

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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης
βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο**



Ψαρρού Ειρήνη
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Βασιλική Ωραιοπούλου
Αθήνα, 2019

Πρόλογος

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

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Βασιλική Ωραιοπούλου για την άψογη συνεργασία, την καθοδήγηση και τις συμβουλές της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ήταν πάντα διαθέσιμη για την επίλυση των αποριών μου και με τις γνώσεις της συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό στην απόκτηση και εμπάνθυνση των γνώσεων μου πάνω στην εκχύλιση.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Τσιμογιάννη, ο οποίος με την τεράστια εργαστηριακή εμπειρία του έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην εκμάθηση των μεθόδων και των τεχνικών που ήταν απαραίτητες για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και στην επίλυση προβλημάτων που προέκυπταν.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω θερμά τον διδάκτορα Γιώργο Δημόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του στον χειρισμό αλλά και στην εκμάθηση μιας μεθόδου εκχύλισης, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την προθυμία τους να προσφέρουν ανά πάσα στιγμή την οποιαδήποτε βοήθεια.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στις φίλες μου για την υποστήριξη και την βοήθεια τους σε αυτήν μου την προσπάθεια.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι παράμετροι επίδρασης στην εκχύλιση του δεντρολίβανου, ενός φυτού πλούσιου σε βιοδραστικά συστατικά, ροσμαρινικό οξύ, φλαβονοειδή και φαινολικά διτερπένια, συστατικά που είναι ευρέως γνωστά για την ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση και προσδιορίστηκαν οι συνθήκες βελτιστοποίησης της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκχύλισης αλεσμένου δεντρολίβανου, υπό ανάδευση, σε αναλογία υγρού:στερεού 20:1. Σε κάθε εκχύλιση λαμβάνονται δείγματα 1,5 mL τις χρονικές στιγμές 2, 5, 10, 20, 30, 50 και 70 min και ένα δείγμα από το ολικό εκχύλισμα. Σε όλα τα δείγματα προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και γινόταν ανάλυση των επί μέρους συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), ενώ στο δείγμα του ολικού εκχυλίσματος προσδιορίζεται και η αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH. Σε όλα τα πειράματα, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη με την χρήση τριών μοντέλων, του μοντέλου μεταφοράς μάζας, του λογαριθμικού μοντέλου και του μοντέλου του Peleg. Το μοντέλο της μεταφοράς μάζας και το λογαριθμικό μοντέλο έδωσαν τους πιο ικανοποιητικούς συντελεστές προσαρμογής στα πειραματικά μας δεδομένα στο σύνολο των πειραμάτων, ενώ το μοντέλο του Peleg προέβλεψε ικανοποιητικά τον αρχικό ρυθμό της εκχύλισης και τη συγκέντρωση ισορροπίας σε κάθε εκχύλιση.

Αρχικά, για την μελέτη της επίδρασης του διαλύτη πραγματοποιήθηκε μια σειρά εκχυλίσεων υπό ανάδευση αλεσμένου δεντρολίβανου μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας με μίγματα αιθανόλης-νερού (80% αιθανόλη-20% νερό και 60% αιθανόλη-40% νερό), καθαρής αιθανόλης, μίγματα ακετόνης-νερού (80% ακετόνη-20% νερό, 60% ακετόνη-40% νερό και 40% ακετόνη-60% νερό), καθαρή ακετόνη και νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μίγμα 60% ακετόνη-40% νερό είναι ο πιο αποδοτικός διαλύτης της απλής εκχύλισης υπό ανάδευσης του δεντρολίβανου, καθώς παρουσιάζει τη μέγιστη απόδοση σε φαινολικά συστατικά (68,2 mg GAE/g_{DW}) και τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης (27,1%), ενώ ο διαλύτης της καθαρής ακετόνης αποδείχθηκε ο λιγότερο αποδοτικός (16,0 mg GAE/g_{DW} και 12,1% αντίστοιχα). Στη συνέχεια, με ανάλυση HPLC για την ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών του δεντρολίβανου, παρατηρήθηκε ότι το νερό εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση σε ροσμαρινικό οξύ (14,2 mg RA/g_{DW}), ο διαλύτης 60% ακετόνη-40% νερό τη μεγαλύτερη απόδοση σε φλαβονοειδή (16,8 mg QE/g_{DW}) και τέλος ο διαλύτης 80% ακετόνη-20% νερό τη μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά διτερπένια (39,3 mg TPD/g_{DW}). Από τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH, προέκυψε ότι ο διαλύτης 60% ακετόνη-40% νερό επιτυγχάνει τη μέγιστη τιμή (1394 mg GAE/L) και ο διαλύτης της καθαρής ακετόνης τη μικρότερη (568 mg GAE/L).

