή (TFC).

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ( $C_{0,\text{sample}}$  και  $A_{\text{sample}}$ ) για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν:

Πίνακας 20: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	$C_0$ ( $\frac{g}{L}$ )	Abs	Abs (= Abs <sub>sample</sub> - Abs <sub>blank</sub> )	TFC ( $\frac{\mu g_{\text{catechin}}}{g_{\text{extract}}}$ )
blank	-	0,0806	-	-
Conventional (95% EtOH)	1	0,1822	0,1016	3196
Conventional (70% EtOH)	1	0,3052	0,2246	7509
Conventional (50% EtOH)	1	0,3306	0,250	8400
MAE (95%)	1	0,1742	0,0936	2916
MAE (70%)	1	0,2813	0,2007	6671
MAE (50%)	1	0,3121	0,2315	7751

Τέλος, αντίστοιχα με την περίπτωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε αναγωγή αυτών των τιμών προκειμένου να εκφραστούν σε TFC ( $\frac{\mu g_{\text{catechin}}}{g_{\text{rosemary}}}$ ). Εφόσον τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των TPC και TFC ήταν τα ίδια, όλα τα μεγέθη, καθώς και η

ποσότητα δενδρολίβανου που αντιστοιχεί σε 1g εκχυλίσματος, δεν μεταβλήθηκαν. Συνεπώς, με βάση τις τιμές του πίνακα (21) και τον τύπο:

$$TFC = \left( \frac{\mu g_{catechin}}{g_{rosemary}} \right) = \frac{TFC \left( \frac{\mu g_{catechin}}{g_{extract}} \right)}{3,7} \quad (30)$$

υπολογίστηκε το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε ολικά φλαβονοειδή:

Πίνακας 21: Τα ολικά φλαβονοειδή (TFC) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	TFC $\left( \frac{\mu g_{catechin}}{g_{rosemary}} \right)$
Conventional (95% EtOH)	864
Conventional (70% EtOH)	2029
Conventional (50% EtOH)	<b>2270</b>
MAE (95%)	<b>788</b>
MAE (70%)	1803
MAE (50%)	2095

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι υψηλότερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εμφανίζει το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 50%. Αντίθετα, το χαμηλότερο περιεχόμενο σε φλαβονοειδή ανήκει στο δείγμα που προέκυψε από MAE με αιθανόλη 95%. Παρατηρείται ακόμη ότι υπάρχει ανάλογη σχέση μεταξύ του περιεχομένου σε ολικά φαινολικά και φλαβονοειδή. Τα προαναφερόμενα συμπεράσματα θεωρούνται λογικά εφόσον τα φλαβονοειδή αποτελούν υποκατηγορία των φαινολικών ενώσεων και η εκχύλιση αυτών ευνοείται κάτω από παρόμοιες συνθήκες.

#### 6.1.4 Ολικές συμπυκνωμένες τανίνες

Η μέτρηση των ολικών συμπυκνωμένων τανινών βασίστηκε στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, με τη χρήση κατεχίνης. Για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα, όπως αυτά προέκυψαν από τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis, στα  $\lambda_{max}=500nm$ :

Πίνακας 22: Τα δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης

Δείγμα	$C_{0, catechin} (\frac{g}{L})$	Abs	Abs (= Abs <sub>sample</sub> - Abs <sub>blank</sub> )
blank	-	0,0128	-
1	0,5	0,8557	0,8429
2	0,4	0,6780	0,6652
3	0,3	0,5410	0,5282
4	0,2	0,3480	0,3352
5	0,1	0,190	0,1772
6	0,04	0,0850	0,0722
7	0,02	0,0480	0,0352
8	0,005	0,0236	0,0108

Από την καμπύλη αναφοράς προέκυψε η εξίσωση:

$$C_{catechin} = 51,421 \cdot A_{500nm} - 0,6873, \text{ με } R^2 = 0,9952 \text{ (31)}$$

Αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του εκάστοτε δείγματος (εκφρασμένη σε ισοδύναμα κατεχίνης). Στη συνέχεια, σύμφωνα με την εξίσωση (24), υπολογίστηκε το περιεχόμενο σε ολικές συμπυκνωμένες τανίνες (TCT).

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ( $C_{0, sample}$  και  $A_{sample}$ ) για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν:

Πίνακας 23: Τα δεδομένα και τα αποτελέσματα για τα δείγματα που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	$C_0 (\frac{g}{L})$	Abs	Abs (= Abs <sub>sample</sub> - Abs <sub>blank</sub> )	TCT ( $\frac{\mu g catechin}{g extract}$ )
blank	-	0,0194	-	-
Conventional (95% EtOH)	4	0,0874	0,0680	702
Conventional (70% EtOH)	4	0,1008	0,0814	875
Conventional (50% EtOH)	4	0,1846	0,1652	1952
MAE (95%)	4	0,0639	0,0445	400
MAE (70%)	4	0,0979	0,0785	837
MAE (50%)	4	0,0997	0,0803	860

Τέλος, αντίστοιχα με την περίπτωση των ολικών φαινολικών ενώσεων και των ολικών φλαβονοειδών, πραγματοποιήθηκε αναγωγή αυτών των τιμών

προκειμένου να εκφραστούν σε TCT ( $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ ). Εφόσον, όπως ήδη αναφέρθηκε, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αναλύσεις ήταν τα ίδια, με βάση τις τιμές του πίνακα (24) και τον τύπο:

$$TCT = \left( \frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}} \right) = \frac{TCT \left( \frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g extract}} \right)}{3,7} \quad (32)$$

υπολογίστηκε το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε ολικές συμπυκνωμένες τανίνες:

Πίνακας 24: Οι ολικές συμπυκνωμένες τανίνες (TCT) των δειγμάτων που προέκυψαν από συμβατική εκχύλιση και από MAE

Δείγμα	TCT ( $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ )
Conventional (95% EtOH)	190
Conventional (70% EtOH)	236
Conventional (50% EtOH)	<b>528</b>
MAE (95%)	<b>108</b>
MAE (70%)	226
MAE (50%)	233

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι υψηλότερο περιεχόμενο σε συμπυκνωμένες τανίνες εμφανίζει το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με χρήση αιθανόλης 50%. Αντίθετα, το χαμηλότερο περιεχόμενο σε συμπυκνωμένες τανίνες ανήκει στο δείγμα που προέκυψε από MAE με αιθανόλη 95%. Το γεγονός ότι και στα δύο είδη εκχυλίσεων η αυξημένη περιεκτικότητα νερού στον υδροαλκοολικό διαλύτη προκαλεί αύξηση των εκχυλίσιμων βιοενεργών ουσιών, επιβεβαιώνει τη θεωρία παλαιότερων ερευνών. Συγκεκριμένα, οι τανίνες περιέχουν τόσο πολικά (υδρόφιλα) όσο και μη πολικά (υδρόφοβα) μέρη. Για παράδειγμα, οι υδροξυλομάδες που περιέχουν είναι πολικές, ενώ οι αρωματικές φαινολικές δομές είναι μη πολικές. Ως αποτέλεσμα, για την εκχύλιση των τανινών ενδείκνυται η χρήση μίγματος πολικών και λιγότερο πολικών διαλυτών, χαρακτηριστικό παράδειγμα των οποίων αποτελεί το μίγμα αιθανόλης-νερού.<sup>[118]</sup> Τέλος, παρατηρείται ότι υπάρχει ανάλογη σχέση μεταξύ του περιεχομένου σε ολικά φαινολικά, φλαβονοειδή και τανίνες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτό θεωρείται λογικό καθώς οι τανίνες αποτελούν υποκατηγορία των φλαβονοειδών και των φαινολικών ενώσεων και επομένως η εκχύλισή τους ευνοείται κάτω από παρόμοιες συνθήκες.



## 6.2 Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

Αρχικά, τονίζεται ότι στις αναλύσεις που ακολούθησαν, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες καμπύλες αναφοράς με τις αντίστοιχες από τις προηγούμενες μεθόδους εκχύλισης, καθώς η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε δεν υπέστη διαφοροποιήσεις. Επιπλέον, εφόσον προηγουμένως διαπιστώθηκε ότι τα φλαβονοειδή και οι τανίνες εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα φαινολικά, επιλέχθηκε στα επόμενα εκχυλίσματα να μελετηθεί μόνο η διαφοροποίηση του περιεχομένου τους σε φαινολικές ενώσεις, καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση.

### 6.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση μελετήθηκε σε χρόνους εκχύλισης:  $t=1h$  και  $t=5h$ . Τα δείγματα, μετά το πέρας της εκχύλισης, υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση και οδηγήθηκαν προς εξάτμιση. Συνεπώς, για τη μελέτη της συγκεκριμένης δράσης, τα ξηρά δείγματα διαλυτοποιήθηκαν με νερό, ώστε  $C_0 = 50 \frac{g}{L}$ . Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για κάθε είδος ενζύμου παρασκευάστηκαν δύο ίδια δείγματα, καθώς και ένα τυφλό δείγμα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, με την ονοματολογία που εφαρμόστηκε, εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 25: Η ονοματολογία των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία

Κωδική ονομασία	Εμπορική ονομασία
1	Alcalase 2.4 L FG
2	Cellic CTec2
3	Viscozyme L
4	Cellic HTec2
5	Bioprep 3000L

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις τιμές της απορρόφησης, όπως μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis, και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των δειγμάτων ( $C_{antiox}$  και  $A_{antiox}$ ), τόσο για  $t=1h$  όσο και για  $t=5h$  αντίστοιχα. Με βάση αυτόν τον πίνακα, κατασκευάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$ , καθώς και ένας τελικός πίνακας με τις τιμές  $IC_{50}$ .

Διευκρινίζεται ότι η ονομασία του κάθε ενζύμου φαίνεται στον πίνακα (26), τα δείγματα με ονομασία x.1 αποτελούν τα τυφλά, ενώ αυτά με ονομασία x.2 και x.3 αποτελούν τα δύο ίδια δείγματα για κάθε ένζυμο:

Πίνακας 26: Οι τιμές των συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων απορροφήσεων για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

<b>Δείγμα</b>	<b>C<sub>0</sub> (<math>\frac{g}{L}</math>)</b>	<b>Abs - t=1h</b>	<b>Abs - t=5h</b>
<b>1.1</b>	0,5	0,4915	0,4637
	1	0,3568	0,3434
	2	0,2024	0,2266
	3	0,1433	0,1763
<b>1.2</b>	0,5	0,5906	0,3821
	1	0,4353	0,2808
	2	0,1609	0,2194
	3	0,1329	0,1858
<b>1.3</b>	0,5	0,5043	0,3662
	1	0,3703	0,2957
	2	0,1783	0,2312
	3	0,1499	0,2034
<b>2.1</b>	0,5	0,5703	0,5436
	1	0,4413	0,3598
	2	0,2956	0,2560
	3	0,1785	0,1597
<b>2.2</b>	0,5	0,5131	0,5405
	1	0,4456	0,3934
	2	0,2526	0,1563
	3	0,1436	0,1070
<b>2.3</b>	0,5	0,5711	0,5061
	1	0,4577	0,3941
	2	0,2580	0,2172
	3	0,1401	0,1604
<b>3.1</b>	0,5	0,6312	0,5465
	1	0,5699	0,3929
	2	0,3921	0,2428
	3	0,2527	0,1754
<b>3.2</b>	0,5	0,5976	0,5003
	1	0,4449	0,4165
	2	0,2969	0,2724
	3	0,1345	0,1631
<b>3.3</b>	0,5	0,6196	0,4768
	1	0,5510	0,3463
	2	0,3772	0,2365
	3	0,1950	0,1795
<b>4.1</b>	0,5	0,5194	0,5661
	1	0,4758	0,4401
	2	0,290	0,2498
	3	0,1988	0,1848
<b>4.2</b>	0,5	0,5055	0,5474
	1	0,3612	0,3542

	2	0,2323	0,2580
	3	0,1485	0,1470
<b>5.1</b>	0,5	0,5401	0,3690
	1	0,4328	0,2505
	2	0,3096	0,1978
	3	0,1603	0,1805
<b>5.2</b>	0,5	0,5971	0,3498
	1	0,4843	0,2550
	2	0,1959	0,1923
	3	0,160	0,1625
<b>5.3</b>	0,5	0,5658	0,3254
	1	0,3727	0,2850
	2	0,1562	0,2166
	3	0,1430	0,1654

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα  $C_{\text{antiox}} = f(\Delta C_{\text{DPPH}})$ , τα οποία βρίσκονται στο παράρτημα της διπλωματικής εργασίας. Από την εξίσωση που προέκυψε για κάθε δείγμα ακολούθησε ο υπολογισμός του  $IC_{50}$ , σύμφωνα με την εξίσωση (25). Οι τιμές αυτές καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα. Τονίζεται ότι για τα δείγματα που κατασκευάστηκαν εις διπλούν πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του μέσου όρου του  $IC_{50}$ . Το ίδιο συνέβη και για τα πρότυπα δείγματα των ενζύμων 2,3,4 (εκχύλιση σε pH=5) και 1,5 (εκχύλιση σε pH=8) αντίστοιχα, καθώς αυτά περιείχαν τα ίδια ακριβώς συστατικά:

Πίνακας 27: Οι τιμές  $IC_{50}$  των δειγμάτων που προέκυψαν από την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και η (%) βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης συγκριτικά με τα τυφλά δείγματα

Δείγμα	$IC_{50} \left(\frac{mg}{L}\right) - t=1h$	(%) βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για $t=1h$	$IC_{50} \left(\frac{mg}{L}\right) - t=5h$	(%) βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για $t=5h$
Blank (pH=5)	56,2	-	35,6	-
Blank (pH=8)	67,7	-	27,7	-
Ένζυμο 1	32,1	52,6	18,9	31,9
Ένζυμο 2	37,9	32,5	28,3	20,5
Ένζυμο 3	<b>46,0</b>	18,1	27,2	23,8
Ένζυμο 4	31,1	44,7	27,6	22,4
Ένζυμο 5	33,6	50,4	<b>13,2</b>	52,4

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση μετά από  $t=5h$ ,

γεγονός που πιθανόν να σημαίνει ότι τα ένζυμα σε  $t=1h$  δεν είχαν προλάβει να δράσουν ικανοποιητικά. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις τιμές  $IC_{50}$  των δειγμάτων με τα αντίστοιχα τυφλά, συμπεραίνεται ότι όλα τα ένζυμα έδρασαν και συνέβαλαν στη βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης (από 18% έως 53% βελτίωση του συγκεκριμένου μεγέθους). Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνει τους δύο μηχανισμούς δράσης των ενζύμων, δηλαδή την υδρολυτική αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών που συγκρατούν τις φαινολικές ενώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβους δεσμούς και την άμεση θραύση των αιθερικών και/ή εστερικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των φαινολών και των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Παρατηρείται, επίσης, ότι τα ένζυμα 1 και 5 (πρωτεολυτικό και πηκτινολυτικό αντίστοιχα) ενίσχυσαν περισσότερο την αντιοξειδωτική ικανότητα, σε σχέση με τα ένζυμα 2,3 και 4 (κυτταρινολυτικά και ημικυτταρινολυτικά αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό πιθανώς να συνδέεται τόσο με τη φύση του ενζύμου, όσο και με τις συνθήκες της εκχύλισης, διότι υπήρξε διαφοροποίηση στην τιμή του pH που χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, σημειώνεται ότι καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισε το δείγμα που είχε υποβληθεί σε εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης για  $t=5h$  ( $IC_{50} = 13,2 \frac{mg}{L}$ ). Η τιμή αυτή μάλιστα είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη τιμή που εμφάνισε το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με τη χρήση αιθανόλης 95% ( $IC_{50} = 12,11 \frac{mg}{L}$ ).

## 6.2.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση μελετήθηκε σε χρόνους εκχύλισης:  $t=0-24h$ . Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κάθε μία ώρα για  $t=0-6h$ , αλλά και στις  $t=24h$ . Τα δείγματα, μετά το πέρας της εκχύλισης, οδηγήθηκαν σε φυγοκέντρηση και διαλυτοποιήθηκαν με κατάλληλη ποσότητα νερού ( $C_0 = 10, 15$  ή  $50 \frac{g}{L}$ ), προκειμένου να πραγματοποιηθεί η περαιτέρω ανάλυση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για κάθε είδος ενζύμου παρασκευάστηκαν δύο ίδια δείγματα, καθώς και ένα τυφλό δείγμα. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιέχει τις μετρήσεις που έλαβαν χώρα ( $C_{0,sample}$  και  $A_{sample}$ ) για κάθε δείγμα που μελετήθηκε, καθώς και ένας δεύτερος πίνακας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Τονίζεται ότι, χάριν συντομίας, η τιμή της απορρόφησης που εμφανίζεται είναι αυτή που υπολογίστηκε μετά την αφαίρεση της αντίστοιχης τιμής του τυφλού δείγματος ( $Abs = Abs_{sample} - Abs_{blank}$ ), ενώ για τα δύο δείγματα που προέκυψαν από εκχύλιση με το ίδιο ένζυμο (x.2 και x.3) καταγράφεται απευθείας ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων:

Πίνακας 28: Οι τιμές των απορροφήσεων για τα δείγματα που προέκυψαν από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

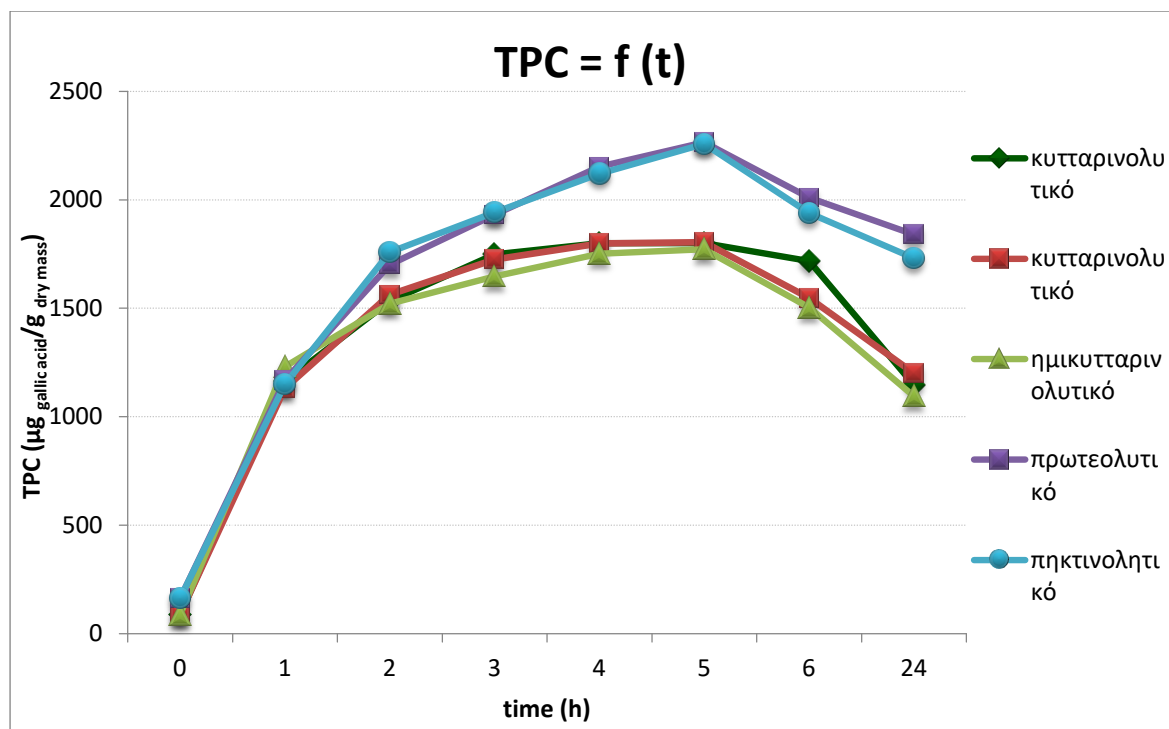
Abs							
t (h)	Ένζυμο 1	Ένζυμο 2	Ένζυμο 3	Ένζυμο 4	Ένζυμο 5	Δείγμα χωρίς ένζυμο (pH=5)	Δείγμα χωρίς ένζυμο (pH=8)
0	0,0768	0,0595	0,0595	0,0595	0,0768	0,0595	0,0768
1	0,4350	0,2939	0,2866	0,3095	0,4285	0,2766	0,4329
2	0,6180	0,3788	0,3856	0,3761	0,6382	0,3597	0,5758
3	0,6976	0,4283	0,4229	0,4050	0,7012	0,3889	0,6698
4	0,5265	0,4402	0,4399	0,4289	0,5192	0,3722	0,4512
5	0,5522	0,4403	0,4411	0,4336	0,5507	0,4062	0,4340
6	0,4938	0,4210	0,4180	0,3722	0,4774	0,3429	0,4325
24	0,4547	0,2901	0,3027	0,2783	0,4298	0,2540	0,3877

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με την εξίσωση (22) υπολογίστηκε το περιεχόμενο, για κάθε δείγμα, σε ολικές φαινολικές ενώσεις. Οι τιμές αυτού καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 29: Οι ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC) των δειγμάτων που προέκυψαν από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

TPC ( $\frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$ )							
t (h)	Ένζυμο 1	Ένζυμο 2	Ένζυμο 3	Ένζυμο 4	Ένζυμο 5	Δείγμα χωρίς ένζυμο (pH=5)	Δείγμα χωρίς ένζυμο (pH=8)
0	164	89	89	164	89	89	164
1	1169	1163	1131	1231	1150	1035	1163
2	1701	1533	1563	1521	1759	1398	1578
3	1932	1749	1725	1647	1943	1525	1851
4	2153	1801	1799	1751	2120	1452	1824
5	<b>2265</b>	1802	1804	1772	2258	1400	1749
6	2010	1717	1548	1504	1938	1324	1743
24	1840	1146	1201	<b>1095</b>	1732	937	1548

Από τις παραπάνω τιμές καταστρώνεται το ακόλουθο διάγραμμα, που περιλαμβάνει τις τιμές των φαινολικών ενώσεων (TPC) των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμική εκχύλιση, σε σχέση με το χρόνο:



Διάγραμμα 3: Το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) σε σχέση με το χρόνο για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα και τις τιμές που προέκυψαν για τις ολικές φαινολικές ενώσεις των εκχυλισμάτων, συμπεραίνεται ότι τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης ή πρωτεάσης εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα, συγκριτικά με τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί κυτταρινάση ή ημικυτταρινάση. Παρατηρείται, μάλιστα, παρόμοια συμπεριφορά με την περίπτωση της αντιοξειδωτικής δράσης. Αντίστοιχα, αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στις συνθήκες εκχύλισης και συγκεκριμένα στην τιμή του pH είτε στην φύση του ενζύμου.

Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν μέγιστο περιεχόμενο σε φαινολικά σε χρόνο  $t=5h$ . Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (17) η πορεία του κάθε δείγματος ακολουθεί τρία διακριτά στάδια. Αρχικά, παρατηρείται μία απότομη αύξηση στη τιμή του TPC, σε διάστημα  $t=0-2h$ . Στη συνέχεια, σε διάστημα  $t=2-5h$ , το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις συνεχίζει να αυξάνεται, αλλά η αύξηση είναι αισθητά μικρότερη. Τέλος, στις  $t=5h$  παρατηρείται το μέγιστο σημείο για κάθε δείγμα, ενώ σε διάστημα  $t=5-24h$ , η τιμή των φαινολικών ενώσεων μειώνεται. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε τρεις λόγους. Καταρχήν, όπως παρατηρείται από τον πίνακα (30), η τιμή του TPC μειώνεται και στα τυφλα δείγματα, γεγονός που σημαίνει ότι κάποια από τις ουσίες που εμπεριέχονται στα ρυθμιστικά διαλύματα μπορεί να προκαλεί την αποικοδόμηση των φαινολικών ενώσεων. Παρολα αυτά, αυτή η μείωση είναι μικρή συγκριτικά με την αντίστοιχη των δειγμάτων που περιέχουν

ένζυμο. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι υπάρχει και κάποιος άλλος λόγος που οδηγεί στη συγκεκριμένη μείωση. Πιθανή αιτία αποτελεί η αναστολή της δράσης των ενζύμων από τα φαινολικά συστατικά, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Όπως έχει αποδειχθεί, τα φυτά αναπτύσσουν μηχανισμούς προκειμένου να παρέμποδίζεται η είσοδος παθογενών ουσιών στα φυτικά κύτταρα. Για αυτό το λόγο, οι φαινόλες και κυρίως ορισμένα ολιγομερή, όπως οι τανίνες, θεωρούνται αναστολείς και απενεργοποιητές μίας ευρείας ποικιλίας ενζύμων.<sup>[119, 120]</sup> Σε συνδυασμό με αυτό, πιθανή είναι και η καταστροφή ορισμένων φαινολικών συστατικών από ένζυμα, καθώς τα τελευταία εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια βιοαποικοδόμησης των φαινολικών και άλλων αρωματικών ενώσεων. <sup>[121]</sup>

Τέλος, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν όντως η χρήση των συγκεκριμένων ρυθμιστικών διαλυμάτων συνέβαλε στη μείωση των φαινολικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε ένα επιπλέον πείραμα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η πορεία της τιμής του TPC σε δείγμα που υποβλήθηκε σε συμβατική εκχύλιση με χρήση 50% EtOH, για t=1-24h. Παρακάτω, παρουσιάζεται ένας πίνακας με τις τιμές των απορροφήσεων, των συγκεντρώσεων αλλά και των TPC, όπως αυτές προέκυψαν σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία, για το δείγμα στους εκάστοτε χρόνους. Σημειώνεται ότι και σε αυτήν την περίπτωση οι τιμές της απορρόφησης που εμφανίζονται παρακάτω προέκυψαν μετά την αφαίρεση της τιμής του blank και αποτελούν το μέσο όρο των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν:

Πίνακας 30: Οι τιμές των TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για t=1-24h

Δείγμα ως προς t(h)	C <sub>0</sub> ( $\frac{g}{L}$ )	Abs	TPC ( $\frac{\mu g_{gallie}}{g_{rosemary}}$ )
0	10	0,1132	358
1	10	0,3354	1344
2	10	0,3890	1577
3	10	0,4233	1727
4	10	0,4456	1824
5	10	0,4690	1926
6	10	0,4741	1948
24	10	0,6960	2916

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται ότι το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις εμφανίζει ανοδική πορεία σε σχέση με το χρόνο, σε αντίθεση με την περίπτωση της εκχύλισης με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Συνεπώς, δεδομένου ότι οι υπόλοιπες συνθήκες της εκχύλισης παρέμειναν οι ίδιες, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη του ρυθμιστικού διαλύματος στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση συμβάλλει στη μείωση των φαινολικών.



Εν συνεχεία, επιλέχθηκε η μελέτη της μεταβολής του TPC σε δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, αλλά σε διαφορετικές συνθήκες. Πιο αναλυτικά, στην προσπάθεια να διερευνηθεί η επίδραση της προστιθέμενης ποσότητας ενζύμου, καθώς και η αλλαγή του υπάρχοντος ρυθμιστικού διαλύματος, στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα που έχουν ήδη αναφερθεί στον πίνακα (12):

- i. **Δείγμα 1:** 1g ξηρού δενδρολίβανου + 25μL πηκτινάσης + 20mL H<sub>2</sub>O
- ii. **Δείγμα 2:** 1g ξηρού δενδρολίβανου + 25μL πηκτινάσης + 20mL H<sub>2</sub>O +20mL EtOH (προσθήκη EtOH μετά από χρόνο t=1h)
- iii. **Δείγμα 3:** 1g ξηρού δενδρολίβανου + 50μL πηκτινάσης + 20mL H<sub>2</sub>O
- iv. **Δείγμα 4:** 1g ξηρού δενδρολίβανου + 50μL πηκτινάσης + 20mL H<sub>2</sub>O +20mL EtOH (προσθήκη EtOH μετά από χρόνο t=1h)

Μετά το πέρας των παραπάνω πειραμάτων, τα δείγματα οδηγήθηκαν σε φυγοκέντρηση και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησής τους στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Σύμφωνα με αυτές τις τιμές κατασκευάζεται ο επόμενος πίνακας, που περιλαμβάνει τις τιμές των απορροφήσεων των εκχυλισμάτων, για τους διάφορους χρόνους. Τονίζεται ότι, χάριν συντομίας, η τιμή της απορρόφησης που εμφανίζεται είναι αυτή που υπολογίστηκε μετά την αφαίρεση της αντίστοιχης τιμής του τυφλού δείγματος ( $Abs = Abs_{sample} - Abs_{blank}$ ):

Πίνακας 31: Οι τιμές της απορρόφησης για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, σε διαφορετικές συνθήκες

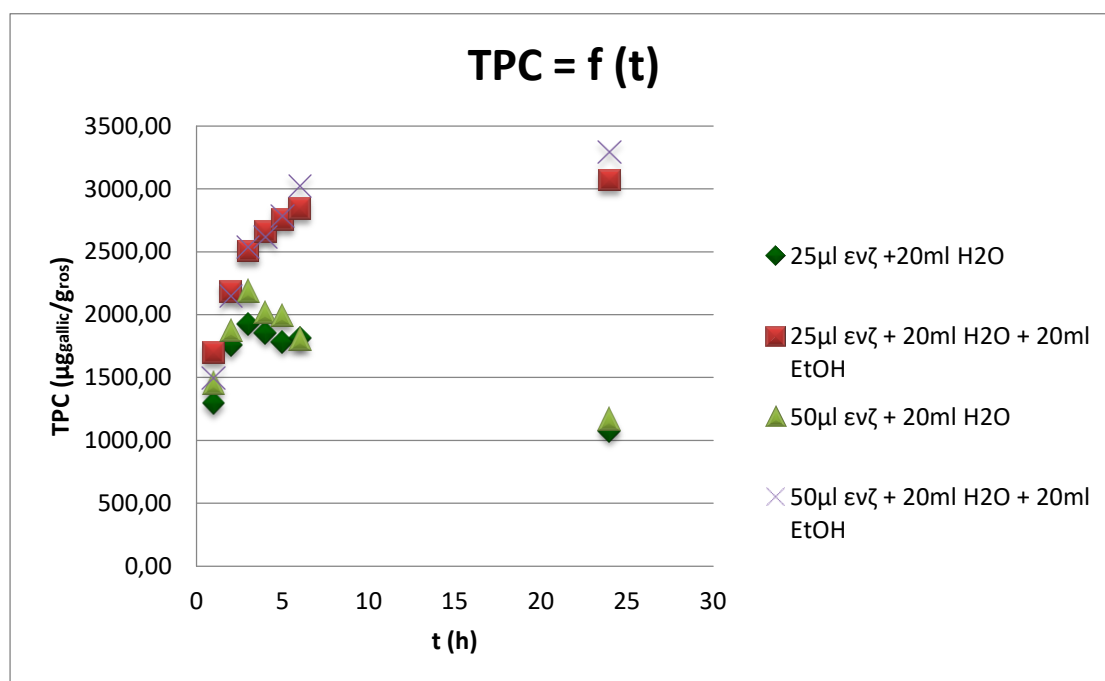
Abs				
t (h)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
0	0,0587	0,0943	0,0706	0,0788
1	0,3248	0,4162	0,3604	0,3701
2	0,4298	0,2774	0,4562	0,2732
3	0,4683	0,3142	0,5279	0,3185
4	0,4524	0,3320	0,4880	0,3277
5	0,4365	0,3433	0,4834	0,3460
6	0,4426	0,3530	0,4404	0,3740
24	0,2737	0,3795	0,2943	0,4044

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα και σύμφωνα με την εξίσωση (22) υπολογίστηκε το περιεχόμενο, για κάθε δείγμα, σε ολικές φαινολικές ενώσεις (TPC). Οι τιμές αυτού καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 32: Οι τιμές του TPC για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, σε διαφορετικές συνθήκες

TPC $\frac{\mu\text{g gallic}}{\text{g rosemary}}$				
t (h)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
0	138	293	190	225
1	1298	1696	1453	1495
2	1755	2182	1870	2146
3	1923	2503	2183	2541
4	1854	2658	2009	2621
5	1785	2757	1989	2780
6	1811	2841	1802	3024
24	1075	3072	1165	3289

Από τις προαναγραφόμενες τιμές κατασκευάζεται το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 4: Το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων σε σχέση με το χρόνο για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση σε τροποποιημένες συνθήκες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα και συγκεκριμένα παρατηρώντας τις τιμές του TPC για τα δείγματα 1 και 3 συμπεραίνεται αρχικά ότι η προσθήκη του ενζύμου συνδέεται με τη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινολικά. Πιο αναλυτικά, όπως διαπιστώθηκε στον πίνακα (30) τα δείγματα που είχαν υποστεί ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση εμφάνιζαν μειωμένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, γεγονός που είχε συνδεθεί και με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος (πίνακας 31). Παρόλ'αυτά, τώρα παρατηρείται ότι παρότι σε αυτά τα δείγματα δεν είχε προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα, αλλά ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το

νερό (το οποίο σύμφωνα με τον πίνακα (31) δεν προκαλεί μείωση του TPC), η καθοδική πορεία των φαινολικών ενώσεων συνεχίζεται. Μάλιστα, σε αυτήν την περίπτωση λαμβάνει χώρα μετά από λιγότερο χρόνο, δηλαδή σε  $t=4h$ . Ως αποτέλεσμα, επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι η μείωση των φαινολικών ενώσεων δεν συνδέεται μόνο με την ύπαρξη του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος, αλλά και με την προσθήκη του ενζύμου, που είτε αποικοδομεί κάποιες φαινολικές ενώσεις, είτε προκαλείται η αναστολή της δράσης του από αυτές.

Συγκρίνοντας, ακόμη, τις τιμές των δειγμάτων 3 και 4, στα οποία χρησιμοποιήθηκε διπλάσια ποσότητα ενζύμου, με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων 1 και 2, συμπεραίνεται ότι η προστιθέμενη ποσότητα ενζύμου στο εκχύλισμα συνδράμει στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Αναλυτικότερα, τα δείγματα που έχουν διπλάσια ποσότητα εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές TPC. Βέβαια, η αύξηση αυτή δεν θεωρείται ικανοποιητική, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα έπρεπε να έχει προστεθεί ακόμα περισσότερη ποσότητα ενζύμου, ώστε να αυξηθεί αισθητά η τιμή του των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Συγκρίνοντας, επίσης, τα δείγματα 2 και 4, στα οποία προστέθηκε EtOH μετά από χρόνο  $t=1h$ , με τα δείγματα 1 και 3, παρατηρείται ότι υπάρχουν έντονες διαφοροποιήσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο των ολικών φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων, στα οποία προστέθηκε EtOH, αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο για  $t=0-24h$ . Αντίθετα, στα δείγματα που δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη EtOH, όπως ήδη αναφέρθηκε, καταγράφεται μείωση του TPC στις  $t=4h$ . Ως απόρροια, πιθανολογείται ότι η προσθήκη αιθανόλης αναστέλει μερικώς τη δράση των ενζύμων, με αποτέλεσμα αυτά να μην αλληλεπιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις και να μην προκαλούν την αποικοδόμησή τους.

Τέλος, τα δείγματα 2 και 4, που περιέχουν 50% EtOH, παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε χρόνο  $t=24h$  ( $TPC=3072 \frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$  και  $TPC=3289 \frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$  αντίστοιχα). Μάλιστα, οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες συγκριτικά είτε με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (πίνακας 30) είτε με τη συμβατική εκχύλιση με τη χρήση ίδιας αναλογίας EtOH-H<sub>2</sub>O ως διαλύτη (πίνακας 19). Προκύπτει, επομένως, ότι ο συνδυασμός του νερού και της EtOH στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, βελτιώνει την εξαγωγή των φαινολικών ενώσεων από τη φυτική πρώτη ύλη.

## 6.3 Συνδυασμός μεθόδων εκχύλισης

Αρχικά τονίζεται ότι στην περίπτωση του συνδυασμού διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης επιλέχθηκε η μελέτη των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC), ενώ εκτεταμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε μόνο στο δείγμα που αποδείχθηκε καλύτερο.

### 6.3.1 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Όπως ήδη αναφέρθηκε, έλαβε χώρα ο συνδυασμός της συμβατικής εκχύλισης με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, στις συνθήκες που έχουν ήδη καταγραφεί. Σε πρώτο επίπεδο, εξετάστηκε η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, με χρήση πηκτινάσης, για  $t=1h$  ή  $t=5h$ , ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH, για  $t=24h$ . Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν να διαπιστωθεί εάν η μία ώρα EAE ήταν επαρκής ή απαιτούνταν η κατεργασία σε εκτεταμένο χρονικό διάστημα. Επομένως, παρουσιάζεται ο εξής πίνακας, που περιλαμβάνει τις τιμές των απορροφήσεων και των αντίστοιχων τιμών του TPC. Σημειώνεται ότι και στα δύο δείγματα, η αρχική συγκέντρωση ήταν:  $C_0 = 10 \frac{g}{L}$ . Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται και η (%) ενίσχυση του TPC, όπως προκύπτει σύμφωνα με τον τύπο:

$$(\%) \text{ ενίσχυση} = \left(1 - \frac{TPC_{EAE}}{TPC_{\text{συνδυασμού}}}\right) \cdot 100 \quad (33)$$

Πίνακας 33: Οι τιμές της απορρόφησης, του TPC και της (%) ενίσχυσης του TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση

Δείγμα - μέθοδος εκχύλισης	Abs	TPC ( $\frac{\mu g \text{ gallic}}{g \text{ rosemary}}$ )	(%) ενίσχυση
1h EAE	0,3358	1346	-
1h EAE + 24h CEM	0,6659	4130	67
5h EAE	0,5818	2418	-
5h EAE + 24h CEM	0,8378	3476	30

Σύμφωνα με τις τιμές του TPC του πίνακα (32), καθώς και την (%) ενίσχυση του περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις προκύπτει ότι ο συνδυασμός της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης με τη χρήση πηκτινάσης για  $t=1h$  και της συμβατικής εκχύλισης με 50% EtOH για  $t=24h$  παρέχει καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης για  $t=5h$  και της συμβατικής εκχύλισης με 50% EtOH για  $t=24h$ . Μάλιστα, στην πρώτη περίπτωση, ενώ η τιμή του TPC που προκύπτει από την ενζυμική εκχύλιση είναι χαμηλή, η συμβατική εκχύλιση που ακολούθησε φαίνεται ότι ενισχύει σημαντικά την εξαγωγή των φαινολικών ενώσεων. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση, παρότι η συμβατική εκχύλιση βελτίωσε την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε φαινολικά, η τιμή αυτών δεν αυξήθηκε σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο στην πρώτη. Τέλος, τονίζεται ότι και τα δύο δείγματα εμφανίζουν βελτιωμένες τιμές στο TPC, σε σχέση με τα δείγματα που προέκυψαν από τις προηγούμενες μεθόδους εκχύλισης. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι ο συνδυασμός

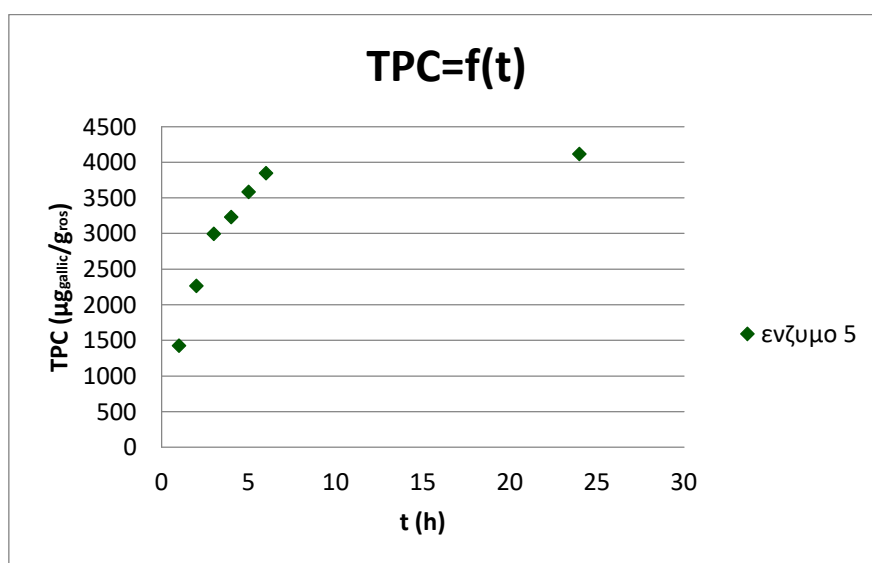
των δύο αυτών μεθόδων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, οδηγεί σε αύξηση του περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων.

Στη συνέχεια, εφόσον η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από τη συμβατική εκχύλιση έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, επιλέχθηκε να μελετηθεί η κινητική της. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκε δείγμα, το οποίο υποβλήθηκε σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, με τη χρήση πηκτινάσης, για  $t=1h$  και ακολούθησε συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=0-24h$ . Η αρχική συγκέντρωση του δείγματος ήταν  $C_0 = 1 \frac{g}{L}$ . Παρακάτω, παρουσιάζονται οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν για την εκάστοτε ώρα, καθώς και οι τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων αντίστοιχα. Επιπλέον, σύμφωνα με την εξίσωση (33) υπολογίστηκε και η (%) ενίσχυση του TPC χάρη στη χρήση ενζύμων, οι τιμές τις οποίας αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 34: Οι τιμές της απορρόφησης, του TPC και της (%) ενίσχυσης του TPC των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση

Δείγμα - μέθοδος εκχύλισης	Abs	TPC ( $\frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$ )	(%) ενίσχυση
0h	0,0897	216	-
1h EAE	0,3547	1428	-
1h EAE + 1h CEM	0,0791	2267	37
1h EAE + 2h CEM	0,1244	2998	52
1h EAE + 3h CEM	0,1390	3233	56
1h EAE + 4h CEM	0,1609	3586	60
1h EAE + 5h CEM	0,1772	3849	63
1h EAE + 24h CEM	0,1939	4118	65

Με βάση τις τιμές του πίνακα (33) κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 5: το διάγραμμα των ολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) του δείγματος που υποβλήθηκε σε ενζυμική εκχύλιση ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση

Από τις παραπάνω μετρήσεις και το διάγραμμα (18) συμπεραίνεται ότι το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις του δείγματος που υποβλήθηκε σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Μάλιστα, σε  $t=24h$ , υπολογίστηκε ότι  $TPC=4118 \frac{\mu g_{gallic}}{g_{rosemary}}$ , ενώ παρατηρείται 65% ενίσχυση του περιεχομένου του δείγματος σε φαινολικά συστατικά. Η τιμή αυτή αποτελεί τη μέγιστη που έχει βρεθεί στην παρούσα διπλωματική. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση για  $t=1h$  με τη χρήση πηκτινάσης, σε συνδυασμό με τη συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$  αποτελεί τη βέλτιστη λύση για την αύξηση της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε φαινολικά. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, καθώς υποδεικνύει ότι η επεξεργασία με ένζυμα ενισχύει την απελευθέρωση συστατικών που πιθανόν να μην ήταν εφικτό να εκχυλιστούν με άλλες μεθόδους, διότι η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εγγενή ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν αντιδράσεις κάτω από ήπιες συνθήκες, με εξαιρετική εκλεκτικότητα.

### 6.3.2 Ανάλυση βέλτιστου εκχυλίσματος

Όπως αποδείχθηκε παραπάνω, το εκχύλισμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις ήταν εκείνο που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης και του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση, με τη χρήση EtOH 50%, για  $t=24h$ . Επομένως, το δείγμα αυτό παρασκευάστηκε εκ νέου, με σκοπό τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, των ολικών φαινολικών ενώσεων, των ολικών φλαβονοειδών και των ολικών συμπυκνωμένων τανινών. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανάλυση έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως στα αντίστοιχα κεφάλαια.