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της κοκκομετρίας του αλεσμένου δεντρολίβανου, όπου με τη βοήθεια ειδικών κοσκίνων χωρίστηκε σε 5 επιμέρους κλάσματα (>1000 μm, 1000-800 μm, 800-600 μm, 600-315 μm και <315 μm) και ακολούθησαν εκχυλίσεις τους υπό ανάδευση και διαλύτη 80% ακετόνη-20%

νερό, ανάλυση HPLC με την μέθοδο Carnosic και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την μείωση της κοκκομετρίας του υλικού, αυξάνονται οι αποδόσεις της εκχύλισης, η εκλεκτικότητα της και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, η μικρότερη κοκκομετρία <315 μm παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά (62,5 mg GAE/g_{DW}), τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης (28,3%), τη μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά διτερπένια (47,2 mg TPD/g_{DW}), καθώς και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1678 mg GAE/L).

Για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απλή εκχύλιση υπό ανάδευση αλεσμένου δεντρολίβανου μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με διαλύτη 40% ακετόνη-60% νερό σε θερμοκρασίες 22°C, 40°C και 60°C και περαιτέρω αναλύσεις HPLC και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με DPPH για κάθε θερμοκρασία αντίστοιχα. Η αύξηση της θερμοκρασίας σε 60°C οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης σε φαινολικά συστατικά (70,3 mg GAE/g_{DW}) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (1582 mg GAE/L), αλλά σε μείωση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης (20,7%). Επίσης, έδειξε αύξηση της απόδοσης σε ροσμαρινικό οξύ (13,0 mg RA/g_{DW}) και σε ολικά φαινολικά διτερπένια (26,0 mg TPD/g_{DW}). Στην περίπτωση των φλαβονοειδών, ωστόσο, παρατηρήσαμε την αντίστροφη πορεία, δηλαδή μείωση της απόδοσης της εκχύλισης στα συστατικά αυτά, με την αύξηση της θερμοκρασίας από 22°C (7,72 mg QE/g_{DW}) σε 60°C (7,36 mg QE/g_{DW}).

Για την μελέτη της επίδρασης της εκχύλισης με υπερήχους, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε λουτρό υπερήχων, συχνότητας 37 kHz, με διαλύτες περιεκτικότητας 80% ακετόνη-20% νερό, 60% ακετόνη-40% νερό και 60% αιθανόλη-40% νερό. Με βάση τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η χρήση υπερήχων αύξησε τις αντίστοιχες αποδόσεις στα φαινολικά συστατικά, την εκλεκτικότητα της εκχύλισης και την αντιοξειδωτική ικανότητα σε κάθε διαλύτη αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης 60% αιθανόλη-40% νερό αποδείχθηκε το πιο αποδοτικό μέσο εκχύλισης με χρήση υπερήχων, καθώς παρουσίασε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά (77,5 mg GAE/g_{DW}), ροσμαρινικό οξύ (16,0 mg RA/g_{DW}), φλαβονοειδή (16,1 mg QE/g_{DW}) και φαινολικά διτερπένια (47,4 mg TPD/g_{DW}), καθώς και τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης (29,9%) και αντιοξειδωτική δράση (1890 mg GAE/L).

Για την εκτίμηση της επίδρασης της διαβροχής του δεντρολίβανου στην εκχύλιση, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υπό ανάδευση, με διαλύτη 60% αιθανόλη-40% νερό, διαβρεγμένου δεντρολίβανου με απιονισμένο νερό, το οποίο είχε παραμείνει στο ψυγείο σε κλειστό δοχείο για 2 h, 4 h και 24 h αντίστοιχα. Η αύξηση του χρόνου διαβροχής από 0 h σε 4 h έδειξε αύξηση των αποδόσεων της εκχύλισης σε φαινολικά από 59,3 mg GAE/g_{DW} σε 64,9 mg GAE/g_{DW}, αύξηση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης από 23% σε 31,1% και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από 1196 mg GAE/L σε 1742 mg GAE/L. Στον αμέσως επόμενο χρόνο διαβροχής των 24 h, τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή μείωση των αποδόσεων σε φαινολικά σε 62,2 mg GAE/g_{DW}, μείωση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης σε 26% και της αντιοξειδωτικής

ικανότητας σε 1613 mg GAE/L σε σχέση με το διαβρεγμένο κατά 4 h δεντρολίβανο. Συνεπώς, με τις 4 h διαβροχή του υλικού μας έχουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Σε ήδη διαβρεγμένο για 24 h δεντρολίβανο, πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία του με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων ισχύος 5,2 kV για χρόνο 15 μs πριν την απλή εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη 60% αιθανόλη-40% νερό και ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων του με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την απλή εκχύλιση υπό ανάδευση και την εκχύλιση υπό ανάδευση ήδη διαβρεγμένου για 24 h δεντρολίβανου, με τον ίδιο διαλύτη. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, αύξηση της απόδοσης σε φαινολικά συστατικά από 59,3 mg GAE/g_{DW} για την εκχύλιση υπό ανάδευση, σε 62,2 mg GAE/g_{DW} για την εκχύλιση υπό ανάδευση του διαβρεγμένου για 24 h δεντρολίβανου και τέλος σε 64,0 mg GAE/g_{DW} με την χρήση PEF. Επίσης, σημειώθηκε αύξηση της εκλεκτικότητας από 23% για την εκχύλιση υπό ανάδευση, σε 26% για την εκχύλιση υπό ανάδευση του διαβρεγμένου για 24 h δεντρολίβανου και τέλος σε 26,7% με την χρήση PEF. Η ίδια τάση παρουσιάζεται και για την αντιοξειδωτική ικανότητα, δηλαδή αύξηση της από 1196 mg GAE/L για την εκχύλιση υπό ανάδευση, σε 1613 mg GAE/L για την εκχύλιση υπό ανάδευση του διαβρεγμένου για 24 h δεντρολίβανου και τέλος σε 1746 mg GAE/L με την χρήση PEF. Επομένως η ήπια κατεργασία με PEF δε βελτιώνει σημαντικά τα αποτελέσματα της διαβροχής.

Συμπερασματικά, η εκχύλιση με υπέρηχους αποδείχθηκε ως η πιο αποδοτική ως προς την ολική απόδοση σε φαινολικά, την εκλεκτικότητα της εκχύλισης και την αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος.

Optimization of extraction conditions of rosemary bioactive constituents

Abstract

In this present diploma thesis, the effect of various parameters on rosemary extraction, a plant rich in bioactive constituents, rosemary acid, flavonoids and phenolic diterpenes, components that are well known for their strong antioxidant and antimicrobial activity, were studied, such as the optimization of the extraction. To this end, extraction experiments of ground rosemary (as had been occurred by previous thesis, Alexandrakh, 2018) were performed with stirring, whereby 5 g of rosemary was placed in a spherical sieve with 100 mL solvent to obtain a 20:1 liquid:solid ratio. The experiments are carried out at room temperature (22°C). At each extract, samples of 1,5 mL was subjected in eppendorf at 2, 5, 10, 20, 30, 50 and 70 min and a sample of the total extract. In all samples, the total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the analysis of the individual components by high pressure liquid chromatography (HPLC), and the antioxidant activity by the DPPH method was determined in the sample of the whole extract. In all experiments, a kinetic study was carried out using three models, mass transfer model, the logarithmic model and the Peleg model. The mass transfer model and the logarithmic gave the most satisfactory adjustment coefficients to our experimental data, while the Peleg model provided important information on the initial extraction rate and the equilibrium concentration in each extraction respectively. Therefore, these models are appropriate when studying kinetics of rosemary extracts.

Initially, to study the effect of the solvent, a series of extracts were performed under stirring of rosemary with non-specific granulometry and as solvents mixtures of ethanol-water (80% ethanol-20% water and 60% ethanol-40% water), pure ethanol, acetone-water mixtures (80% acetone-20% water, 60% acetone-40% water and 40% acetone-60% water), pure acetone and water were used. The results showed that the 60% acetone-40% water mixture is the most efficient solvent for simple extraction with stirring of rosemary, as it has the highest yield on phenolic components (68,2 mg GAE/g_{DW}) and the highest extraction selectivity (27,1%) while the solvent of pure acetone proved to be the least efficient (16,0 mg GAE/g_{DW} and 12,1% respectively). Subsequently, by HPLC analysis to quantify the main constituents of rosemary, it was observed that water showed the highest yield in rosemary acid (14,2 mg RA/g_{DW}), the solvent 60% acetone-40% water the highest yield in flavonoids (16,8 mg QE/g_{DW}) and finally the solvent 80% acetone-20% water the highest yield in total phenolic diterpenes (39,3 mg TPD/g_{DW}). Then, the antioxidant capacity was determined by the DPPH method, with the solvent 60% acetone-40% water reaching the maximum value (1394 mg GAE/L) and the pure acetone solvent the lowest (568 mg GAE/ L).

Subsequently, a study was carried out on the effect of granulation of ground rosemary, in which with the help of special sieves it has been divided into 5 individual fractions ($> 1000 \mu\text{m}$, $1000\text{-}800 \mu\text{m}$, $800\text{-}600 \mu\text{m}$, $600\text{-}315 \mu\text{m}$ and $<315 \mu\text{m}$) followed by extractions with stirring and solvent 80% acetone-20% water, HPLC analysis by Carnosic method and determination of antioxidant capacity by DPPH. The results showed that by reducing the particle size of the material, the extraction yields, selectivity and antioxidant capacity increased. Specifically, the smaller grain size $<315 \mu\text{m}$ exhibited the highest yield of phenolic components (62,5 mg GAE/ g_{DW}), the highest extraction selectivity (28,3%), the highest yield of total phenolic diterpens (47,2 mg TPD/ g_{DW}), and the highest antioxidant capacity (1678 mg GAE/ L).