#### 6.3.2.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα

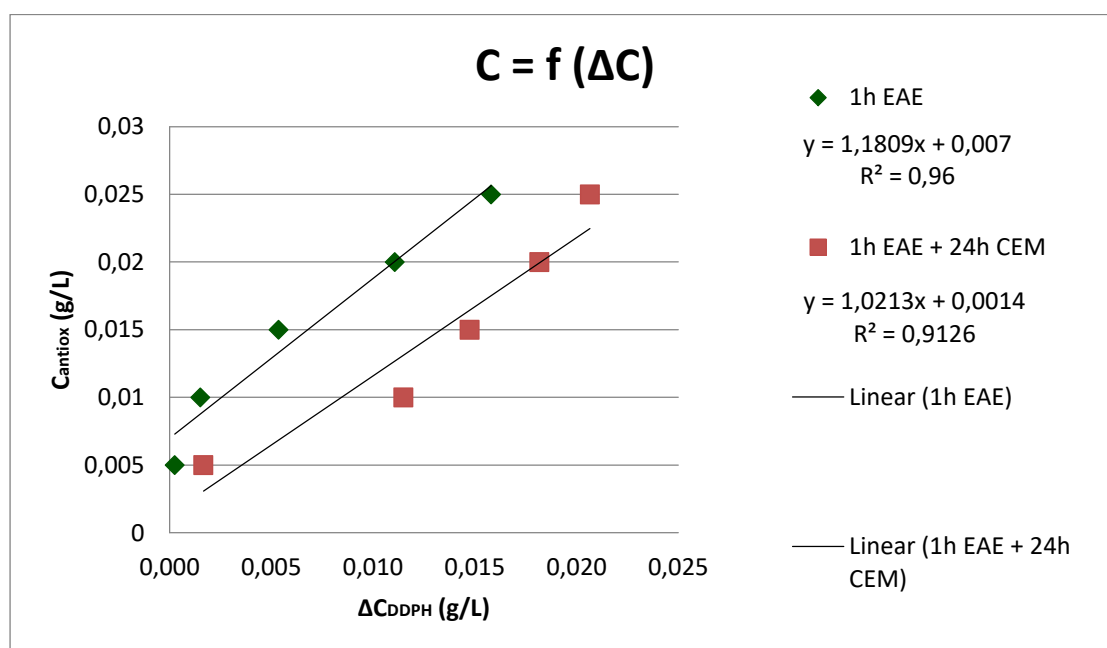
Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε τόσο στο τελικό δείγμα, όσο και στο διήθημα που συλλέχθηκε μετά την ενζυμική εκχύλιση και προτού το υπερκείμενο οδηγηθεί προς συμβατική εκχύλιση. Τα δείγματα, αρχικής συγκέντρωσης  $C_0 = 1 \frac{g}{L}$ , μετά την κατεργασία τους, υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση και οδηγήθηκαν προς περαιτέρω ανάλυση.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας που περιλαμβάνει τις τιμές των απορροφήσεων, όπως αυτές μετρήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis και τις τιμές των αντίστοιχων συγκεντρώσεων ( $C_{antiox} - A_{DPPH}$ ) για τα δύο αυτά δείγματα, ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$  και ένας τελικός πίνακας με τις τιμές  $IC_{50}$ , όπως υπολογίστηκαν σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία και την εξίσωση (25):

Πίνακας 35: Οι τιμές των συγκεντρώσεων και των αντίστοιχων απορροφήσεων για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM

Δείγμα	$C_0 \left(\frac{g}{L}\right)$	Abs
1h EAE	1	0,2722
	0,8	0,3911
	0,6	0,5346
	0,4	0,6312
	0,2	0,6628
1h EAE + 24h CEM	1	0,1502
	0,8	0,2126
	0,6	0,2987
	0,4	0,3805
	0,2	0,6275

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα κατασκευάζεται το εξής διάγραμμα:



Διάγραμμα 6: Το διάγραμμα  $C_{antiox}$ - $\Delta C_{DDPH}$  για το δείγμα που υποβλήθηκε σε EAE για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από CEM για  $t=24h$

Εν συνεχεία παρουσιάζονται οι τιμές  $IC_{50}$  για τα δείγματα:

Πίνακας 36: Οι τιμές  $IC_{50}$  για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM

Δείγμα	$IC_{50} \left(\frac{mg}{L}\right)$
1h EAE	21,9
1h EAE + 24h CEM	14,3



Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, επαληθεύεται ξανά ότι ο συνδυασμός της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης (για t=1h) και της συμβατικής εκχύλισης (για t=24h) βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων ( $IC_{50} = 14,3 \frac{mg}{L}$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι η τιμή αυτή είναι παραπλήσια με την αντίστοιχη τιμή του δείγματος που προκύπτει από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, με τη χρήση πηκτινάσης, για t=5h ( $IC_{50} = 13,2 \frac{mg}{L}$ ), καθώς και με του δείγματος που προκύπτει από συμβατική εκχύλιση, με 95% EtOH, για t=24h ( $IC_{50} = 12,1 \frac{mg}{L}$ ).

### 6.3.2.2 Ολικές φαινολικές ενώσεις

Το περιεχόμενο σε ολικές φαινολικές ενώσεις δείγματος που εκχυλίστηκε κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες έχει ήδη μετρηθεί (πίνακες 34, 35). Παρολ'αυτά η μέτρηση αυτή επαναλήφθηκε για το δείγμα που κατασκευάστηκε εκ νέου, προκειμένου να ελεγχθεί αν το συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι επαναλήψιμο και συνεπώς αξιόπιστο. Τονίζεται ακόμη ότι, όπως και στην περίπτωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο στο τελικό δείγμα όσο και στο διήθημα. Επομένως, κατασκευάζεται ο ακόλουθος πίνακας που περιλαμβάνει τις τιμές των απορροφήσεων, αλλά και του TPC, όπως υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση (22):

Πίνακας 37: Οι τιμές της απορρόφησης και του TPC για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM

Δείγμα	Abs	TPC ( $\frac{\mu g_{gallia}}{g_{rosemary}}$ )
1h EAE	0,3276	1320
1h EAE + 24h CEM	0,6361	3965

Όπως είχε ήδη διαπιστωθεί, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση, στους προεπιλεγμένους χρόνους, βελτιώνει σημαντικά την εξαγωγή των ολικών φαινολικών ενώσεων ( $TPC = 4071 \frac{\mu g_{gallia}}{g_{rosemary}}$  κατά μέσο όρο). Μάλιστα, συγκρίνοντας την τιμή αυτή με το καλύτερο αποτέλεσμα που προέκυψε από τις μεμονωμένες μεθόδους εκχύλισης και συγκεκριμένα τη συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH, όπου  $TPC = 2998 \frac{\mu g_{gallia}}{g_{rosemary}}$  (πίνακας 19), προκύπτει ότι η διαφορά αυτή είναι αρκετά μεγάλη. Συνεπώς, ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων, στις προαναφερόμενες συνθήκες, ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου η εξαγωγή φαινολικών ενώσεων αποτελεί κύριο στόχο της εκχύλισης.

### 6.3.2.3 Ολικά φλαβονοειδή

Όπως και στις δύο παραπάνω αναλύσεις, αντίστοιχα και στην περίπτωση των ολικών φλαβονοειδών, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τόσο στο τελικό δείγμα όσο και στο διήθημα. Η μεθοδολογία για τη μέτρηση του TFC έχει ήδη αναφερθεί, επομένως, σύμφωνα με τις τιμές που προέκυψαν για την απορρόφηση με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis και την εξίσωση (23), κατασκευάζεται ο ακόλουθος πίνακας:

Πίνακας 38: Οι τιμές της απορρόφησης και του TFC για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM

Δείγμα	Abs	TFC ( $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ )
1h EAE	0,6253	1714
1h EAE + 24h CEM	0,8821	2540

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι ο η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση, κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, βελτιώνει την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος και σε ολικά φλαβονοειδή (TFC=2540  $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ ). Το αποτέλεσμα αυτό κρίνεται λογικό εφόσον τα φλαβονοειδή αποτελούν υποομάδα των φαινολικών ενώσεων και όπως είχε ήδη εξακριβωθεί η εκχύλιση των δύο αυτών κατηγοριών ευνοείται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (πίνακας 22).

### 6.3.2.4 Ολικές συμπυκνωμένες τανίνες

Κατά αντίστοιχο τρόπο με τις τρεις παραπάνω αναλύσεις, έτσι και στην περίπτωση των ολικών συμπυκνωμένων τανινών, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε τόσο στο τελικό δείγμα όσο και στο διήθημα. Η μεθοδολογία για τη μέτρηση του TCT έχει ήδη αναφερθεί, επομένως, σύμφωνα με τις τιμές που προέκυψαν για την απορρόφηση με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis και την εξίσωση (24), κατασκευάζεται ο ακόλουθος πίνακας:

Πίνακας 39: Οι τιμές της απορρόφησης και του TCT για το δείγμα που υποβλήθηκε σε 1h EAE και 24h CEM

Δείγμα	Abs	TCT ( $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ )
1h EAE	0,2042	265
1h EAE + 24h CEM	0,2542	600

Παρατηρώντας τον πίνακα (40), εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης (συνδυασμός ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης για 1h και συμβατικής εκχύλισης για 24h) αυξάνει την περιεκτικότητα του δείγματος σε ολικές συμπυκνωμένες τανίνες (TCT=600  $\frac{\mu\text{g catechin}}{\text{g rosemary}}$ ). Όπως και στην

περίπτωση των ολικών φλαβονοειδών, αυτό το αποτέλεσμα αναμενόταν, δεδομένου ότι οι τανίνες είναι υποκατηγορία των φλαβονοειδών και ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, γεγονός, που όπως επιβεβαιώθηκε στον πίνακα (25), συμβάλλει στην ενίσχυση της εκχύλισής τους κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

## 6.4 Μελέτη κινητικής

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω πειράματα, έγινε μία προσπάθεια μελέτης της κινητικής της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των αντίστοιχων σταθερών. Ο ρυθμός της εκχύλισης περιγράφεται καλύτερα από την εξίσωση δεύτερης τάξης:

$$\frac{dC_t}{dt} = k \cdot (C_e - C_t)^2 \quad (34)$$

Όπου,

k: η σταθερά του ρυθμού εκχύλισης ( $\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}\cdot\text{min}}$ )

C<sub>e</sub>: το δυναμικό εκχύλισης, δηλαδή η συγκέντρωση ισοροπίας των ολικών φαινολικών στο διάλυμα εκχύλισης ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ )

C<sub>t</sub>: η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών σε χρόνο εκχύλισης t ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ).

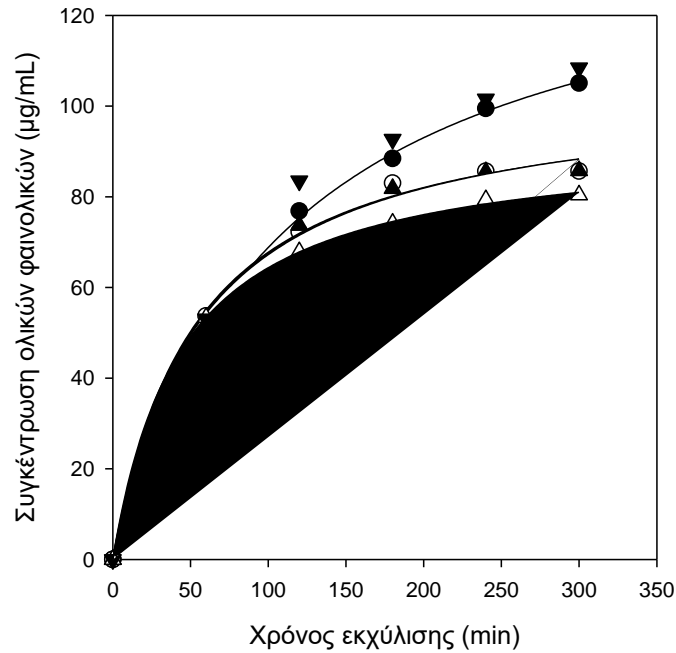
Με ολοκλήρωση της εξίσωσης (34), (οριακές συνθήκες t = 0 έως t και C<sub>t</sub> = 0 έως C<sub>t</sub>) προκύπτει ότι:

$$C_t = \frac{C_e^2 \cdot k \cdot t}{1 + C_e \cdot k \cdot t} \quad (35)$$

Από την εξίσωση (35) προκύπτει ότι ο αρχικός ρυθμός εκχύλισης, v<sub>0</sub> ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ ), όταν το  $\frac{C_t}{t}$  τείνει στο μηδέν, ορίζεται από την εξίσωση:

$$v_o = k \cdot C_e^2 \quad (36)^{[122]}$$

Συνεπώς, χρησιμοποιώντας τις παραπάνω εξισώσεις, τα δεδομένα του πίνακα (30), αλλά και το πρόγραμμα SigmaPlot (SysStat Software, Inc), προσδιορίζεται η κινητική της εκχύλισης για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση. Κατασκευάζεται, δηλαδή, το ακόλουθο διάγραμμα και εν συνεχεία προσδιορίζονται οι σταθερές C<sub>e</sub>, k και C<sub>0</sub>:



Διάγραμμα 7: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35).  
 (●) Alcalase 2.4 L FG, (○) Cellic CTec2, (▲) Viscozyme L, (△) Cellic HTec2, (▼) Bioprep 3000L

Με βάση τα προαναφερθέντα κατασκευάζεται ο ακόλουθος πίνακας:

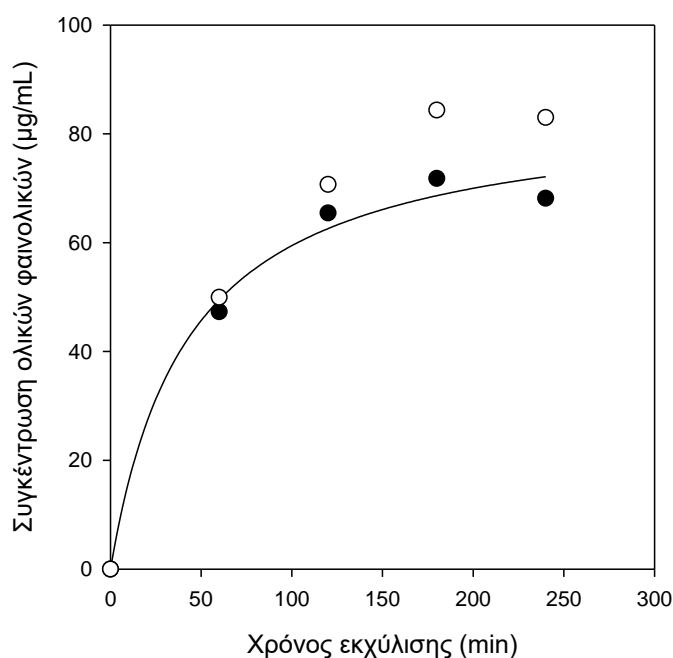
Πίνακας 40: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης

Δείγμα	$C_e \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)$	$k \left(\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}\cdot\text{min}}\right)$	$v_0 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right)$
<b>Cellic HTec2</b>	92,82	2,42E-04	2,09
<b>(<math>R^2 = 0,9997</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
<b>Cellic CTec2</b>	104,00	1,80E-04	1,94
<b>(<math>R^2 = 0,9970</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
<b>Viscozyme L</b>	104,83	1,71E-04	1,88
<b>(<math>R^2 = 0,9964</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
<b>Bioprep 3000L</b>	142,21	7,45E-05	1,51
<b>(<math>R^2 = 0,9975</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			
<b>Alcalase 2.4 L FG</b>	143,58	6,41E-05	1,32
<b>(<math>R^2 = 0,9994</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			

Αρχικά, παρατηρώντας τις τιμές των συντελεστών  $R^2$  και  $p$ , συμπεραίνεται ότι το μοντέλο δεύτερης τάξης (Εξ. 34) προσαρμόζεται πολύ καλά στα πειραματικά δεδομένα. Η αρχική ταχύτητα εκχύλισης ( $v_0$ ) εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο ενζυμικό σκεύασμα. Η υψηλότερη αρχική ταχύτητα παρατηρήθηκε με χρήση του κυτταρινολυτικού σκευάσματος Cellic HTec2 ενώ η χαμηλότερη όταν χρησιμοποιήθηκε το πρωτεολυτικό σκεύασμα (Alcalase 2.4 L FG). Γενικά η αρχική ταχύτητα εκχύλισης με χρήση κυτταρινολυτικών ή ημικυτταρινολυτικών σκευασμάτων βρέθηκε υψηλότερη έναντι του πρωτεολυτικού ή ημικυτταρινολυτικού σκευάσματος. Όμοια οι σταθερές του ρυθμού

(k) βρέθηκαν υψηλότερες για τα κυτταρινολυτικά και ημικυτταρινολυτικά σκευάσματα. Όσον αφορά το δυναμικό της εκχύλισης ( $C_e$ ), τα αποτελέσματα εμφανίζουν αντίθετη συμπεριφορά. Υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην περίπτωση χρήσης πηκτινολυτικού και πρωτεολυτικού σκευάσματος. Αυτό θεωρείται λογικό, καθώς τόσο από το διάγραμμα όσο και από τις τιμές του TPC προκύπτει ότι στο πρωτεολυτικό και στο πηκτινολυτικό δείγμα (όπου pH=8) η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις είναι υψηλότερη.

Κατά αντίστοιχο τρόπο, και από τα δεδομένα του πίνακα (30) καταστρώνεται το διάγραμμα για τα τυφλά δείγματα (δηλαδή το δείγμα με pH=5 και το δείγμα με pH=8):



Διάγραμμα 8: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35).  
 (●) pH=5.0, (○) pH=8.0

Αντίστοιχα υπολογίζονται και οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης:

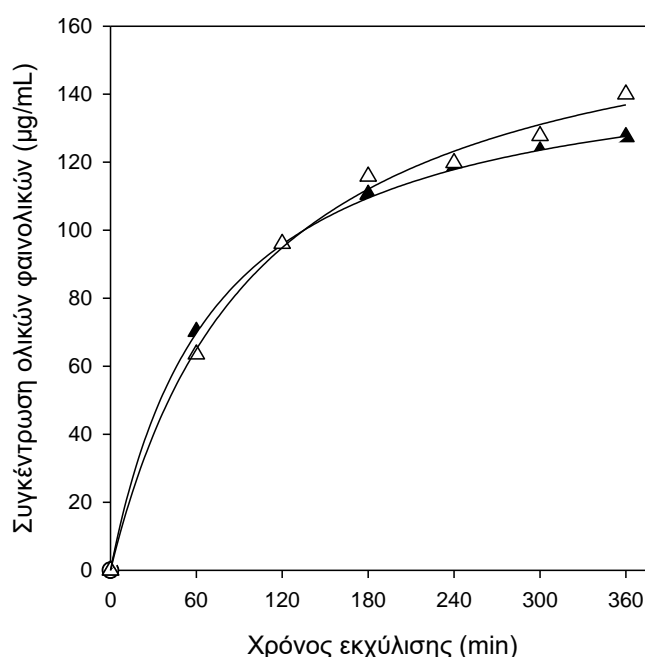
Πίνακας 41: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης

Δείγμα	$C_e$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ )	$k$ ( $\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}\cdot\text{min}}$ )	$v_0$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ )
<b>pH=5.0</b>	85,01	2,73E-04	1,97
<b>(<math>R^2 = 0,9891</math>, <math>p=0,0005</math>)</b>			
<b>pH=8.0</b>	112,11	1,26E-04	1,58
<b>(<math>R^2 = 0,9939</math>, <math>p=0,0002</math>)</b>			

Και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται εξαιρετικά καλή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων. Οι τιμές της αρχικής ταχύτητας εκχύλισης και της σταθεράς του ρυθμού ( $k$ ) με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος με pH=5.0 είναι 1.2

φορές και 2.2 φορές αντίστοιχα, μεγαλύτερες των τιμών pH=8.0. Το δυναμικό εκχύλισης όμως εμφανίζεται υψηλότερο στην περίπτωση της εκχύλισης με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος με pH=8.0. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η υπόθεση ότι το αλκαλικό pH ευνοεί την εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων, καθώς σε αυτές τις τιμές η πολικότητα των φαινολών αυξάνεται, επιδρώντας θετικά στην εκχύλισή τους. Συγκρίνοντας τις τιμές του πίνακα (42) με αυτές των αντίστοιχων δειγμάτων που περιείχαν ένζυμο, προκύπτει ότι η ύπαρξη του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση της τιμής του  $C_e$ . Εξάγεται, επομένως, το συμπέρασμα ότι το ένζυμο επιδρά θετικά στην εκχύλιση των βιοενεργών συστατικών.

Χρησιμοποιώντας, ακολούθως, τις τιμές του πίνακα (33), κατασκευάζεται το εξής διάγραμμα:



Διάγραμμα 9: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35).

(●) 25 μL πηκτινάσης, (○) 50 μL πηκτινάσης, (▲) 25 μL πηκτινάσης (1 h) + CEM, (△) 50 μL πηκτινάσης (1 h) + CEM

Αντίστοιχα υπολογίζονται και οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης:

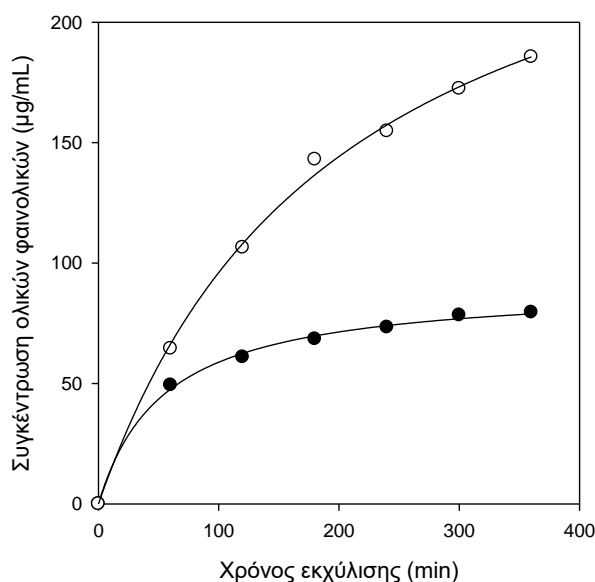
Πίνακας 42: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης

Δείγμα	$C_e$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ )	$k$ ( $\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}\cdot\text{min}}$ )	$v_0$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ )
25 μL πηκτινάσης	122,88	1,24E-04	1,87
<b>(<math>R^2 = 0,9994</math>, <math>p=0,0003</math>)</b>			
25 μL πηκτινάσης (+EtOH)	152,52	9,18E-05	2,14
<b>(<math>R^2 = 0,9997</math>, <math>p&lt;0,0001</math>)</b>			
50 μL πηκτινάσης	138,90	9,72E-05	1,88
<b>(<math>R^2 = 0,9989</math>, <math>p=0,0005</math>)</b>			

<b>50 <math>\mu</math>L πηκτινάσης (+EtOH)</b>	175,22	5,59E-05	1,72
<b>(<math>R^2 = 0,9965</math>, <math>p &lt; 0,0001</math>)</b>			

Όπως προηγουμένως, και σε αυτήν την περίπτωση εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα πειραματικά αποτελέσματα εμφανίζουν πολύ καλή προσαρμογή, αλλά και ότι η αρχική ταχύτητα δεν εμφανίζει αξιοσημείωτες διακυμάνσεις. Μικρές διαφορές, όμως, παρατηρούνται και για το δυναμικό της εκχύλισης, γεγονός που υποδηλώνει ότι, όπως ήδη αναφέρθηκε, η αύξηση στη συγκέντρωση επιδρά ελάχιστα στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Αυτό οφείλεται είτε στο γεγονός ότι στην πραγματικότητα η συγκέντρωση ενζύμου που επιλέχθηκε ήταν αρκετά μικρή, με αποτέλεσμα ο διπλασιασμός της να μην προκαλεί σημαντική επίδραση, είτε η συγκέντρωση ήταν αρκετά μεγάλη, σε βαθμό που το ένζυμο είχε δράσει κατά το μέγιστο δυνατό. Τέλος, συμπεραίνεται ότι η προσθήκη αιθανόλης προκαλεί αύξηση της συγκεκριμένης σταθεράς, το οποίο ήταν αναμενόμενο, καθώς όπως είχε προαναφερθεί η αιθανόλη συμβάλλει θετικά στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και αποτρέπει τη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις.