To study the effect of temperature on simple extraction with stirring of rosemary with non-specific granulometry, extractions was performed with 40% acetone-60% water, as the solvent, at temperatures of 22°C, 40°C and 60°C and further HPLC analyzes and antioxidant capacity determination, respectively. Increasing the temperature to 60°C led to an increase in the yield of phenolic components (70,3 mg GAE/ g_{DW}) and antioxidant capacity (1582 mg GAE/L), but also led to a decrease in the selectivity of the extract (20,7%). It also showed an increase in yield in rosemary acid (13,0 mg RA/ g_{DW}) and total phenolic diterpens (26,0 mg TPD/ g_{DW}). In the case of flavonoids, however, we observed the reverse course, that is, a decrease in the extraction yield of these components, by increasing the temperature from 22°C (7,72 mg QE/ g_{DW}) to 60°C (7,36 mg QE/ g_{DW}).

To study the effect of ultrasonic extraction, 5 g of ground rosemary with non-specific granulometry was added to a round flask with 100 mL of a solvent and 1,5 mL of samples were subjected at eppedorfs at 2, 5, 10, 20, 30 and 50 min. For this purpose, extractions were made in an ultrasonic bath, with frequency of 37 kHz , with the following solvents: 80% acetone-20% water, 60% acetone-40% water and 60% ethanol-40% water. Based on the results, it was found that the use of ultrasounds increased the corresponding yields on the phenolic components, the selectivity of the extraction and the antioxidant capacity of each solvent respectively. Specifically, the solvent 60% ethanol-40% water proved to be the most efficient extractor for the experiments with the ultrasounds as it showed the highest yields of phenolic components (77,5 mg GAE/ g_{DW}), rosemary acid (16,0 mg RA/ g_{DW}), flavonoids (16,1 mg QE/ g_{DW}) and phenolic diterpenes (47,4 mg TPD/ g_{DW}), as well as greater extraction selectivity (29,9%) and antioxidant activity (1890 mg GAE/L). In general, we observed that the yield on flavonoids was reduced by the use of 60% acetone-40% water mixture in the experiments with ultrasounds. This may occur due to high temperature development in the bath, resulting to their destruction, which was also observed when studying the effect of temperature on simple extraction with stirring.

To assess the effect of rosemary wetting on extraction, extractions with stirring were performed, with 60% ethanol-40% water as the solvent, of soaked rosemary with deionized water, which had been kept in the refrigerator in a closed vessel for 2 h, 4 h and 24 h respectively. Increasing the wetting time from 0 h to 4 h showed an increase in the phenolic extraction yields from 59,3 mg GAE/ g_{DW} to 64,9 mg GAE/ g_{DW} ,

increasing the reaction selectivity from 23% to 31,1% and increase in the antioxidant capacity from 1196 mg GAE/L to 1742 mg GAE/L. In the immediately following 24 h wetting time, the results showed a decrease in phenolic yields to 62,2 mg GAE/g_{DW}, a decrease in the extraction selectivity to 26% and in the antioxidant capacity to 1613 mg GAE/L relative to soaked for 4 h rosemary. Therefore, with our 4 h wetting of the material we can obtain the best results.

Pre-soaked rosemary for 24 h pretreated using pulsed electric fields (5,2 kV for 15 μ s) prior to simple extraction with stirring with 60% ethanol-40% water as the solvent, followed by comparing its results with those obtained by simple extraction with stirring and extraction with stirring already soaked for 24 h rosemary with the same solvent. We therefore observed an increase in the yield of phenolic components from 59,3 mg GAE/g_{DW} for stirring extraction to 62,2 mg GAE/g_{DW} for stirring extraction of 24 h soaked rosemary and finally to 64,0 mg. GAE/g_{DW} using PEF. There was also an increase in selectivity from 23% for stirring extraction, to 26% for stirring extraction of 24 h soaked rosemary and finally to 26,7% using PEF. The same trend is observed for the antioxidant capacity, ie an increase from 1196 mg GAE/L for stirring extraction, to 1613 mg GAE/L for stirring extraction of soaked rosemary for 24 h and finally to 1746 mg GAE/L using PEF. Therefore, mild treatment with PEF does not significantly improve the wetting results.

In conclusion, extraction with ultrasounds proved to be the most efficient in terms of total phenolic yield, reaction selectivity and antioxidant capacity of the final extract.