Τέλος, από τα δεδομένα του πίνακα (35) πραγματοποιήθηκε η εύρεση της κινητικής για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση. Κατασκευάζεται, λοιπόν, το ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 10: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Η γραμμή είναι η προσαρμογή του μοντέλου δεύτερης τάξης (Εξ. 35).  
 (●) Σύμβατική εκχύλιση (50% αιθανόλη), (○) EAE + CEM

Από τα παραπάνω υπολογίζονται και οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης:



Πίνακας 43: Οι σταθερές του μοντέλου δεύτερης τάξης

Δείγμα	$C_e$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ )	$k$ ( $\frac{\text{mL}}{\mu\text{g}\cdot\text{min}}$ )	$v_0$ ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}\cdot\text{min}}$ )
EAE (1h)	90,83	2,03E-04	1,67
<b>(R<sup>2</sup> = 0,9978, p&lt;0,0001)</b>			
EAE (1h) + CEM (24h)	287,58	1,74E-05	1,44
<b>(R<sup>2</sup> = 0,9979, p&lt;0,0001)</b>			

Και στην τελευταία περίπτωση που μελετήθηκε, υπάρχει πολύ καλή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων, ενώ δεν εμφανίζονται μεγάλες διαφορές ως προς την αρχική ταχύτητα. Βέβαια, η τιμή του δυναμικού της εκχύλισης είναι εμφανώς υψηλότερη για το δείγμα που εκχυλίστηκε με συνδυασμό των δύο μεθόδων. Το γεγονός αυτό κρίνεται ως λογικό, καθώς επιβεβαιώνεται από το αντίστοιχο διάγραμμα και επιπλέον οι τιμές για τα ολικά φαινορικά (TPC) είναι ιδιαίτερα υψηλές.

## 6.5 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

### 6.5.1 Δημιουργία βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, προκειμένου να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση ορισμένων ενώσεων στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, έγινε μία προσπάθεια για την κατασκευή μίας βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων. Το πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας ήταν ότι τα φάσματα μάζας αυτών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, όσο και μελλοντικά.

Από τα φάσματα μάζας των πρότυπων ουσιών, δηλαδή τα γραφήματα της (σχετικής) έντασης ως προς το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), εξήχθησαν πληροφορίες σχετικά με το χρόνο ανάσχεσης (RT) της κάθε ουσίας, ο οποίος αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος, και το λόγο (m/z), (πίνακας 41). Σε αυτόν τον πίνακα παρέχονται και πληροφορίες για τις κύριες κορυφές (m/z) του εκάστοτε δείγματος, όπως αυτές έχουν βρεθεί στη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST, η οποία περιλαμβάνει φάσματα που έχουν ληφθεί από πιστοποιημένα εργαστήρια. Τονίζεται, ακόμη, ότι ο λόγος (m/z) που καταγράφεται πρώτος αντιστοιχεί στη βασική κορυφή του φάσματος, δηλαδή την υψηλότερη κορυφή στην οποία αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100%, ενώ οι υπόλοιπες τιμές ακολουθούν φθίνουσα σειρά ως προς την ένταση:

Πίνακας 44: Τα αποτελέσματα από τα φάσματα μάζας για τις πρότυπες ενώσεις

Συστατικό	RT (min)	m/z	(m/z) <sub>NIST</sub>
Γαλλικό οξύ	34,184	458, 281, 443	73, 281, 458
Βενζοϊκό οξύ	12,269	105, 179	77, 105, 135, 179
Καφεϊκό οξύ	39,742	396, 219, 397, 220	73, 219, 220, 381,

			396, 397
<b>p-κουμαρικό οξύ</b>	33,550	<b>293, 219, 308, 382, 294</b>	73, 219, 249, 293, 308
<b>Χρυσίνη</b>	53,617	<b>326, 383, 311, 384</b>	184, 311, 383
<b>Κατεχίνη</b>	60,30	<b>368, 370, 371</b>	267, 368
<b>Φερουλικό οξύ</b>	38,30	<b>338, 339, 249, 293</b>	73, 249, 308, 323, 338
<b>Αβιετικό οξύ</b>	47,510	<b>256, 257, 241, 374</b>	241, 256, 257, 359, 374
<b>Τυροσόλη</b>	21,460	<b>193, 179, 267, 282</b>	73, 179, 193, 267

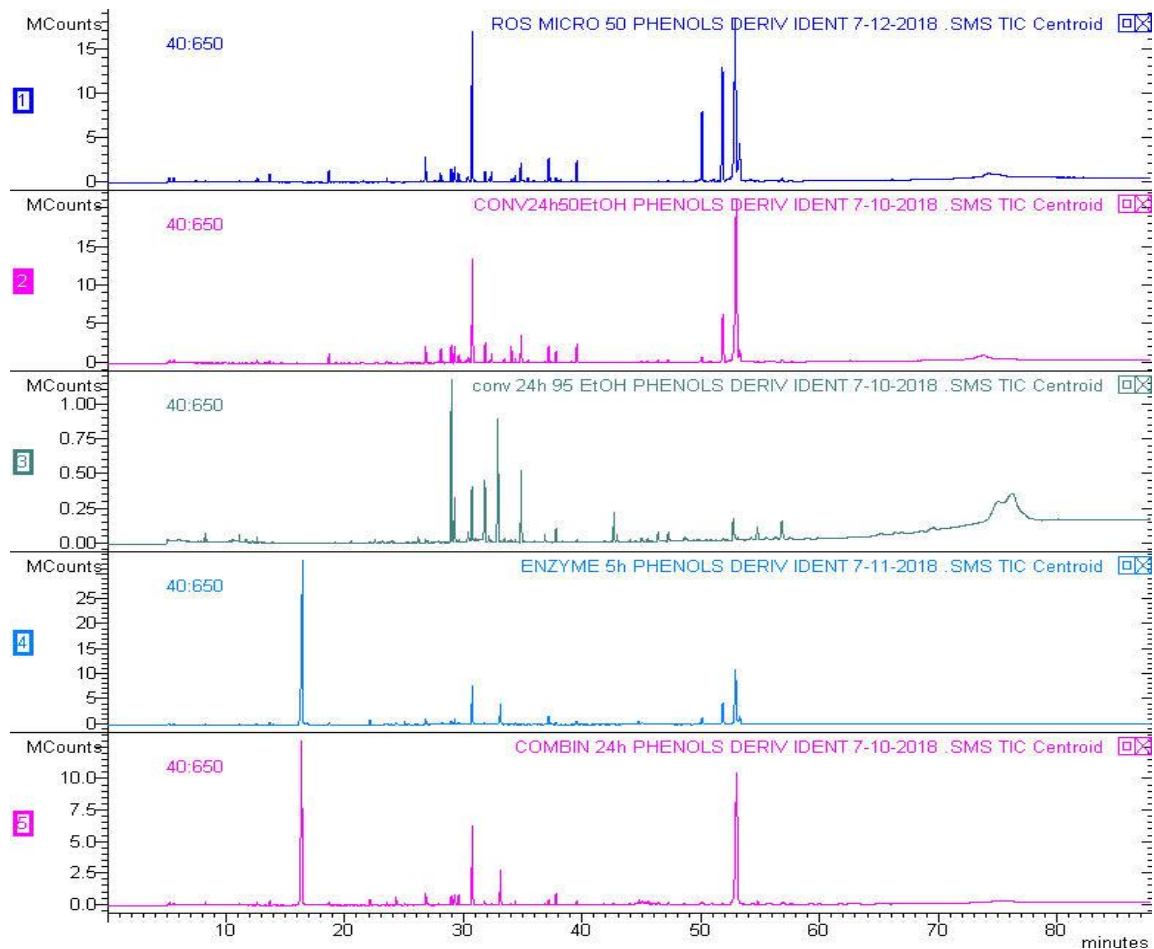
Παρατηρείται ότι υπάρχει συμφωνία μεταξύ των τιμών για το λόγο (m/z) που προέκυψαν από τα δείγματα του εργαστηρίου, με τις αντίστοιχες τιμές που λήφθηκαν από τη βιβλιοθήκη NIST. Συνεπώς, οι πρότυπες αυτές ενώσεις θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ώστε να ερευνηθεί η ύπαρξη τους στα, προς μελέτη, εκχυλίσματα.

## 6.5.2 Ανάλυση εκχυλισμάτων

Η τεχνική GC-MS εφαρμόστηκε σε πέντε δείγματα, τα οποία υποβλήθηκαν στις ακόλουθες μεθόδους εκχύλισης:

- i. **Εκχύλισμα 1:** Συμβατική εκχύλιση, με χρήση EtOH 50%, για t=24h.
- ii. **Εκχύλισμα 2:** Συμβατική εκχύλιση, με χρήση EtOH 95%, για t=24h.
- iii. **Εκχύλισμα 3:** Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με χρήση EtOH 50%, για t=1h.
- iv. **Εκχύλισμα 4:** Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, με χρήση πηκτινάσης, για t=5h.
- v. **Εκχύλισμα 3:** Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, με χρήση πηκτινάσης, για t=1h, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH, για t=24h.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των πέντε αυτών δειγμάτων:



Εικόνα 39: Τα χρωματογραφήματα των πέντε εκχυλισμάτων

Όπως είναι εμφανές τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται διαφοροποιούνται ως προς την εμφάνιση ορισμένων κορυφών. Αυτή η διαφοροποίηση σχετίζεται άμεσα με τις μεθόδους εκχύλισης, καθώς εννοείται η εξαγωγή ορισμένων συστατικών, ενώ εμποδίζεται η εκχύλιση άλλων. Τονίζεται, ακόμη, ότι εφόσον πραγματοποιείται μόνο ποιοτικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων, η ολοκλήρωση των κορυφών δεν θα σχολιαστεί. Με βάση την εικόνα (41), παρατηρείται ομοιότητα μεταξύ των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από τη συμβατική και την εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα με τη χρήση του ίδιου διαλύτη (50% EtOH), αλλά και αυτών που προέκυψαν από την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και το συνδυασμό των δύο μεθόδων. Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι το δείγμα που προέκυψε από συμβατική εκχύλιση με 95% EtOH εμφανίζει περισσότερες κορυφές συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

Τα χρωματογραφήματα αυτά αναλύθηκαν, με σκοπό την ταυτοποίηση κάποιων συστατικών τους. Αρχικά, σύμφωνα με τη βιβλιοθήκη NIST, διαπιστώθηκε ότι οι κορυφές που εμφανίζονται στην αρχή του φάσματος ( $t=10-20\text{min}$ ) μόνο στα δείγματα που εμπεριέχουν ένζυμο (δηλαδή στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και στο συνδυασμό των δύο μεθόδων) οφείλονται σε παράγωγα

αμίνης. Το αποτέλεσμα αυτό θεωρείται απόλυτα λογικό, καθώς τα ένζυμα περιέχουν αμινο-ομάδες, γεγονός που οδήγησε στην ανίχνευσή τους στο GC-MS.

Επιπλέον, οι ενώσεις που αντιστοιχούν στις κορυφές για  $t=50-60\text{min}$  σε όλα τα δείγματα αποδίδονται σε σάκχαρα, που προέρχονται από την υδρόλυση των γλυκοζυλιωμένων παραγώγων των συστατικών των φύλλων δενδρολίβανου αλλά και τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση κορυφής σε  $t=53,373\text{min}$  που αποδίδεται στην  $\alpha\text{-D-γλυκοκυρανόζη}$  ( $m/z$ : 361,362,217), ενώ σε ενδιάμεσους χρόνους ανιχνεύθηκαν  $\beta\text{-μελιβιόζη}$  και  $\text{D-φρουκτόζη}$ .

Στη συνέχεια, με βάση τη βιβλιοθήκη πρότυπων ενώσεων που δημιουργήθηκε, επιτεύχθηκε η αναγνώριση ορισμένων συστατικών. Μάλιστα, το βενζοϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το  $p\text{-κουμαρικό οξύ}$ , το  $\alpha\text{-βιετικό οξύ}$  και η κατεχίνη ταυτοποιήθηκαν και στα πέντε δείγματα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα και φάσματα μάζας που παρατίθενται στο παράρτημα της διπλωματικής.

Εν κατακλείδι, έγινε μία προσπάθεια ταυτοποίησης ορισμένων ενώσεων που είναι χαρακτηριστικές στο δενδρολίβανο. Τονίζεται, ότι η ταυτοποίηση αυτών δεν θεωρείται απόλυτη, αλλά βασίζεται σε ένα υποθετικό πλαίσιο, καθώς πρόκειται για σιλυλιωμένα παράγωγα γλυκοζυλιωμένων ενώσεων, των οποίων τα φάσματα δεν μπορούν να βρεθούν σε πρότυπες βιβλιοθήκες. Στο σκοπό αυτό συνέβαλαν, επίσης, και προηγούμενες έρευνες που είχαν πραγματοποιηθεί σχετικά με την εφαρμογή της μεθόδου GC-MS στο δενδρολίβανο, οι οποίες περιλάμβαναν τους λόγους ( $m/z$ ) των κύριων συστατικών του.<sup>[123, 124]</sup>

Με βάση τα παραπάνω, εκτιμάται η ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος και στα πέντε δείγματα, όπως φαίνεται στα φάσματα μάζας που βρίσκονται στο παράρτημα. Κατά αντίστοιχο τρόπο, προτείνεται και η ύπαρξη του 12- $\text{O-μεθυλο-καρνοσικού οξέος}$  σε όλα τα δείγματα. Τέλος, εκτιμάται η ύπαρξη βορνεόλης στο δείγμα που προέκυψε από το συνδυασμό των δύο μεθόδων ( $t=11,672\text{min}$ ,  $m/z$ : 95,108,226,136), η ύπαρξη καρνοσόλης στο δείγμα που προέκυψε από εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα ( $t=39,582\text{min}$ ,  $m/z$ : 430,348,73) και η εμφάνιση του 7-κετο-καρνοσικού οξέος στα δείγματα που προέκυψαν από εκχύλιση με μικροκύματα, ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και από το συνδυασμό των δύο μεθόδων ( $t=52,575\text{min}$ ,  $m/z$ : 359,444,562).

Συνεπώς εξάγεται το συμπέρασμα ότι όλα τα δείγματα περιέχουν κάποια συστατικά, όπως τα σάκχαρα, τα οποία και αναμένονταν καθώς πρόκειται για φυτικό προϊόν. Επιπρόσθετα, επιτεύχθηκε η ανίχνευση φαινολικών οξέων, όπως το βενζοϊκό, το καφεϊκό και το γαλλικό οξύ, τα οποία ανιχνεύθηκαν επιτυχώς χάρη στη βιβλιοθήκη πρότυπων ουσιών που κατασκευάστηκε. Όσον αφορά τα κύρια συστατικά του δενδρολίβανου, η ακριβής ταυτοποίησή τους δεν ήταν εφικτή. Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκε μία αξιολόγηση των συστατικών που

βρέθηκαν στα φάσματα μάζας, σύμφωνα με την οποία εμφανίζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων. Αυτό κρίνεται ως αναμενόμενο διότι ο κάθε τρόπος εκχύλισης επιδρά διαφορετικά στο εκάστοτε δείγμα, γεγονός που επηρεάζει την περιεκτικότητά του σε βιοενεργά συστατικά. Για αυτό το λόγο άλλωστε παρατηρούνται και οι αντίστοιχες διαφοροποιήσεις στις αναλύσεις που έχουν ήδη καταγραφεί.

## 6.6 Δοκιμές σταθερότητας στην καλλυντική κρέμα

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πρώτες μετρήσεις στα δύο δείγματα (**Δείγμα α:** συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για  $t=24h$  και **Δείγμα β:** ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με τη χρήση πηκτινάσης για  $t=5h$ ), αλλά και στο τυφλό, πραγματοποιήθηκαν την ημέρα παρασκευής τους. Σύμφωνα με αυτές, καταγράφονται τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 45: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα αρχικά δείγματα

	<b>Δείγμα α</b>	<b>Δείγμα β</b>	<b>Blank</b>
<b>Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα</b>	Whitish to light yellowish	Light beige cream	White cream
<b>pH</b>	5,46	5,49	5,38
<b>Ιξώδες</b>	57800 (75.8% F/12)	57332(73.7% F/12)	59050 (73.2% F/12)
<b>Φυγοκέντρωση</b>	√	√	√

Τονίζεται ότι προκειμένου ένα προϊόν να θεωρηθεί κατάλληλο για χρήση, θα πρέπει τα αποτελέσματα από τις δοκιμές σταθερότητας στις διάφορες θερμοκρασίες για τον εκάστοτε χρόνο να μην αποκλίνουν αρκετά από αυτά που προέκυψαν σε χρόνο  $t=0$ . Σύμφωνα με τα παραπάνω, κατασκευάζονται οι ακόλουθοι πίνακες που περιλαμβάνουν τις μετρήσεις από τις δοκιμές σταθερότητας που έλαβαν χώρα:

➤ Δείγματα που τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι στους T=5°C για ένα μήνα:

Πίνακας 46: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=5°C

Δείγματα στους 5°C	Δείγμα α	Δείγμα β	Blank
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	Whitish to light yellowish	Light beige cream	White cream
pH	5,41	5,46	5,44
Ιξώδες	207e3 (66.2% F/3)	182e3(58.3% F/3)	214e3(68.6% F/3)
Φυγοκέντρηση	√	√	√

Κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων στους T=5°C, δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές στα προς εξέταση χαρακτηριστικά αυτών. Συγκεκριμένα, το χρώμα και των τριών δειγμάτων παρέμεινε σταθερό (λευκό προς ανοιχτό κιτρινωπό, ανοιχό μπεζ και άσπρο αντίστοιχα). Μάλιστα, έπειτα από τον οπτικό έλεγχο διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν συσσωματώματα στην κρέμα. Επιπλέον, η φυγοκέντρηση δεν οδήγησε σε διαχωρισμό, είτε της λιπαρής είτε της υδατικής φάσης. Όσον αφορά το pH και το ιξώδες, οι τιμές αυτών των μεγεθών παρέμειναν εντός των επιθυμητών ορίων.

➤ Δείγματα που τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι στους T=25°C για ένα μήνα:

Πίνακας 47: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=5°C

Δείγματα στους 25°C	Δείγμα α	Δείγμα β	Blank
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	Whitish to light yellowish	Light beige cream	White cream
pH	5,38	5,50	5,40
Ιξώδες	59206 (75.6% F/12)	55570(68.6% F/12)	63112 (81.1% F/12)
Φυγοκέντρηση	√	√	√

Και σε αυτήν την περίπτωση, ο οπτικός έλεγχος των δειγμάτων ήταν επιτυχής, καθώς κανένα δείγμα δεν παρουσίασε χρωματική μεταβολή. Επιπλέον, οι φάσεις των γαλακτωμάτων παρέμειναν αναμεμιγμένες στις συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης, διότι δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός έπειτα από τη φυγοκέντρηση. Τέλος, οι τιμές του pH και του ιξώδους δεν εμφάνισαν έντονες διακυμάνσεις, δεδομένου ότι αυτές οι μικρές αλλαγές των τιμών θεωρούνται αποδεκτές.

- Δείγματα που τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι στους T=40°C για ένα μήνα:

Πίνακας 48: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=40°C

Δείγματα στους 40°C	Δείγμα α	Δείγμα β	Blank
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	Whitish to light yellowish	Light beige cream	White cream
pH	5,38	5,42	5,38
Ιξώδες	52489 (65.0% F/12)	45615 (58.0% F/12)	59861 (76.4% F/12)
Φυγοκέντρηση	√	√	√

Ο τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία T=40°C δεν προκάλεσε οπτικές μεταβολές στα τρία δείγματα, καθώς αυτά εμφάνισαν το ίδιο χρώμα με την αρχική περίπτωση. Επιπλέον, η φυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, διότι σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των δύο φάσεων. Τέλος, αντίστοιχα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, οι τιμές του ιξώδους και του pH δεν υπέστησαν αξιοσημείωτες διαφορές, καθιστώντας τα δείγματα σταθερά και σε αυτήν την θερμοκρασία.

- Δείγματα που τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι στους T=50°C για ένα μήνα:

Πίνακας 49: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για τα δείγματα που τοποθετήθηκαν για ένα μήνα στο σκοτάδι στους T=50°C

Δείγματα στους 50°C	Δείγμα α	Δείγμα β	Blank
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	Whitish to light yellowish	Light beige cream	White cream
pH	5,30	5,35	5,35
Ιξώδες	42182 (59.0% F/12)	46784 (59.5% F/12)	46650 (60.7% F/12)
Φυγοκέντρηση	√	√	√

Κατά τη δοκιμή στους T=50°C, τα δείγματα δεν εμφάνισαν οπτικές διαφορές, εφόσον ούτε το χρώμα τους μεταβλήθηκε ούτε έγινε αντιληπτή η ύπαρξη συσσωματωμάτων. Αντίστοιχα, η υποβολή των δειγμάτων σε φυγόκεντρο δεν προκάλεσε κάποια διαφορά, καθώς οι δύο φάσεις δεν διαχωρίστηκαν. Παρόλ'αυτά, σε αυτήν την περίπτωση, παρότι στο τυφλό οι τιμές του pH και του ιξώδους δεν άλλαξαν, στα δύο άλλα δείγματα παρατηρήθηκε μία μικρή μεταβολή. Αναλυτικότερα, τόσο οι τιμές του pH όσο και του ιξώδους εμφάνισαν πτώση. Το γεγονός, βέβαια, ότι η πτώση αυτή δεν ήταν ιδιαίτερα μεγάλη, οδηγεί στην ανάγκη για περαιτέρω μελέτη, για να διαπιστωθεί αν τα δείγματα δεν παραμένουν σταθερά στους T=50°C.