Περιεχόμενα

1. Το δεντρολίβανο και τα βιοδραστικά συστατικά του.....	13
1.1. Γενικά για το δεντρολίβανο.....	13
1.2. Βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου.....	14
1.2.1. Γενικά για τις φαινολικές ενώσεις.....	14
1.2.2. Ροσμαρινικό Οξύ.....	16
1.2.3. Καρνοσικό οξύ.....	16
1.2.4. Καρνοσόλη.....	17
1.2.5. Αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου.....	18
1.2.5.1. Οξείδωση λιπιδίων.....	18
1.2.5.2. Αντιοξειδωτικά.....	19
1.2.6. Πτητικές αρωματικές ουσίες του δεντρολίβανου.....	20
2. Εκχύλιση.....	21
2.1. Εκχύλιση στερεού-υγρού.....	21
2.2. Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού-υγρού.....	22
2.2.1. Εκχύλιση Soxhlet.....	22
2.2.2. Υδρο-ατμοαπόσταξη.....	24
2.2.3. Διαβροχή.....	24
2.3. Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού υγρού.....	25
2.3.1. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE).....	25
2.3.2. Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF).....	26
2.3.3. Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)	27
2.3.4. Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (PLE)	29
2.3.5. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE).....	30
2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση φαινολικών συστατικών.....	31
2.4.1. Τύπος Διαλύτη.....	31
2.4.2. Λόγος υγρού-στερεού.....	32
2.4.3. Θερμοκρασία.....	33
2.4.4. pH.....	34
2.4.5. Μέθοδος συντήρησης.....	35
3. Μαθηματική μοντελοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης.....	35
3.1. Μοντέλο μεταφοράς μάζας.....	35
3.2. Λογαριθμικό μοντέλο.....	41
3.3. Μοντέλο του Peleg.....	41
4. Πειραματικό μέρος.....	43
4.1. Σχεδιασμός πειραμάτων.....	43
4.2. Πρώτες ύλες-αντιδραστήρια-συσκευές.....	44
4.2.1. Πρώτες ύλες.....	44
4.2.2. Αντιδραστήρια.....	44
4.2.3. Συσκευές.....	45
4.3. Πειραματικές τεχνικές.....	46
4.3.1. Εκχύλιση υπό ανάδευση.....	46

4.3.2. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.....	47
4.3.3. Εκχύλιση με υπέρηχους.....	47
4.4. Αναλυτικές μέθοδοι.....	47
4.4.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	47
4.4.2. Ανάλυση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC.....	48
4.4.3. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH.....	49
4.4.4. Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα.....	50
5. Συζήτηση-αποτελέσματα.....	51
5.1. Επίδραση του διαλύτη.....	51
5.1.1. Μίγματα αιθανόλης-νερού.....	51
5.1.1.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	51
5.1.1.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	54
5.1.1.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων και του νερού με τη μέθοδο HPLC.....	55
5.1.1.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	64
5.1.2. Μίγματα ακετόνης-νερού.....	65
5.1.2.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	65
5.1.2.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	70
5.1.2.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων και του νερού με τη μέθοδο HPLC.....	71
5.1.2.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	80
5.1.3. Σύγκριση αιθανολικών, ακετονικών μιγμάτων και νερού.....	81
5.1.3.1. Σύγκριση αποδόσεων σε φαινολικά συστατικά, στερεά και εκλεκτικότητα της εκχύλισης.....	81
5.1.3.2. Σύγκριση αποδόσεων των συστατικών κάθε εκχυλίσματος με βάση τη χρωματογραφική ανάλυση HPLC.....	83
5.1.3.3. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας	84
5.2. Επίδραση της κοκκομετρίας.....	85
5.2.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	85
5.2.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	91
5.2.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC.....	92
5.2.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	93
5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	94
5.3.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	94
5.3.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	98

5.3.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC.....	99
5.3.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	104
5.4. Επίδραση των υπέρηχων.....	105
5.4.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	105
5.4.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	110
5.4.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC.....	111
5.4.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	118
5.5. Επίδραση της διαβροχής.....	119
5.5.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	119
5.5.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	122
5.5.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	123
5.6. Επίδραση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων	124
5.6.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με το χρόνο-κινητική μελέτη.....	124
5.6.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά-εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	125
5.6.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	126
5.7. Σύγκριση μεθόδων.....	127
5.7.1. Σύγκριση αποδόσεων σε ολικά φαινολικά, στερεά συστατικά και εκλεκτικότητα.....	127
5.7.2. Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας	128
6. Συμπεράσματα.....	129
7. Βιβλιογραφία.....	132

Εισαγωγή

Η Ελλάδα είναι μια χώρα της οποίας το μεσογειακό κλίμα έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη πλούσιας χλωρίδας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), ένα αρωματικό φυτό που ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (*Lamiaceae*), με υψηλή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Οι παραπάνω δράσεις του σχετίζονται με την παρουσία флаβονοειδών, ροσμαρινικού οξέος και διτερπενίων όπως το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη. Το εκχύλισμα δεντρολίβανου αποτελεί ένα αποτελεσματικό φυσικό συντηρητικό τροφίμων, όπως για παράδειγμα κατά την σταθεροποίηση του ηλιελαίου και την τυποποίηση χοιρινού κρέατος.