➤ Δοκιμές ψύξης-θέρμανσης 5-45°C στο σκοτάδι:

### Δείγμα α:

Πίνακας 50: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το δείγμα α που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C

Δείγμα α - 5-45°C	7 <sup>η</sup> ημέρα	15 <sup>η</sup> ημέρα	21 <sup>η</sup> ημέρα	29 <sup>η</sup> ημέρα
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	√	√	√	√
pH	5,40	5,35	5,42	5,37
Ιξώδες	53114 (65.6% F/12)	57566 (72.1% F/12)	49208 (63.2% F/12)	58503 (72.0% F/12)
Φυγοκέντρωση	√	√	√	√

### Δείγμα β:

Πίνακας 51: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το δείγμα β που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C

Δείγμα β - 5-45°C	7 <sup>η</sup> ημέρα	15 <sup>η</sup> ημέρα	21 <sup>η</sup> ημέρα	29 <sup>η</sup> ημέρα
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	√	√	√	√
pH	5,49	5,51	5,52	5,50
Ιξώδες	53270 (64.7% F/12)	53114 (67.4% F/12)	51552 (66.0% F/12)	52020 (66.7% F/12)
Φυγοκέντρωση	√	√	√	√

### Τυφλό δείγμα:

Πίνακας 52: Τα αποτελέσματα των δοκιμών σταθερότητας για το τυφλό δείγμα που τοποθετήθηκε στο σκοτάδι σε κύκλους ψύξης-θέρμανσης στους T=5-45°C

Τυφλό δείγμα- 5-45°C	7 <sup>η</sup> ημέρα	15 <sup>η</sup> ημέρα	21 <sup>η</sup> ημέρα	29 <sup>η</sup> ημέρα
Οπτική αξιολόγηση - Χρώμα	√	√	√	√
pH	5,41	5,39	5,38	5,35
Ιξώδες	54582 (68.2% F/12)	52645 (67.4% F/12)	53348 (67.9% F/12)	52020 (70.0% F/12)
Φυγοκέντρωση	√	√	√	√

Σύμφωνα με τους πίνακες (50-52), σε όλους τους κύκλους ψύξης-θέρμανσης, και για τα τρία δείγματα, το χρώμα παρέμεινε σταθερό. Εξίσου επιτυχημένη ήταν και η τοποθέτηση των δειγμάτων σε φυγόκεντρο, καθώς σε καμία περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός της λιπαρής από την υδατική φάση. Τέλος, σταθερότητα παρατηρείται και στις τιμές του pH και του ιξώδους, καθώς παρά τις μικρές διακυμάνσεις που αυτά εμφανίζουν, όλες οι τιμές θεωρούνται αποδεκτές και εντός των επιθυμητών ορίων.

Συνοψίζοντας, η ενσωμάτωση των δύο εκχυλισμάτων σε καλλυντικά σκευάσματα θεωρείται επιτυχής, καθώς αυτά δεν φαίνεται να επηρέασαν τη συμπεριφορά της κρέμας. Αυτό γίνεται αντιληπτό, καθώς καμία από τις παραμέτρους που εξετάστηκε δεν εμφάνισε ακραία τιμή σε κάποια δοκιμή, με εξαίρεση πολύ μικρές διακυμάνσεις που κρίθηκαν ως αποδεκτές. Ωστόσο για να σχηματιστεί πληρέστερη εικόνα για την συμπεριφορά του παρασκευάσματος, θα πρέπει να γίνει εκτεταμένη μελέτη και να πραγματοποιηθούν περαιτέρω δοκιμές σταθερότητας για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

## Συμπεράσματα - Προοπτικές

---

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, στα βιοενεργά συστατικά του δενδρολίβανου. Σύμφωνα με αυτές εξάγονται τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Κατά τη συμβατική εκχύλιση, η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στο διαλύτη προκαλεί μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μετατροπή ορισμένων ενεργών συστατικών, όπως το καρνοσικό οξύ, στις οξειδωμένες μορφές τους, οι οποίες έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. (πίνακας 16)
- Κατά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στο διαλύτη προκαλεί αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης, το οποίο αποδίδεται στην υψηλότερη διηλεκτρική σταθερά, που όπως αναφέρθηκε αποτελεί κρίσιμη παράμετρο της συγκεκριμένης τεχνικής. (πίνακας 16)
- Κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, η χρήση πηκτινάσης ή πρωτεάσης ενισχύει την απελευθέρωση των βιοενεργών συστατικών, συγκριτικά με τη χρήση κυτταρινάσης ή ημικυτταρινάσης. (πίνακας 30)
- Κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, όλα τα δείγματα εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά. Πιο αναλυτικά, το περιεχόμενο σε

ολικές φαινολικές ενώσεις αυξάνεται για  $t=5h$ , όπου και εμφανίζεται η μέγιστη τιμή, ενώ για  $t=5-24h$ , παρατηρείται μείωση (διάγραμμα 17). Αυτό οφείλεται αρχικά στη χρήση των συγκεκριμένων ρυθμιστικών διαλυμάτων, καθώς διαπιστώθηκε ότι η συμβατική εκχύλιση με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος προκαλεί μείωση των φαινολικών, ενώ αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τη χρήση αιθανόλης ως διαλύτη (πίνακας 31). Άλλοι πιθανοί λόγοι είναι η παρεμπόδιση της δράσης των ενζύμων από τα φαινολικά συστατικά, αλλά και η βιοαποικοδόμηση κάποιων φαινολών από τα ένζυμα, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα.

- Κατά την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, τόσο η τιμή του pH, όσο και η ποσότητα του ενζύμου παίζουν σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση των βιοενεργών συστατικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα (30), τα δείγματα που κατεργάστηκαν σε  $pH=5$  παρουσιάζουν έντονες διαφοροποιήσεις συγκριτικά με αυτά στα οποία  $pH=8$ . Ακόμη, η ποσότητα του ενζύμου σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, καθώς τα δείγματα που έχουν διπλάσια ποσότητα εμφανίζουν σχετικά μεγαλύτερες τιμές TPC (πίνακας 33). Βέβαια, προκειμένου η διαφορά αυτή να είναι αξιοσημείωτη θα πρέπει να αυξηθεί περισσότερο η ποσότητα του ενζύμου.
- Προκειμένου να περιοριστεί η μείωση των φαινολικών συστατικών προτάθηκε η χρήση αιθανόλης στην ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, μετά από  $t=1h$ , η οποία, όπως διαπιστώνεται στον πίνακα (33) αναστέλει μερικώς τη δράση των ενζύμων, με αποτέλεσμα αυτά να μην αλληλεπιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις και να μην προκαλούν την αποικοδόμησή τους.
- Σε μία προσπάθεια συνδυασμού της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης και της συμβατικής εκχύλισης αποδεικνύεται ότι η προεπεξεργασία με πηκτινάση για  $t=1h$ , ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση για  $t=24h$  με 50% EtOH δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα (πίνακες 34,35)
- Το δείγμα που εμφάνίζει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση είναι αυτό που προέρχεται από συμβατική εκχύλιση με χρήση 95% EtOH ( $IC_{50}=12,1\frac{\mu g}{mL}$ ). Παραπλήσια τιμή, παρατηρείται και στο δείγμα που προέρχεται από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση για  $t=5h$ , με χρήση πηκτινάσης, ( $IC_{50}=13,2\frac{\mu g}{mL}$ ).
- Οι φαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή και οι συμπυκνωμένες τανίνες εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά σε όλα τα δείγματα. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρατηρείται στο δείγμα που προκύπτει από συμβατική εκχύλιση για  $t=24h$  με 50% EtOH

(TPC= $2998 \frac{\mu g \text{ gallic}}{mL}$ ), με παρόμοιες τιμές να εμφανίζουν τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με πηκτινάση ή πρωτεάση για t=5h.

- Όσον αφορά την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, τα αποτελέσματα για τα φαινολικά είναι παραπλήσια (TPC= $2387 \frac{\mu g \text{ gallic}}{mL}$ ), επιβεβαιώνοντας ότι η συγκεκριμένη τεχνική οδηγεί σε σημαντική μείωση του χρόνου εκχύλισης.
- Η προεπεξεργασία με πηκτινάση για t=1h, ακολουθούμενη από συμβατική εκχύλιση με 50% EtOH για t=24h, αποδεικνύεται ότι ενισχύει τόσο την αντιοξειδωτική δράση (IC<sub>50</sub>= $14,3 \frac{\mu g}{mL}$ ), όσο και το περιεχόμενο σε βιοενεργές ενώσεις (TPC =  $4071 \frac{\mu g \text{ gallic}}{mL}$  κατά μέσο όρο, TFC= $2540 \frac{\mu g \text{ catechin}}{mL}$  και TCT= $600 \frac{\mu g \text{ catechin}}{mL}$ ).

Αναφορικά με την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (GC-MS), αρχικά, επιτυγχάνεται η δημιουργία βιβλιοθήκης πρότυπων ενώσεων, το οποίο είναι σημαντικό όχι μόνο για την ανάλυση των συγκεκριμένων φασμάτων, αλλά και για την ανίχνευση και αναγνώριση των πρότυπων ουσιών σε άλλα δείγματα. Όσον αφορά την ανάλυση των εκχυλισμάτων, η εξαγωγή συμπερασμάτων μπορεί να γίνει σε υποθετικό πλαίσιο. Πιο αναλυτικά, ενώ πραγματοποιείται η αναγνώριση των πρότυπων ουσιών (γαλλικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, κατεχίνη και αβιετικό οξύ), η ταυτοποίηση κάποιων κορυφών καθίσταται ιδιαίτερα απαιτητική, καθώς πρόκειται για σιλυλιωμένα παράγωγα γλυκοζυλιωμένων ενώσεων, των οποίων τα φάσματα δεν μπορούν να βρεθούν σε πρότυπες βιβλιοθήκες. Βέβαια, υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη των βασικών συστατικών του δενδρολίβανου (όπως ροσμαρινικό οξύ) και στα πέντε εκχυλίσματα. Ταυτόχρονα, επιτυγχάνεται η αναγνώριση παραγώγων αμίνης, τα οποία εμφανίζονται στα δείγματα που εμπεριέχουν ένζυμο, αλλά και γλυκοζυλιωμένων παραγώγων των φαινολικών ενώσεων, εξαιτίας της πιθανής διάσπασης των φαινολικών. Τέλος, ταυτοποιούνται και πολλά σάκχαρα τα οποία αποτελούν κατεξοχήν προϊόντα του φυτικού κόσμου.

Εν τέλει, κατά την ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε καλλυντική φόρμουλα και τη διεξαγωγή δοκιμών σταθερότητας, η συμπεριφορά της κρέμας δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε καμία περίπτωση. Ο έλεγχος, δηλαδή, του ιξώδους, του pH, της φυγοκέντρου και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών θεωρείται επιτυχής. Για να σχηματιστεί, όμως, πληρέστερη εικόνα για τη συμπεριφορά του παρασκευάσματος, θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω δοκιμές σταθερότητας, οι οποίες θα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια.

# Βιβλιογραφία

---

- [1] A.C. Atti-Santos, M. Rossato, G.F. Pauletti, L.D. Rota, J.C. Rech, M.R. Pansera, F. Agostini, L.A. Serafini, P. Moyna, Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (2005) 1035-1039.
- [2] N. Bousbia, M.A. Vian, M.A. Ferhat, E. Petitcolas, B.Y. Meklati, F. Chemat, Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chemistry*, 114 (2009) 355-362.
- [3] Á. Calín-Sánchez, A. Szumny, A. Figiel, K. Jałoszyński, M. Adamski, Á.A. Carbonell-Barrachina, Effects of vacuum level and microwave power on rosemary volatile composition during vacuum-microwave drying, *Journal of Food Engineering*, 103 (2011) 219-227.
- [4] A. Begum, S. Sandhya, K.R. Vinod, S. Reddy, D. Banji, An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12 (2013) 61-74.
- [5] G. Kasparavičienė, K. Ramanauskienė, A. Savickas, S. Velžienė, Z. Kalvėnienė, D. Kazlauskienė, O. Ragažinskienė, K. Ivanauskas, Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis* L. ethanolic extracts, *Biologija*, 59 (2013).
- [6] D.V. Lakušić, M.S. Ristić, V.N. Slavkowska, J.B. Šinžar-Sekulić, B.S. Lakušić, Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Penninsula, *Chemistry & biodiversity*, 9 (2012) 1286-1302.
- [7] R.R. Raja, Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview, *Research journal of medicinal plant*, 6 (2012) 203-213.
- [8] N. Okamura, Y. Fujimoto, S. Kuwabara, A. Yagi, High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *Journal of Chromatography A*, 679 (1994) 381-386.
- [9] O. Yesil-Celiktas, P. Nartop, A. Gurel, E. Bedir, F. Vardar-Sukan, Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli, *Journal of plant physiology*, 164 (2007) 1536-1542.
- [10] N. Mulinacci, M. Innocenti, M. Bellumori, C. Giaccherini, V. Martini, M. Michelozzi, Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study, *Talanta*, 85 (2011) 167-176.
- [11] P. Ionita, V. Dinoiu, C. Munteanu, I.M. Turcu, V. Tecuceanu, T. Zaharescu, E. Oprea, C. Ilie, D. Anghel, G. Ionita, Antioxidant activity of rosemary extracts in solution and embedded in polymeric systems, *Chemical Papers*, 69 (2015) 872-880.
- [12] M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass

spectrometry and in-vitro assays, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2512-2520.

[13] A.K. Genena, H. Hense, A. Smânia Junior, S.M.d. Souza, Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide, *Food Science and Technology (Campinas)*, 28 (2008) 463-469.

[14] A. López-Jiménez, M. García-Caballero, M.Á. Medina, A.R. Quesada, Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary, *European journal of nutrition*, 52 (2013) 85-95.

[15] M.J. del Baño, J. Lorente, J. Castillo, O. Benavente-García, J.A. del Río, A. Ortuño, K.-W. Quirin, D. Gerard, Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 4247-4253.

[16] S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.J. Cocero, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *Journal of Food Engineering*, 109 (2012) 98-103.

[17] N.V. Yanishlieva, E. Marinova, J. Pokorný, Natural antioxidants from herbs and spices, *European Journal of lipid science and Technology*, 108 (2006) 776-793.

[18] S. Munné-Bosch, L. Alegre, K. Schwarz, The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate, *European food research and technology*, 210 (2000) 263-267.

[19] J. Tai, S. Cheung, M. Wu, D. Hasman, Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro, *Phytomedicine*, 19 (2012) 436-443.

[20] G. Zu, R. Zhang, L. Yang, C. Ma, Y. Zu, W. Wang, C. Zhao, Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*, *International journal of molecular sciences*, 13 (2012) 11027-11043.

[21] J. Dai, R.J. Mumper, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 15 (2010) 7313-7352.

[22] M. Devgun, A. Nanda, S.H. Ansari, Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb, *Acta Pol, Pharma. Drug. Research*, 69 (2012) 475-485.

[23] J. Azmir, I. Zaidul, M. Rahman, K. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. Jahurul, K. Ghafoor, N. Norulaini, A. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *Journal of Food Engineering*, 117 (2013) 426-436.

[24] A. Khoddami, M.A. Wilkes, T.H. Roberts, Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, 18 (2013) 2328-2375.

[25] S. NIELSEN, HANDBOOK OF FOOD ANALYSIS, PHYSICAL CHARACTERIZATION AND NUTRIENT ANALYSIS, *Journal of Food Quality*, 28 (2005) 507-508.

[26] C. Tzia, G. Liadakis, *Extraction optimization in food engineering*, CRC Press, 2003.

[27] S. Abu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J. Lorimer, T. Mason, Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the



food and pharmaceutical industry, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11 (2004) 261-265.

[28] M. Puri, D. Sharma, C.J. Barrow, Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends in biotechnology*, 30 (2012) 37-44.

[29] G. de AR Oliveira, A.E. de Oliveira, E.C. da Conceição, M.I. Leles, Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary, *Food chemistry*, 211 (2016) 465-473.

[30] N.J. Simpson, *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*, CRC press, 2000.

[31] I. Tsihranska, B. Tylkowski, Solid-liquid extraction of bioactive compounds: effect of polydispersity and particle size evolution, *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*, 51 (2016).

[32] B. Terigar, S. Balasubramanian, D. Boldor, Z. Xu, M. Lima, C. Sabliov, Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation, *Bioresource technology*, 101 (2010) 2466-2471.

[33] S.C. Mandal, V. Mandal, A.K. Das, *Essentials of botanical extraction: principles and applications*, Academic Press, 2015.

[34] C. Castro-López, R. Rojas, E.J. Sánchez-Alejo, G. Niño-Medina, G.C. Martínez-Ávila, Phenolic Compounds Recovery from Grape Fruit and By-Products: An Overview of Extraction Methods, in: *Grape and Wine Biotechnology*, InTech, 2016.

[35] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 300-312.

[36] C.S. Eskilsson, E. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 227-250.

[37] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research, *Pharmacognosy reviews*, 1 (2007) 7-18.

[38] B. Kaufmann, P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical analysis*, 13 (2002) 105-113.

[39] M.E. Lucchesi, J. Smadja, S. Bradshaw, W. Louw, F. Chemat, Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, *Journal of Food Engineering*, 79 (2007) 1079-1086.

[40] E. Nkhili, V. Tomao, H. El Hajji, E.S. El Boustani, F. Chemat, O. Dangles, Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols, *Phytochemical Analysis*, 20 (2009) 408-415.

[41] W. Routray, V. Orsat, Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review, *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 409-424.

[42] M. Puri, *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications*, Springer, 2017.

[43] X. Cheng, L. Bi, Z. Zhao, Y. Chen, Advances in enzyme assisted extraction of natural products, *AER-Advances in Engineering Research*, 3rd ed.; Yarlagadda, P., Ed, (2015) 371-375.

[44] M. Pinelo, A.S. Meyer, Enzyme-assisted extraction of antioxidants: Release of phenols from vegetal matrixes, *Electron J Environ Agric Food Chem*, 7 (2008) 3217-3220.



- [45] N.T. Huynh, G. Smagghe, G.B. Gonzales, J. Van Camp, K. Raes, Enzyme-assisted extraction enhancing the phenolic release from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) outer leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (2014) 7468-7476.
- [46] L. Wang, Y. Wu, Y. Liu, Z. Wu, Complex Enzyme-Assisted Extraction Releases Antioxidative Phenolic Compositions from Guava Leaves, *Molecules*, 22 (2017) 1648.
- [47] M. Pinelo, B. Zornoza, A.S. Meyer, Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction, *Separation and Purification Technology*, 63 (2008) 620-627.
- [48] R. Gómez-García, G.C. Martínez-Ávila, C.N. Aguilar, Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues, *3 Biotech*, 2 (2012) 297-300.
- [49] M. Pinelo, A. Arnous, A.S. Meyer, Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 579-590.
- [50] M.M. Poojary, V. Orlien, P. Passamonti, K. Olsen, Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms, *Food chemistry*, 234 (2017) 236-244.
- [51] G. Zhang, M. Hu, L. He, P. Fu, L. Wang, J. Zhou, Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro, *Food and Bioproducts Processing*, 91 (2013) 158-168.
- [52] X.-G. Zhang, Y. Lu, W.-N. Wang, Z.-Y. Liu, J.-W. Liu, X.-Q. Chen, A novel enzyme-assisted approach for efficient extraction of Z-ligustilide from *Angelica sinensis* plants, *Scientific reports*, 7 (2017) 9783.
- [53] C. Soto-Maldonado, M.E. Zúñiga-Hansen, Enzyme-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, in: *Water Extraction of Bioactive Compounds*, Elsevier, 2018, pp. 369-384.
- [54] J. Koolman, K.-H. Röhm, J. Wirth, M. Robertson, *Color atlas of biochemistry*, Thieme Stuttgart, 2005.
- [55] A.J. Sami, A. Shakoori, Extracts of plant leaves have inhibitory effect on the cellulase activity of whole body extracts of insects-A possible recipe for bio-insecticides, *Proc. Pakistan Congr. Zool*, 27 (2007) 105-118.
- [56] M. Panouillé, J.-F. Thibault, E. Bonnin, Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2006) 8926-8935.
- [57] G. Brahmachari, *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Academic Press, 2016.
- [58] G. Reed, *Enzymes in food processing*, Elsevier, 2012.
- [59] X. Zhou, L. Broadbelt, R. Vinu, Mechanistic understanding of thermochemical conversion of polymers and lignocellulosic biomass, in: *Advances in Chemical Engineering*, Elsevier, 2016, pp. 95-198.
- [60] C.S. Domingo, M. Soria, A.M. Rojas, E.N. Fissore, L.N. Gerschenson, Protease and hemicellulase assisted extraction of dietary fiber from wastes of *Cynara cardunculus*, *International journal of molecular sciences*, 16 (2015) 6057-6075.
- [61] R. Kumar, S. Singh, O.V. Singh, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35 (2008) 377-391.

- [62] J.H. Hamman, Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems, *Marine drugs*, 8 (2010) 1305-1322.
- [63] J.M. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems, *Journal of cellular and molecular medicine*, 14 (2010) 840-860.
- [64] M.I.R. Khan, N.A. Khan, *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation Under Abiotic Stress*, Springer, 2017.
- [65] A.M. Pisoschi, A. Pop, C. Cimpeanu, G. Predoi, Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (2016).
- [66] M. Carochi, I.C. Ferreira, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and chemical toxicology*, 51 (2013) 15-25.
- [67] P. Held, *An introduction to reactive oxygen species: measurement of ROS in cells*. BioTek Instruments, Inc, 2010.
- [68] D.M. Kasote, S.S. Katyare, M.V. Hegde, H. Bae, Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications, *International journal of biological sciences*, 11 (2015) 982.
- [69] O.I. Aruoma, S.L. Cuppett, *Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts*, The American Oil Chemists Society, 1997.
- [70] H. Moharram, M. Youssef, *Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review*, *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11 (2014) 31-42.
- [71] D.L. Madhavi, S. Deshpande, D.K. Salunkhe, *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*, CRC Press, 1995.
- [72] T.M. Rababah, F. Banat, A. Rababah, K. Ereifej, W. Yang, Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate, *Journal of Food Science*, 75 (2010).
- [73] B.J. Hudson, *Food antioxidants*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [74] N. Erkan, G. Ayranci, E. Ayranci, Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, *Food Chemistry*, 110 (2008) 76-82.
- [75] J. Muñoz-Muñoz, F. Garcia-Molina, E. Ros, J. Tudela, F. García-Canovas, J. Rodriguez-Lopez, Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid, *Journal of Food Biochemistry*, 37 (2013) 396-408.
- [76] Z. Akar, M. Küçük, H. Doğan, A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32 (2017) 640-647.
- [77] S.C. Litescu, S. Eremia, G.L. Radu, *Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials*, in: *Bio-Farms for Nutraceuticals*, Springer, 2010, pp. 241-249.
- [78] A. Fadda, M. Serra, M.G. Molinu, E. Azara, A. Barberis, D. Sanna, Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical, *Journal of Food composition and analysis*, 35 (2014) 112-119.

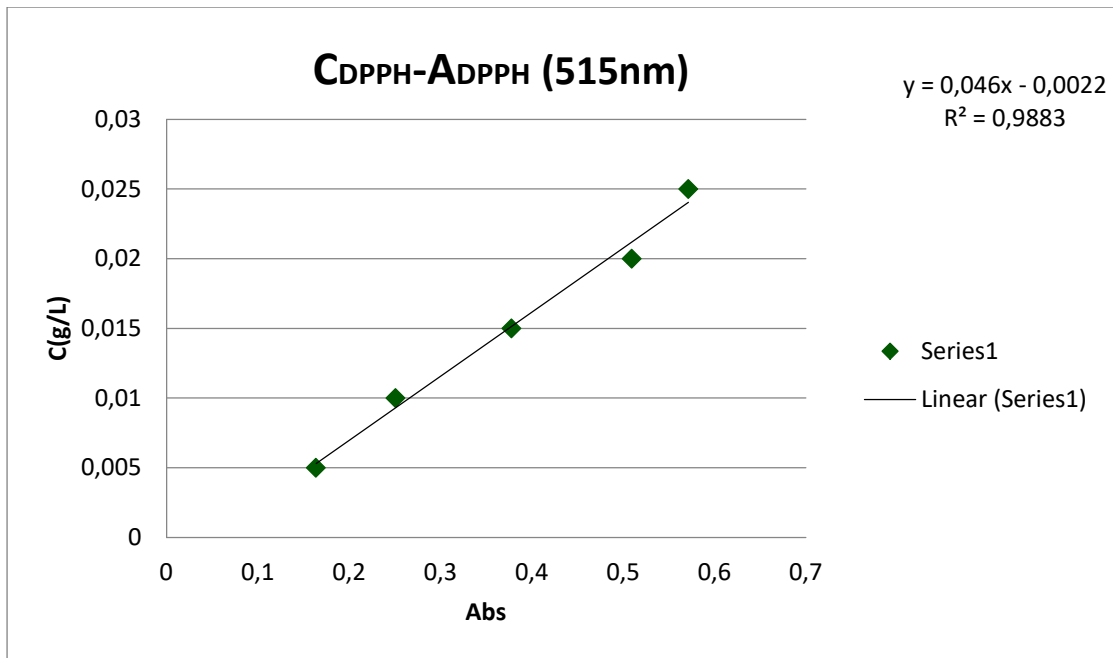
- [79] W. Brand-Williams, M.-E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology*, 28 (1995) 25-30.
- [80] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (2005) 4290-4302.
- [81] J. Teixeira, A. Gaspar, E.M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview, *BioMed research international*, 2013 (2013).
- [82] S.B. Kedare, R. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of food science and technology*, 48 (2011) 412-422.
- [83] R.J. Robbins, Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (2003) 2866-2887.
- [84] A. Elliott, J. Elliott, Voltage-dependent inhibition of RCK1 K<sup>+</sup> channels by phenol, p-cresol, and benzyl alcohol, *Molecular pharmacology*, 51 (1997) 475-483.
- [85] J.W. Erdman Jr, D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J.T. Dwyer, J. Folts, J. Harnly, P. Hollman, C.L. Keen, G. Mazza, Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC, *The Journal of nutrition*, 137 (2007) 718S-737S.
- [86] M.A. Graça, F. Bärlocher, M.O. Gessner, *Methods to study litter decomposition: a practical guide*, Springer Science & Business Media, 2005.
- [87] E.A. Ainsworth, K.M. Gillespie, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent, *Nature protocols*, 2 (2007) 875.
- [88] N. Smirnoff, *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, John Wiley & Sons, 2008.
- [89] H.F. Linskens, J.F. Jackson, *Analysis of plant waste materials*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [90] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food chemistry*, 99 (2006) 191-203.
- [91] I. Gouvinhas, N. Machado, C. Sobreira, R. Domínguez-Perles, S. Gomes, E. Rosa, A.I. Barros, Critical review on the significance of olive phytochemicals in plant physiology and human health, *Molecules*, 22 (2017) 1986.
- [92] A. Alfieri, G.E. Mann, *Bioactive Nutraceuticals and Stroke: Activation of Endogenous Antioxidant Pathways and Molecular Mechanisms Underlying Neurovascular Protection*, in: *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, Elsevier, 2015, pp. 365-379.
- [93] A.G. Adomako-Bonsu, S.L. Chan, M. Pratten, J.R. Fry, Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics, *Toxicology In Vitro*, 40 (2017) 248-255.
- [94] M. Alagawany, M.E.A. El-Hack, M.R. Farag, M. Gopi, K. Karthik, Y.S. Malik, K. Dhama, Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits, *Animal health research reviews*, 18 (2017) 167-176.
- [95] M. Petersen, Y. Abdullah, J. Benner, D. Eberle, K. Gehlen, S. Hücherig, V. Janiak, K.H. Kim, M. Sander, C. Weitzel, Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, *Phytochemistry*, 70 (2009) 1663-1679.

- [96] M. Brewer, Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10 (2011) 221-247.
- [97] T. Masuda, Y. Inaba, Y. Takeda, Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 5560-5565.
- [98] S. Birtić, P. Dussort, F.-X. Pierre, A.C. Bily, M. Roller, Carnosic acid, *Phytochemistry*, 115 (2015) 9-19.
- [99] Μ. Στριλιγκά, Ε. Γώγου, Δ. Τσιμογιάννης, Β. Ωραιοπούλου, Η εφαρμογή φυσικού αντιοξειδωτικού από δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) για την παράταση του χρόνου ζωής chips πατάτας, *Πολυτεχνειακά Νέα*, 1 (2015).
- [100] O. Weinreb, S. Mandel, T. Amit, M.B. Youdim, Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *The Journal of nutritional biochemistry*, 15 (2004) 506-516.
- [101] A. Panche, A. Diwan, S. Chandra, Flavonoids: an overview, *Journal of nutritional science*, 5 (2016).
- [102] A. Pękal, K. Pyrzynska, Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, *Food Analytical Methods*, 7 (2014) 1776-1782.
- [103] L.A.L. da Silva, B.R. Pezzini, L. Soares, Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) leaves, *Pharmacognosy magazine*, 11 (2015) 96.
- [104] P. Schofield, D. Mbugua, A. Pell, Analysis of condensed tannins: a review, *Animal Feed Science and Technology*, 91 (2001) 21-40.
- [105] Σ. Καράταγλης, *Φυσιολογία Φυτών*. Εκδόσεις Art of Text, in, ISBN 960-312-009-X, 1999.
- [106] F. Shahidi, Antioxidants: Principles and applications, in: *Handbook of antioxidants for food preservation*, Elsevier, 2015, pp. 1-14.
- [107] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in enzymology*, Elsevier, 1999, pp. 152-178.
- [108] O. Folin, V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of biological chemistry*, 73 (1927) 627-650.
- [109] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Cengage learning, 2017.
- [110] J. McMurry, D.S. Ballantine, C.A. Hoeger, V.E. Peterson, M. Castellion, *Fundamentals of general, organic, and biological chemistry*, Pearson Education, 2010.
- [111] J.M. Halket, D. Waterman, A.M. Przyborowska, R.K. Patel, P.D. Fraser, P.M. Bramley, Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS, *Journal of experimental botany*, 56 (2004) 219-243.
- [112] V.A. Isidorov, L. Szczepaniak, S. Bakier, Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis, *Food chemistry*, 142 (2014) 101-106.
- [113] E. Hernández-Hernández, E. Ponce-Alquicira, M.E. Jaramillo-Flores, I.G. Legarreta, Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters, *Meat Science*, 81 (2009) 410-417.

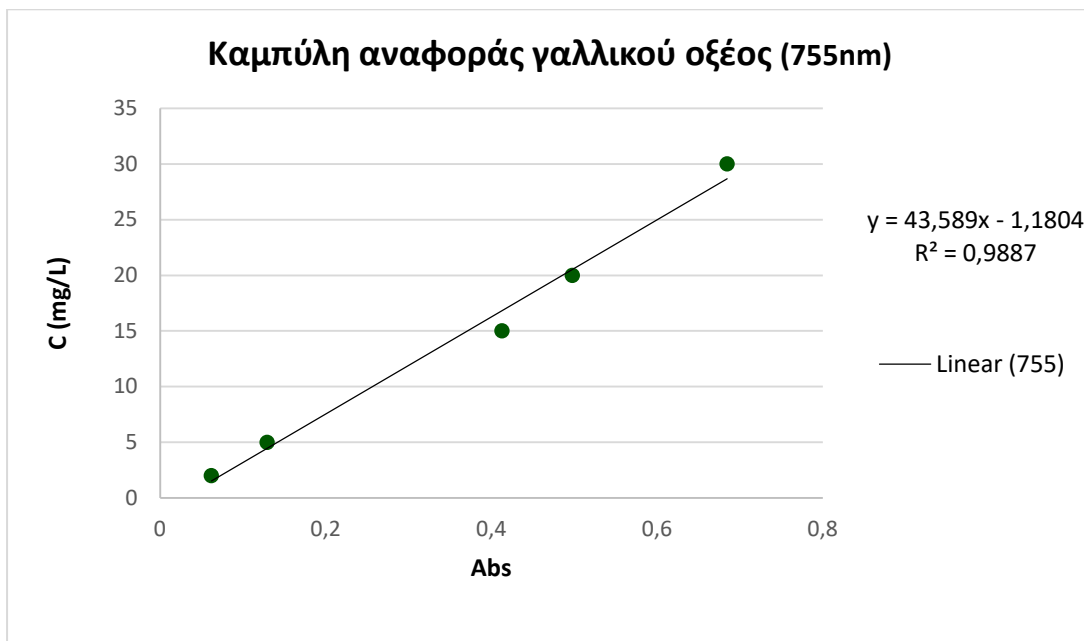
- [114] J. Luis, C. Johnson, Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity, Spanish Journal of Agricultural Research, 3 (2005) 106-112.
- [115] C. Proestos, M. Komaitis, Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds, LWT-food science and technology, 41 (2008) 652-659.
- [116] K. Waszkowiak, A. Gliszczyńska-Świgło, Binary ethanol-water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts, European Food Research and Technology, 242 (2016) 777-786.
- [117] G. Piluzza, S. Bullitta, Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area, Pharmaceutical biology, 49 (2011) 240-247.
- [118] P. Yuliana, E. Laconi, E. Wina, A. Jayanegara, Extraction of tannins and saponins from plant sources and their effects on in vitro methanogenesis and rumen fermentation, Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 39 (2014) 91-97.
- [119] A. Tejirian, F. Xu, Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds, Enzyme and Microbial Technology, 48 (2011) 239-247.
- [120] E. Ximenes, Y. Kim, N. Mosier, B. Dien, M. Ladisch, Inhibition of cellulases by phenols, Enzyme and Microbial Technology, 46 (2010) 170-176.
- [121] V. Sridevi, M. Lakshmi, M. Manasa, M. Sravani, Metabolic pathways for the biodegradation of phenol, Int J Eng Sci Adv Technol, 2 (2012) 695-705.
- [122] H. Van Le, Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit, International journal of food science & technology, 47 (2012) 1206-1214.
- [123] M.I. Razboršek, M. Ivanović, Stability studies and determination of carnosic acid and its oxidative degradation products by gas chromatography-mass spectrometry, International Journal of Mass Spectrometry, 407 (2016) 29-39.
- [124] M.I. Razboršek, Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 55 (2011) 1010-1016.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

---

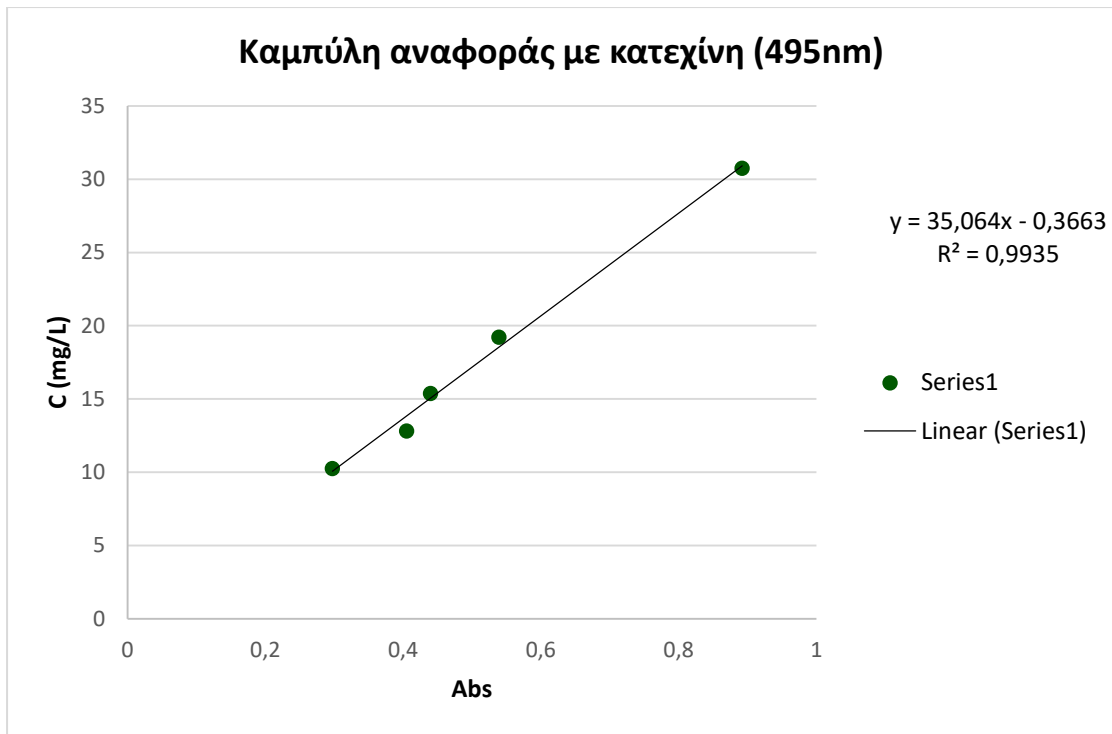


Διάγραμμα 11: Η καμπύλη αναφοράς DPPH

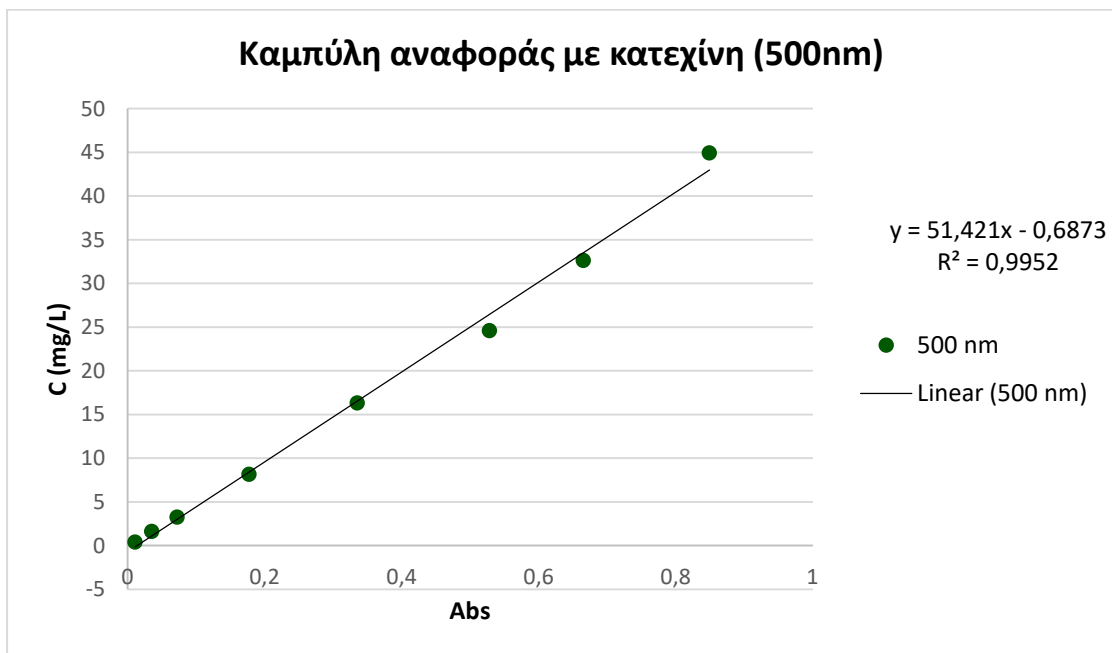


Διάγραμμα 12: Η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος

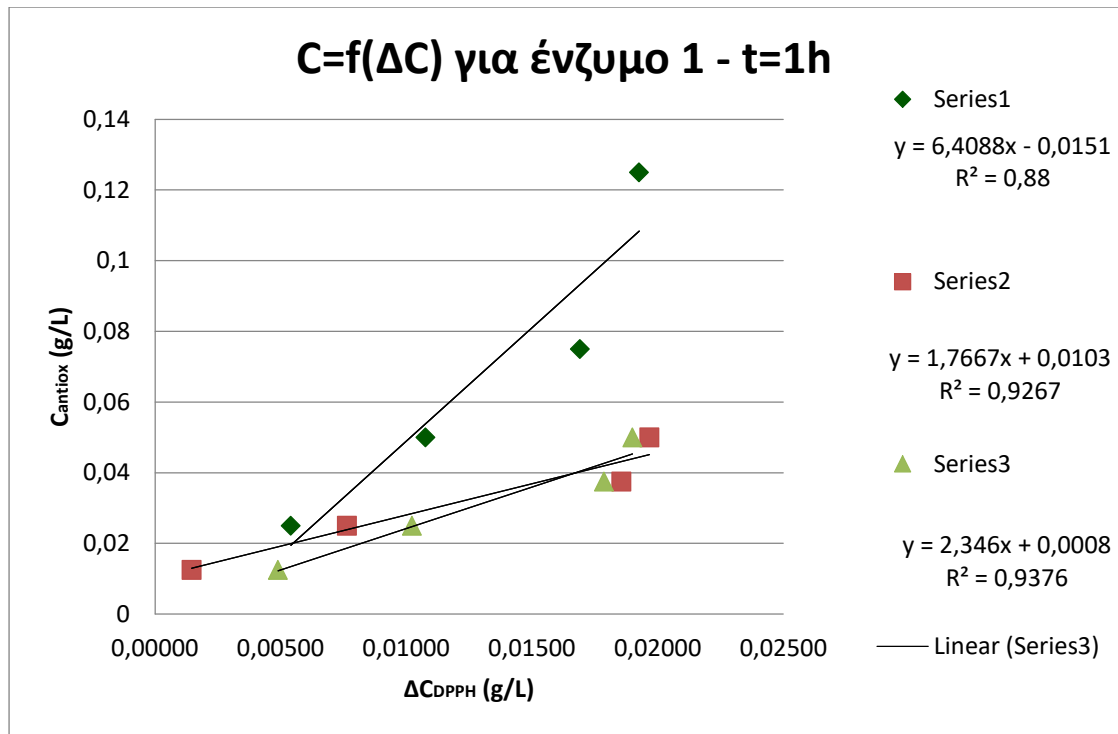




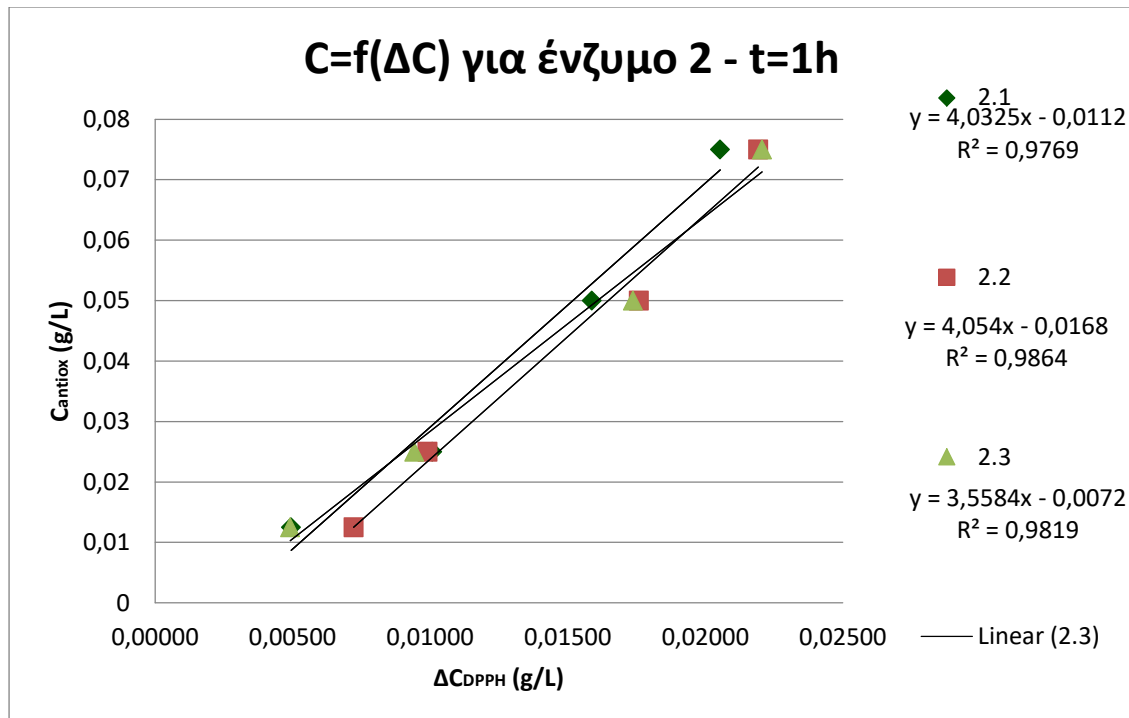
Διάγραμμα 13: Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης για τη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών



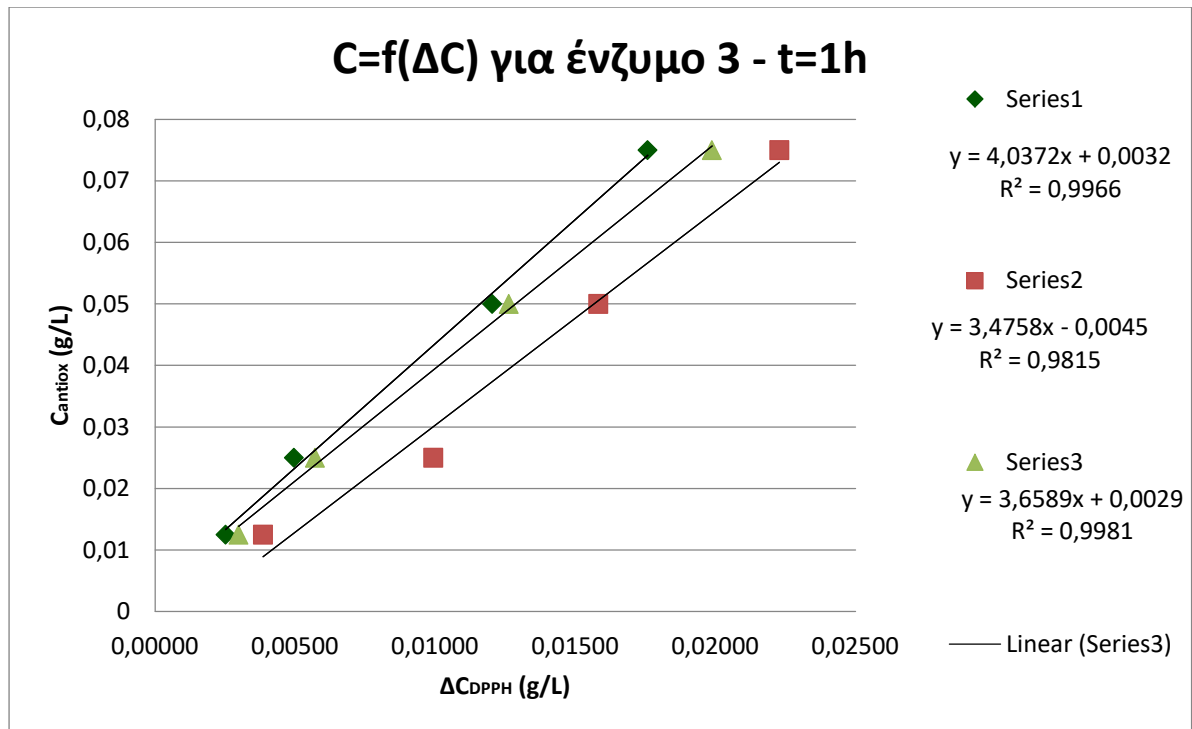
Διάγραμμα 14: Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης για τη μέτρηση των ολικών συμπυκνωμένων τανινών



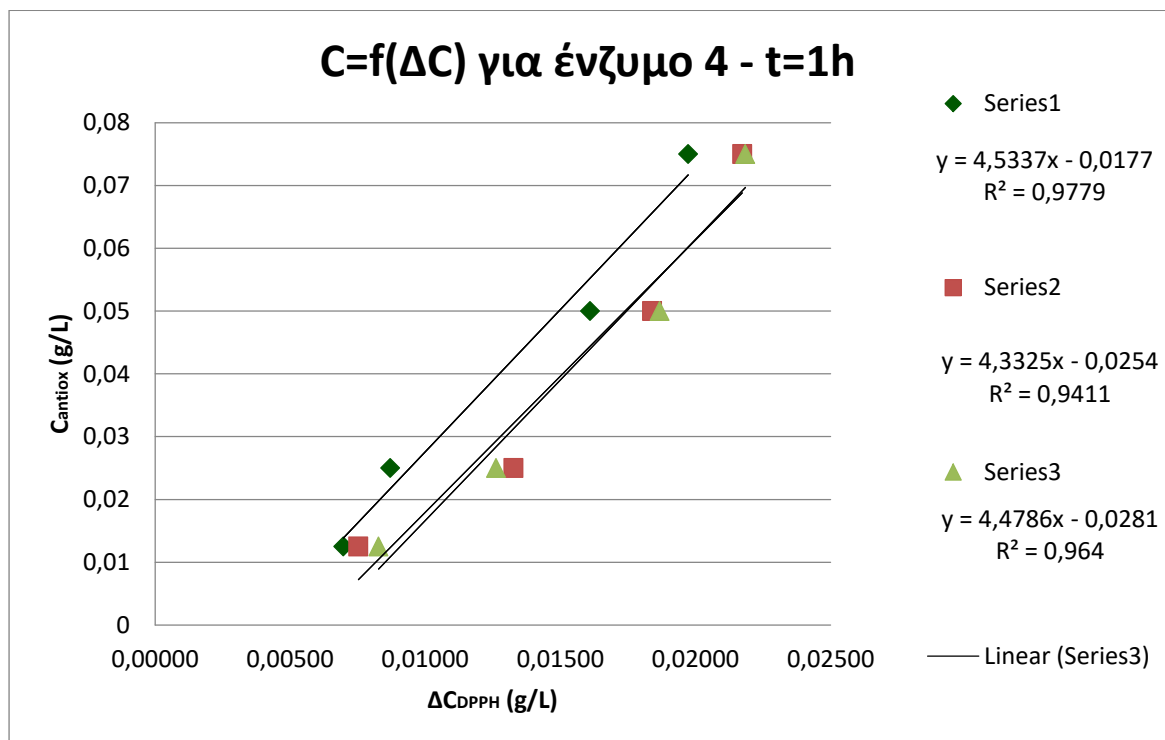
Διάγραμμα 15: Το διάγραμμα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση, ε το ένζυμο 1 για t=1h



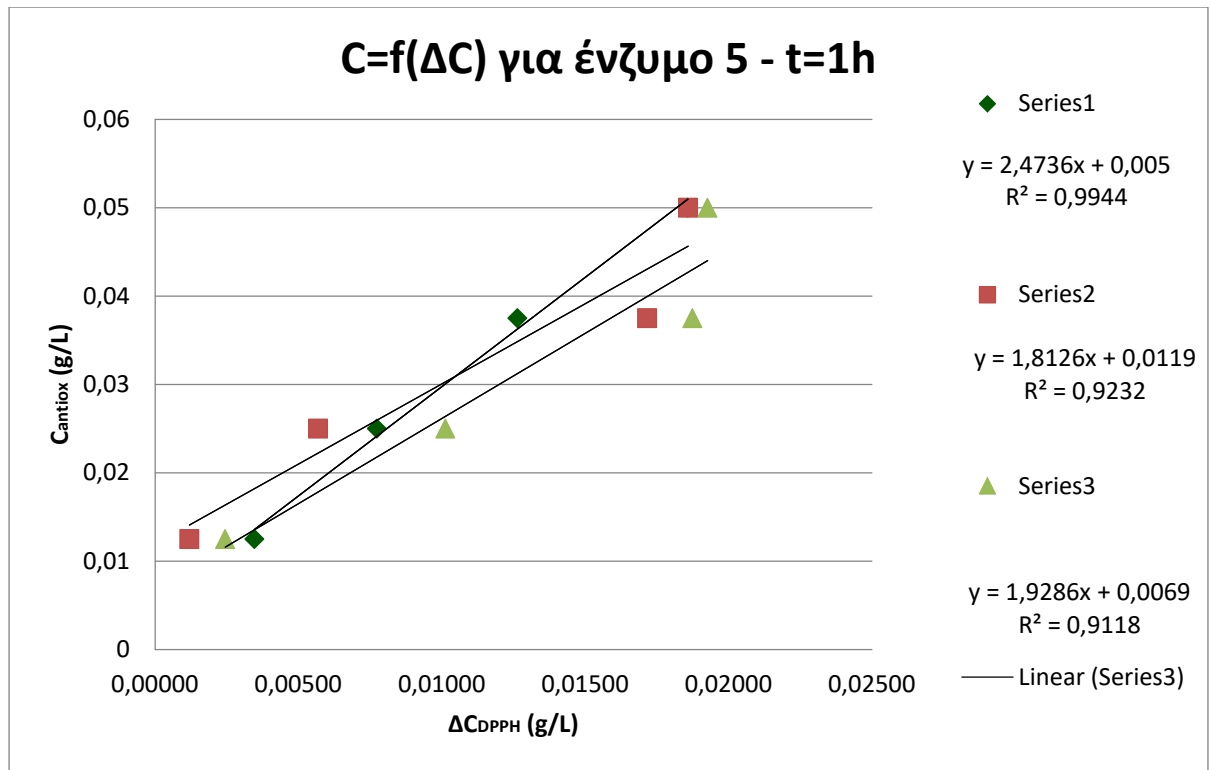
Διάγραμμα 16: Το διάγραμμα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 2 για t=1h



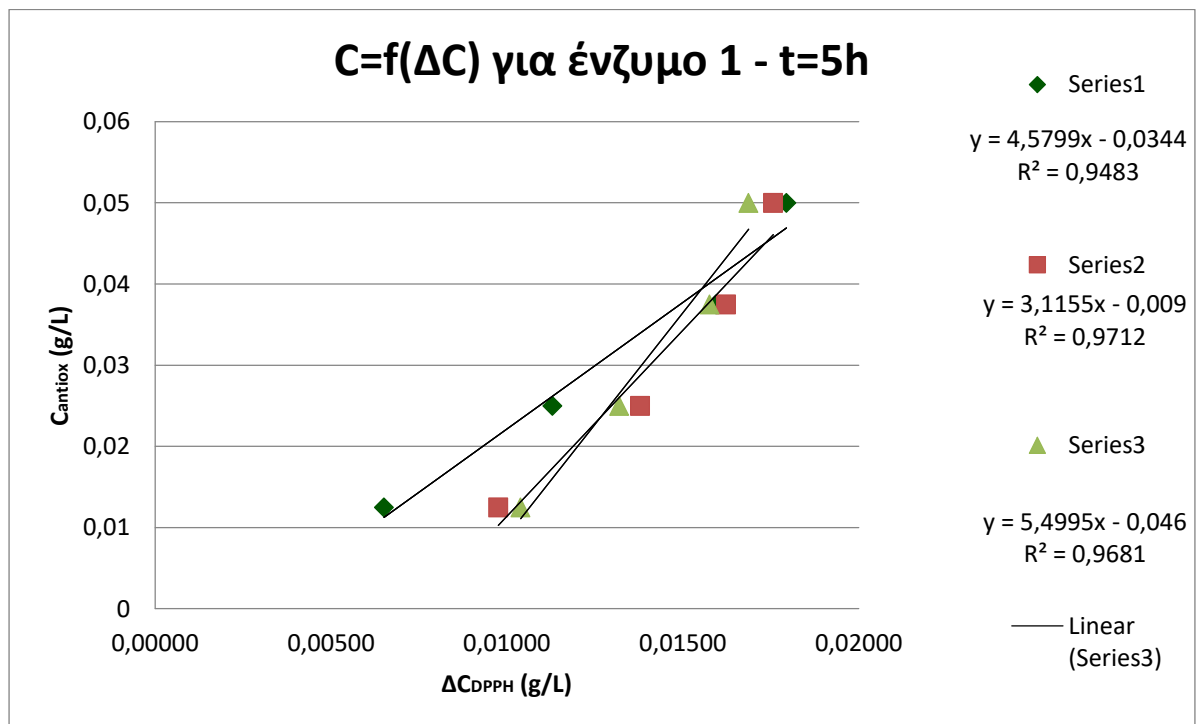
Διάγραμμα 17: Το διάγραμμα  $C_{antiox}$  - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 3 για  $t=1h$



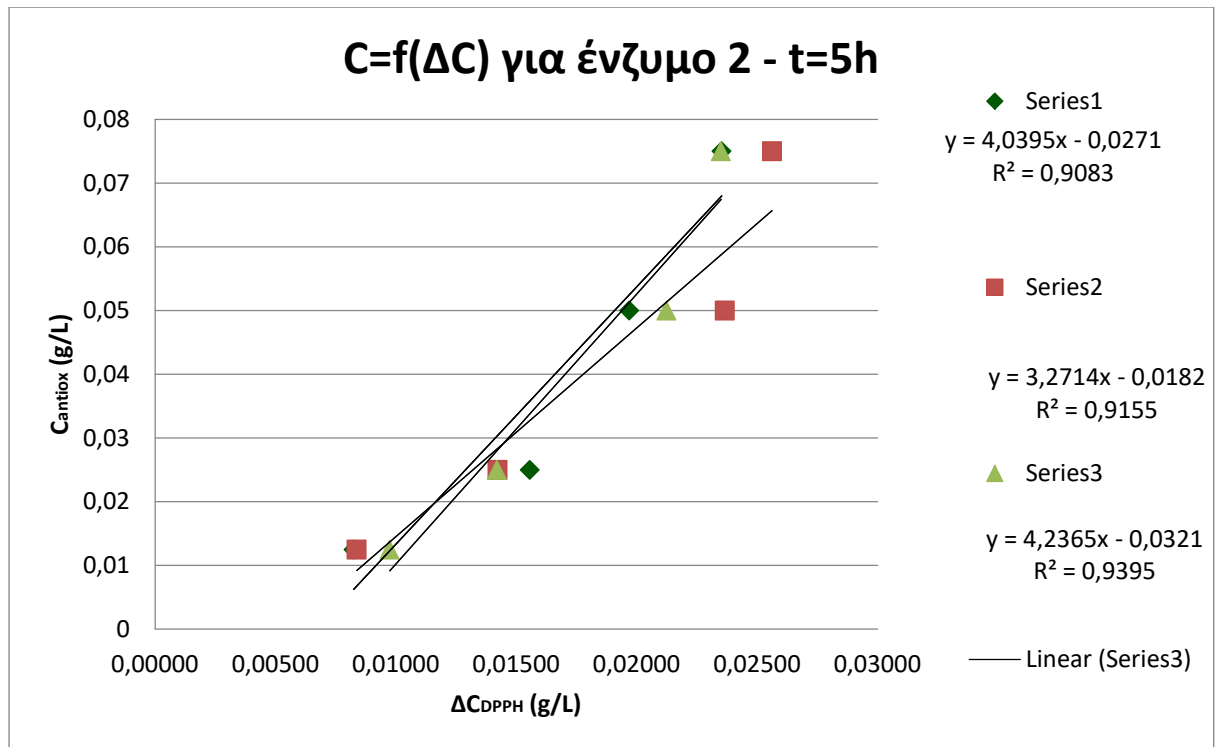
Διάγραμμα 18: Το διάγραμμα  $C_{antiox}$  - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 4 για  $t=1h$



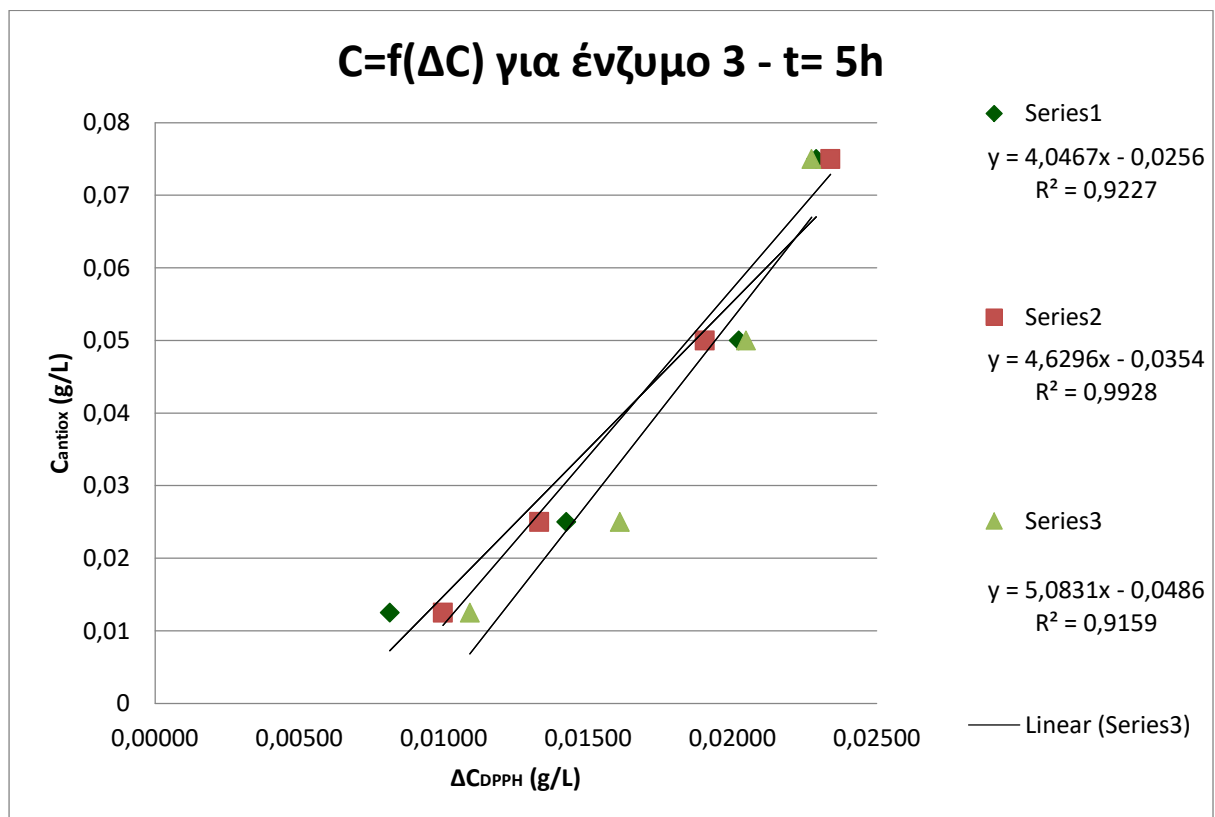
Διάγραμμα 19: Το διάγραμμα  $C_{antiox}$  - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 5 για t=1h



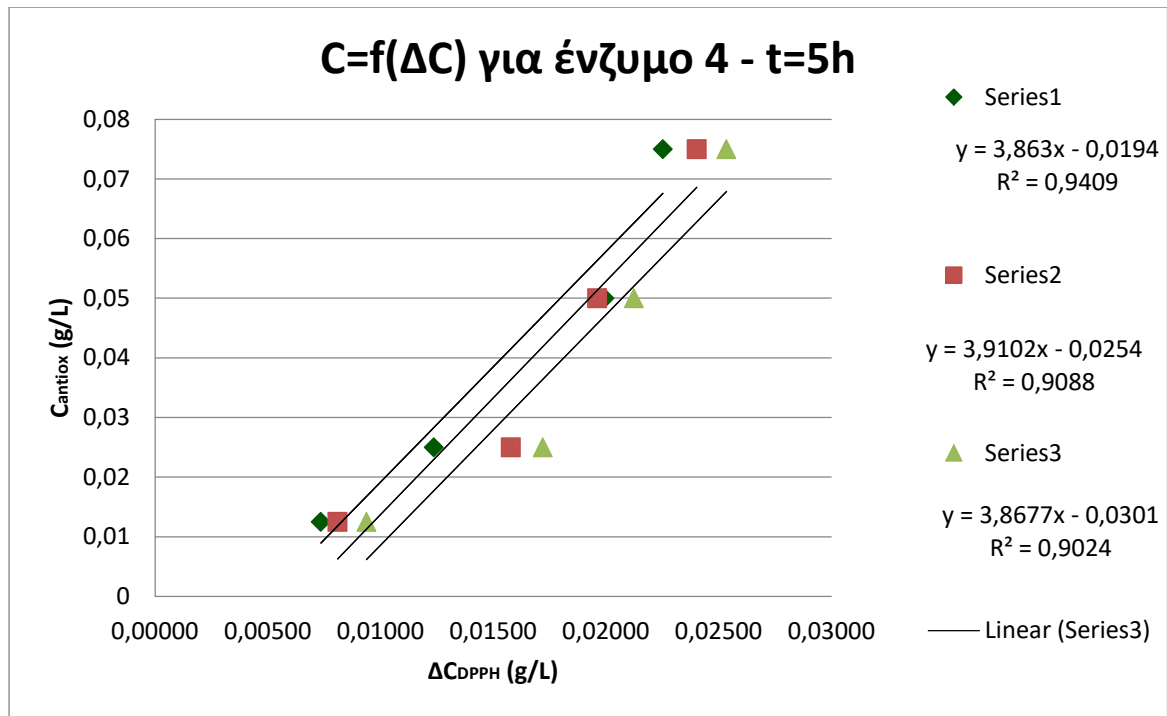
Διάγραμμα 20: Το διάγραμμα  $C_{antiox}$  - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 1 για t=5h



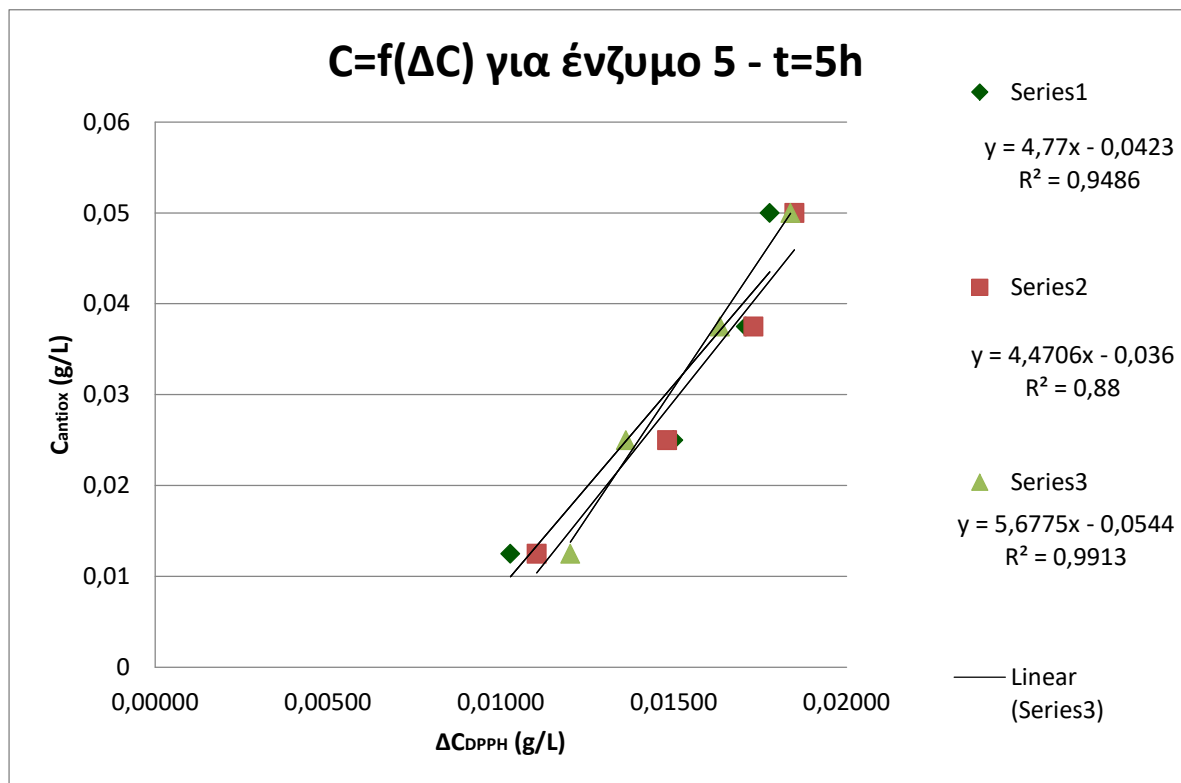
Διάγραμμα 21: Το διάγραμμα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 2 για  $t=5h$