Οι συνθήκες λειτουργίας όπως ο χρόνος εκχύλισης, ο λόγος υγρού προς στερεό και το είδος του διαλύτη παίζουν σημαντικό ρόλο στη συμβατική διαδικασία εκχύλισης. Η συμβατική εκχύλιση στερεών-υγρών χρησιμοποιείται ευρέως για παραλαβή αντιοξειδωτικών, καθώς είναι ασφαλής, φθηνή και εύκολη στην κλιμάκωση. Τεχνικές εκχύλισης όπως η εκχύλιση με υπέρηχους, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ή εκείνες που χρησιμοποιούν υπερκρίσιμο ρευστό χρησιμοποιούνται κυρίως για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της διαδικασίας της εκχύλισης και της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η σωστή επιλογή των συνθηκών λειτουργίας οδηγεί σε υψηλότερο ρυθμό ανάκτησης των επιθυμητών ενώσεων και σε ένα πιο συμπυκνωμένο τελικό προϊόν (εκχύλισμα) χρησιμοποιώντας λιγότερη ενέργεια, χρόνο, πρώτη ύλη και διαλύτη. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθούν για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών διαφορετικών φυτών ή ακόμη και για το ίδιο το φυτό εάν έχει υποστεί διαφορετικές προεπεξεργασίες. Για τον σκοπό αυτό, αποφασίσαμε ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας να είναι η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων της εκχύλισης στην κινητική της εκχύλισης, στην τελική απόδοση σε φαινολικά συστατικά, στις αποδόσεις σε ροσμαρινικό οξύ, флаβονοειδή και ολικά φαινολικά διτερπένια και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος, με απώτερο στόχο την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών εκχύλισης για την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης παραμέτρων όπως ο διαλύτης, η κοκκομετρία του φυτικού υλικού, η θερμοκρασία, η διαβροχή του για ορισμένο χρονικό διάστημα πριν την συμβατική εκχύλιση, καθώς και η χρήση μη συμβατικών μεθόδων όπως η εκχύλιση με υπέρηχους και η προεπεξεργασία φυτικού υλικού με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.

1. Το δεντρολίβανο και τα βιοδραστικά συστατικά του

1.1. Γενικά για το δεντρολίβανο

Το δεντρολίβανο ή *Rosmarinus officinalis*, μέλος της οικογένειας *Lamiaceae*, είναι ένας ανθεκτικός αειθαλής θάμνος που αναπτύσσεται εγγενώς στην περιοχή της Μεσογείου. Η λατινική ονομασία του φυτού σημαίνει δροσιά της θάλασσας και είναι σύνθετη από τις λέξεις *ros* (δροσιά) και *marinus* (θαλάσσιος), γιατί πιστευόταν ότι το φυτό μπορεί να αναπτυχθεί χωρίς πότισμα, αρκούμενο μόνο στην υγρασία που έρχεται από τη θάλασσα. Στην αρχαιότητα, οι Αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποιούσαν σε διάφορες θρησκευτικές τελετές και γιορτές, σε στολισμούς κτηρίων, ναών και ως καύσιμο για θυμίαμα. Στις μέρες μας, καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο λόγω της ευρείας χρήσης του ως μπαχαρικό/καρύκευμα, αρωματικό παράγοντα και για ιατρικούς σκοπούς. Λόγω των εγγενών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του, το εκχύλισμα δεντρολίβανου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για βελτίωση της διάρκειας ζωής διαφόρων προϊόντων διατροφής.



Εικόνα 1.1. Κλωνάρι δεντρολίβανου με κυανόλευκα άνθη

Το δεντρολίβανο τυπικά πολλαπλασιάζεται μέσω σπόρων, μοσχευμάτων, στρωμάτων ή μέσω διαίρεσης ριζών. Τα φύλλα δεντρολίβανου μπορούν να συλλεχθούν τρεις έως τέσσερις φορές το χρόνο, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και αν η συγκομιδή αφορά φυτικό υλικό ή αιθέριο έλαιο. Η καλλιέργεια τερματίζεται συχνά πριν αρχίσει η άνθηση, καθώς το αποξηραμένο προϊόν περιέχει μόνο φύλλα. Για την αγορά φρέσκου δεντρολίβανου, το δεντρολίβανο κόβεται συχνά σε ένα νεαρό στάδιο ως φρέσκοι βλαστοί για χρήση σε διάφορες, κυρίως, μαγειρικές εφαρμογές. Τα φύλλα ή τα εκχυλίσματα που προέρχονται από το δεντρολίβανο χρησιμοποιούνται, συνήθως, ως μαγειρικά βότανα, αρωματικά

τροφίμων και φυσικά αντιοξειδωτικά. Το εκχύλισμα δεντρολίβανου διατίθεται στο εμπόριο σε μορφή σκόνης ή ως υγρό μετά από αραίωση/τυποποίηση με κατάλληλους μεταφορείς ποιότητας τροφίμων που εξασφαλίζουν την σταθερή ποιότητα του προϊόντος. Η επιλογή του προϊόντος του εκχυλίσματος του δεντρολίβανου και η μορφή του εξαρτάται από τον τύπο της μήτρας των τροφίμων όπου πρόκειται να εφαρμοστεί.