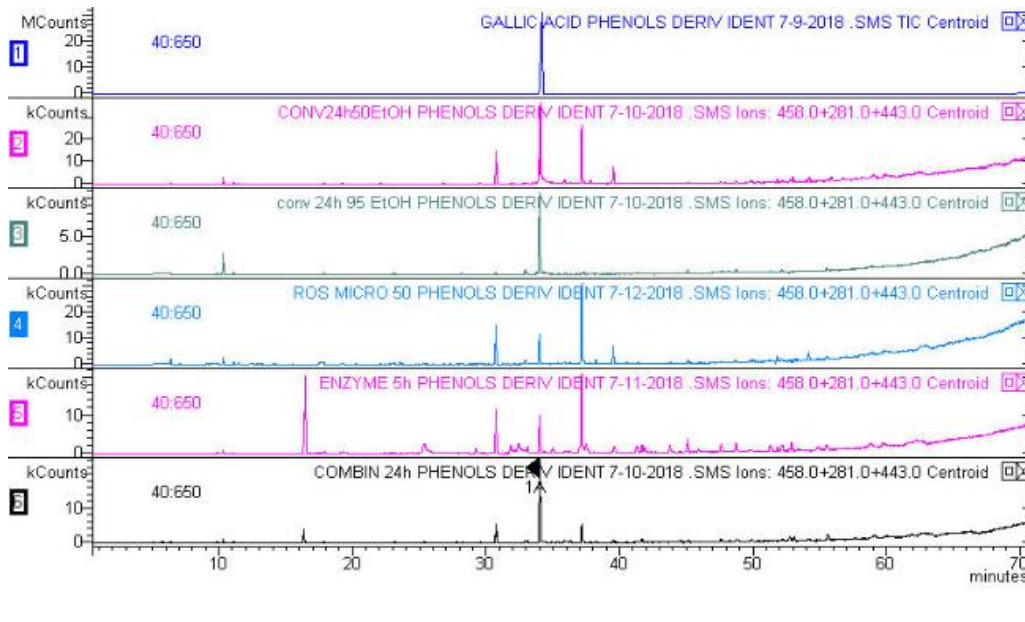
Διάγραμμα 22: Το διάγραμμα  $C_{antiox} - \Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 3 για  $t=5h$



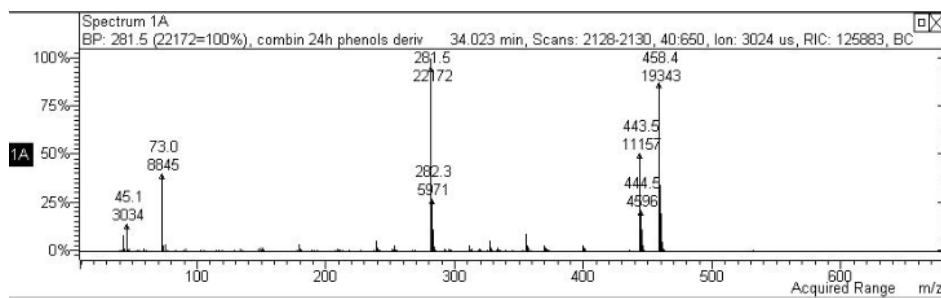
Διάγραμμα 23: Το διάγραμμα  $C_{antiiox}$ - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 4 για t=5h



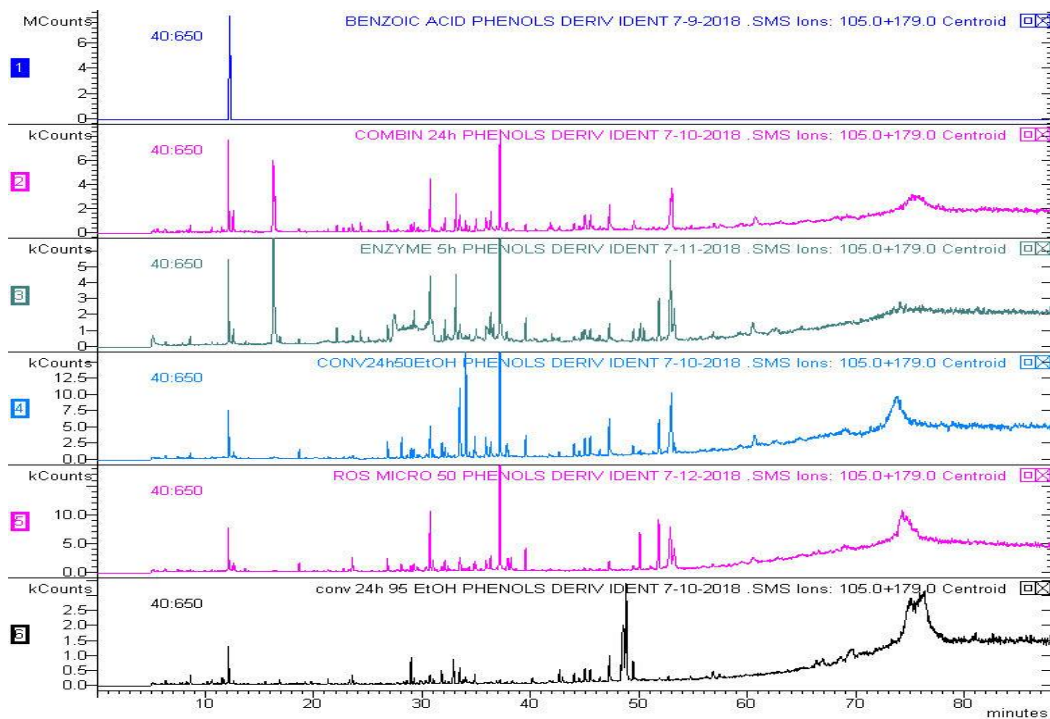
Διάγραμμα 24: Το διάγραμμα  $C_{antiiox}$ - $\Delta C_{DPPH}$  για το δείγμα που προέκυψε από ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση με το ένζυμο 5 για t=5h



Εικόνα 40: Η ταυτοποίηση του γαλλικού οξέος στα εκχυλίσματα

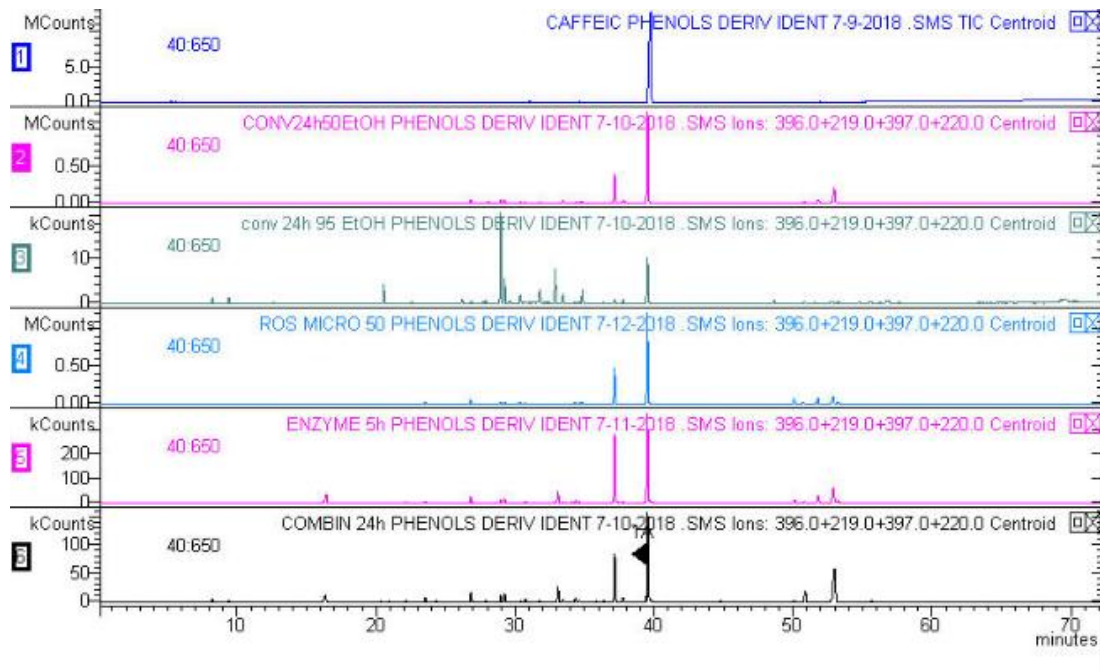


Εικόνα 41: Το φάσμα μάζας του γαλλικού οξέος

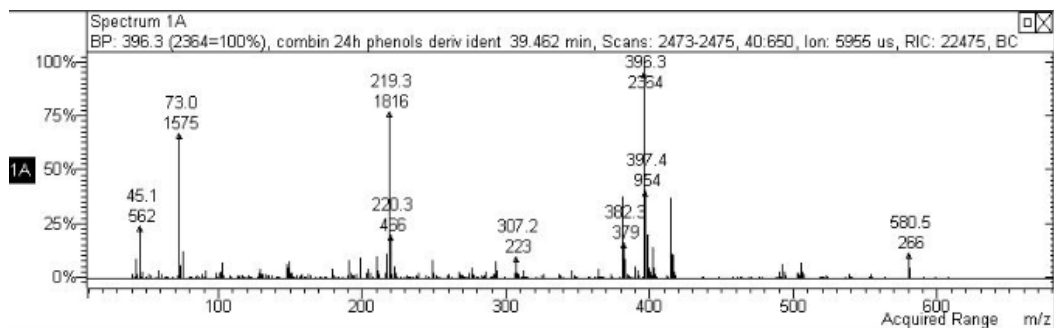


Εικόνα 42: Η ταυτοποίηση του βενζοϊκού οξέος στα δείγματα

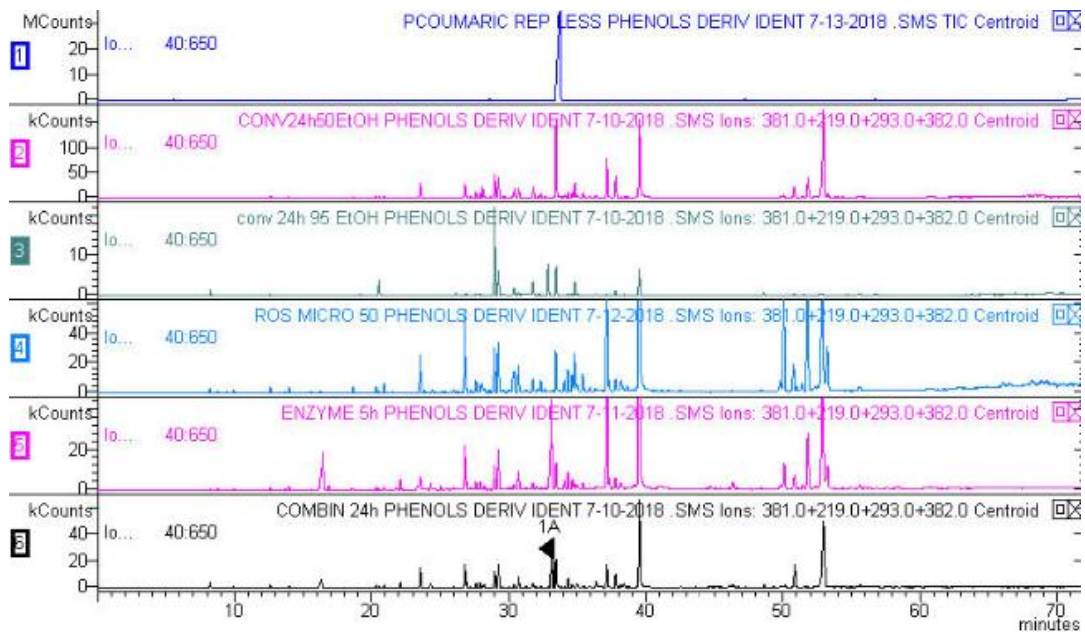




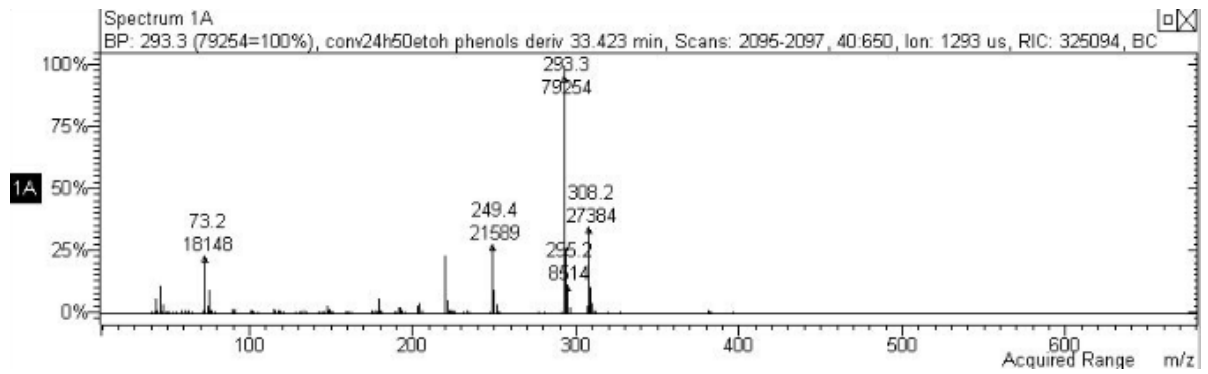
Εικόνα 43: Η ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος στα δείγματα



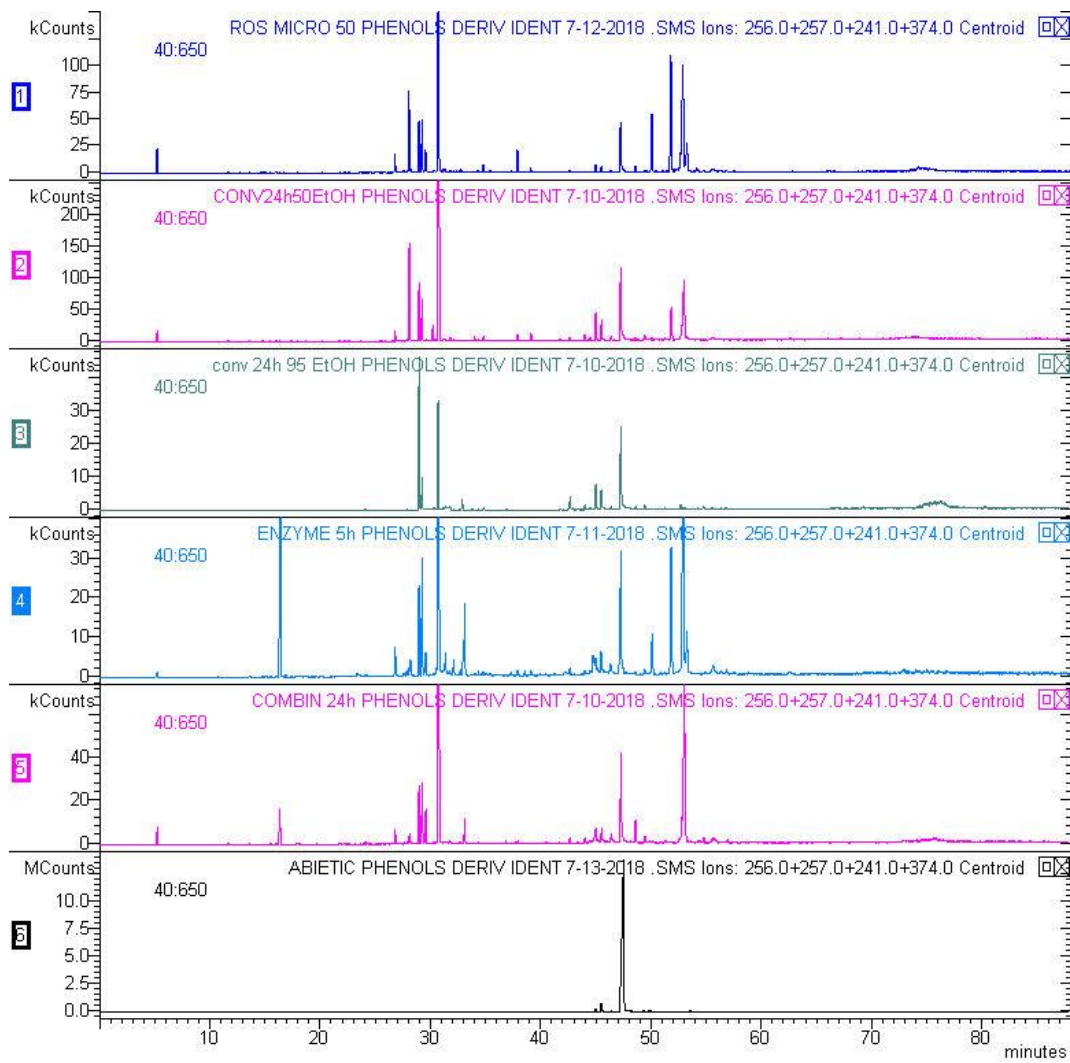
Εικόνα 44: Το φάσμα μάζας του καφεϊκού οξέος



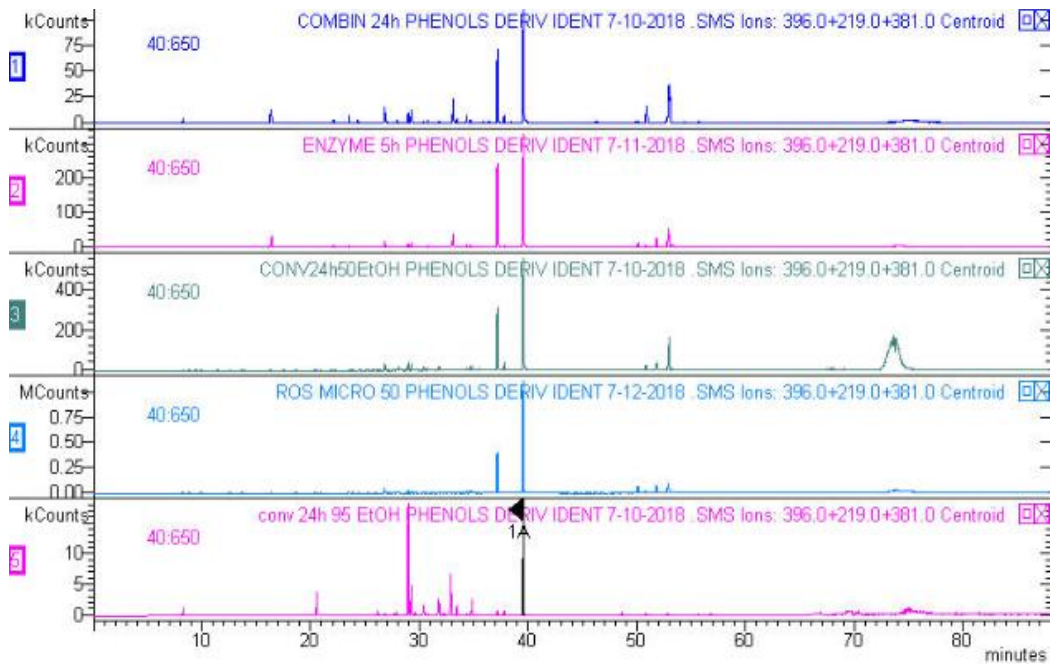
Εικόνα 45: Η ταυτοποίηση του p-κουμαρικού οξέος στα δείγματα



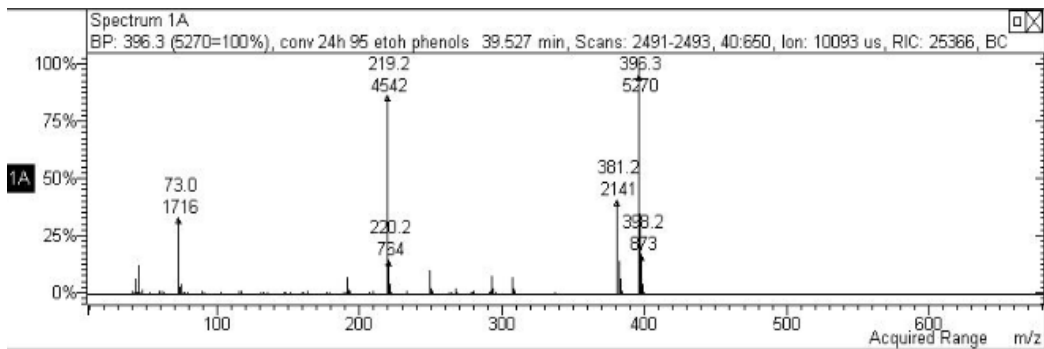
Εικόνα 46: Το φάσμα μάζας του p-κουμαρικού οξέος



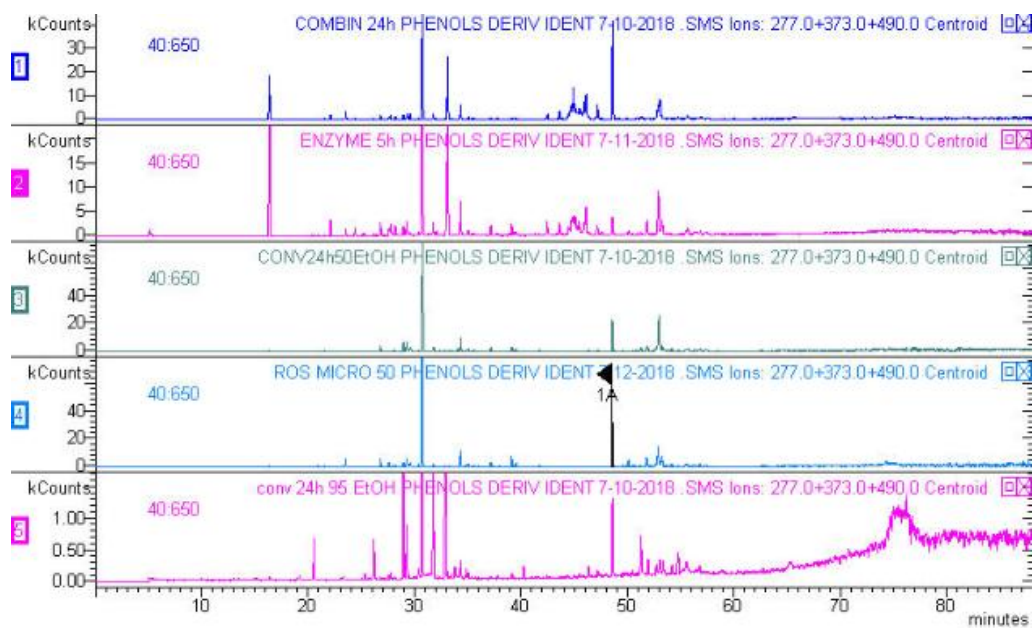
Εικόνα 47: Η ταυτοποίηση του αβιετικού οξέος



Εικόνα 48: Η ανίχνευση του ροσμαρινικού οξέος



Εικόνα 49: Το φάσμα μάζας του ροσμαρινικού οξέος



Εικόνα 50: Η ανίχνευση του 12-Ο-μεθυλο-καρνοσικού οξέος