1.2. Βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου

1.2.1. Γενικά για τις φαινολικές ενώσεις

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις ή φαινολικά συστατικά εννοούμε μια κατηγορία χημικών ενώσεων, των οποίων το μόριο περιλαμβάνει έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο που φέρει ένα ή περισσότερα υδροξύλια και άλλους υποκαταστάτες. Ανάλογα με την χημική τους δομή διακρίνονται σε πολλές κατηγορίες, οι κυριότερες των οποίων είναι:

- ✓ Φαινολικά οξέα: περιλαμβάνουν τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (C6-C1), όπως το γαλλικό, το ελλαγικό, το συριγικό και το π-υδροβενζοϊκό, και τα υδροξυκιναμωμικά οξέα (C6-C3), όπως η ευγενόλη, η εσκουλετίνη, το π-κουμαρικό, το ροσμαρινικό, το φερουλικό και το καφεϊκό οξύ.
- ✓ Φλαβονοειδή: αποτελούν ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες όπως τις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή, ανάλογα τους υποκαταστάτες των δακτυλίων (π.χ. υδροξύλια και μεθύλια).
- ✓ Λιγνίνη: άμορφη πολυμερής φαινολική ένωση προερχόμενη κυρίως από C6-C3 φαινυλπροπανοειδείς υπομονάδες, με μοριακό βάρος >15000. Διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα από την προέλευσή του, το γυμνόσπερμα, το δικότυλα αγγειόσπερμα και το μονοκότυλα αγγειόσπερμα.
- ✓ Άλλες σημαντικές φαινολικές ενώσεις είναι και οι κουμαρίνες, που ανήκουν στην ομάδα των βενζοπυρονών, τα στιλβένια και οι ταννίνες, οι οποίες εμφανίζονται ως υδρολυόμενες ταννίνες και ως συμπυκνωμένες ταννίνες, γνωστές ως προανθοκυανιδίνες, οι οποίες είναι τα πολυμερή της κατεχίνης και της επικατεχίνης.

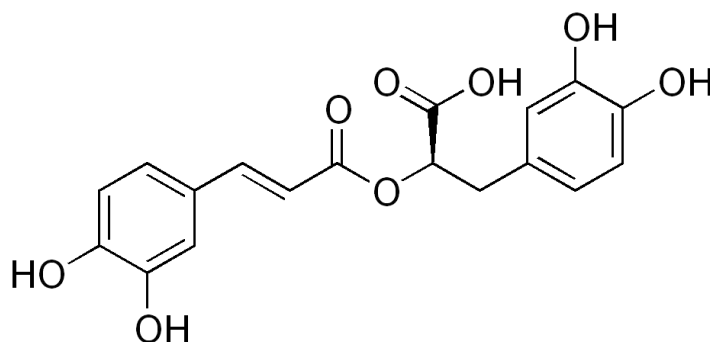
Τα φαινολικά συστατικά λαμβάνουν μέρος σε βασικές λειτουργίες του φυτού, όπως η φωτοσύνθεση, καθώς και σε βιοχημικές αντιδράσεις και μεταβολικές διαδικασίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα φυτά από μικροβιακούς εισβολείς, όπως ιοί, μύκητες και βακτήρια. Ωστόσο, ο λόγος που εμφανίζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Η δέσμευση των ελευθέρων ριζών που προκύπτουν από την υπερίσθη ακτινοβολία, καθώς και από άλλους παράγοντες, αποτρέπει την οξειδωτική καταστροφή των φυτικών ιστών.

Στην βιομηχανία τροφίμων, τα φαινολικά συστατικά που απομονώνονται από διάφορα φυτά χρησιμοποιούνται, αφενός για την βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων και αφετέρου ως συντηρητικά, λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στα φαινολικά συστατικά του δεντρολίβανου. Το εκχύλισμα δεντρολίβανου περιέχει διάφορες ομάδες πολυφαινολών, συμπεριλαμβανομένων φαινολικών διτερπενίων, φλαβονοειδών και ορισμένων φαινολικών οξέων. Από την ομάδα των φαινολικών διτερπενίων οι κύριες ουσίες είναι το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη και ακολουθούν η ροσμανόλη και η ισοροσμανόλη. Το κυριότερο φαινολικό οξύ που συναντάται στο δεντρολίβανο είναι το ροσμαρινικό, ακολουθούν το καφεϊκό, το χλωρογενικό και το βανιλικό.

Η σύνθεση των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας εκχύλισης που χρησιμοποιείται. Αν και έχουν εντοπιστεί αρκετά αντιοξειδωτικά συστατικά, οι ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι τα φαινολικά διτερπένια με κύρια το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη, που αντιπροσωπεύουν πάνω από το 90% της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος του δεντρολίβανου. Άλλες φαινολικές ενώσεις και δευτερεύοντα συστατικά που απαντώνται στο εκχύλισμα δεντρολίβανου, όπως η ροσμαλάνλη, η επιροσμανόλη, η ισοροσμανόλη, η ρομαντίαλη, η ροσμαριδιφαινόλη και η ροσμαριχινόνη ασκούν επίσης ορισμένες αντιοξειδωτικές λειτουργίες. Επιπροσθέτως, τριτερπένια και τριτερπενικά οξέα όπως βετουλίνη, αμυρίνη, βετουλινικό οξύ, ελαιανικό οξύ και ουρσολικό οξύ μπορούν επίσης να υπάρχουν στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου. Παρακάτω, θα αναφερθούμε πιο αναλυτικά στα τρία βασικά συστατικά του δεντρολίβανου: ροσμαρινικό οξύ, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη.

1.2.2. Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ είναι παράγωγο του καφεϊκού οξέος και συναντάται σε δύο μορφές (R και S). Ελεύθερο στην φύση υπάρχει το R εναντιομερές. Το όνομά του προήλθε από την ονομασία του δεντρολίβανου (rosemary), επειδή απομονώθηκε για πρώτη φορά από το συγκεκριμένο φυτό, ενώ υπάρχει σε πολλά είδη της οικογένειας Lamiales. Ο κύριος ρόλος του είναι οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.

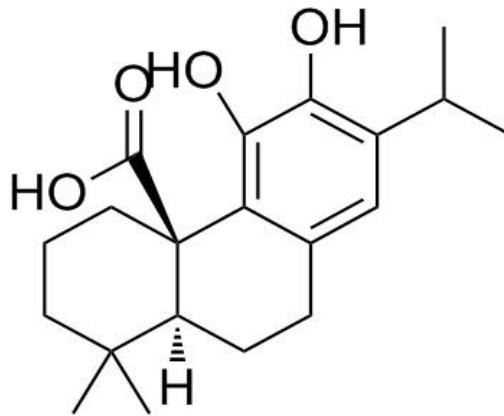


Εικόνα 1.2. Ροσμαρινικό οξύ

1.2.3. Καρνοσικό οξύ

Το καρνοσικό οξύ είναι ένα φαινολικό διτερπένιο με μοριακό τύπο $C_{20}H_{28}O_4$. Ανήκει στη μεγαλύτερη κατηγορία άνω των 50.000 φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών που ονομάζονται τερπενοειδή, επίσης γνωστά ως ισοπρενοειδή ή τερπένια. Επειδή το καρνοσικό οξύ περιέχει μια φαινολική ομάδα, συχνά ταξινομείται ανάμεσα στις πολυφαινόλες. Ωστόσο, η κυτταρική κατανομή, η βιοσυνθετική οδός, οι ιδιότητες διαλυτότητας και οι ρόλοι του είναι ουσιαστικά διαφορετικοί από την πλειονότητα των πολυφαινολών και μοιάζουν περισσότερο με των τερπενοειδών (τοκοφερόλες και καροτενοειδή). Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Linde το 1964 στο φυτό *Salvia officinalis* (φασκόμηλο). Αργότερα, βρέθηκε καρνοσικό οξύ, σε πολύ υψηλότερα επίπεδα (3% επί του βάρους φυλλώδη φύλλα), σε φύλλα *Rosmarinus officinalis* (δεντρολίβανο) (Wenkert et al., 1965).

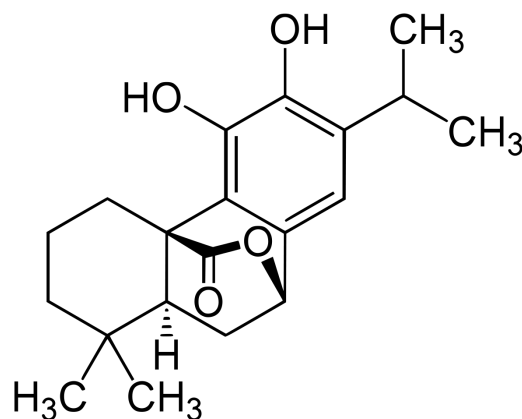
Σήμερα, το μόριο εμφανίζεται κυρίως στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* όπως *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Oreganum* (ρίγανη) και *Thymus* (θυμάρι). Στο φυτό *Salvia*, 50 από τα 62 είδη που εξετάστηκαν περιείχαν καρνοσικό οξύ με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,1 έως 21,8 mg/g_{DW}, ενώ στο *R. officinalis*, το περιεχόμενο κυμαίνεται από 3 έως 50 mg/g_{DW}, ανάλογα με την ποικιλία, το αναπτυξιακό στάδιο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ύπαρξη δύο υδροξυλομάδων στο μόριο του καρνοσικού οξέος στους άνθρακες C11 και C12 σε ορθό θέσεις συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.



Εικόνα 1.3. Καρνοσικό οξύ

1.2.4. Καρνοσόλη

Η καρνοσόλη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φασκόμηλο το 1942 και η χημική δομή εδραιώθηκε για πρώτη φορά το 1964 από τον Brieskorn και τους συνεργάτες του. Το δεντρολίβανο και το φασκόμηλο είναι γνωστό ότι περιέχουν μια ποικιλία πολυφαινολών όπως η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, η ροσμαλάνλη και το ροσμαρινικό οξύ. Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 5% του ξηρού βάρους των φύλλων δενδρολίβανου περιέχει καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ, ωστόσο, αυτό το κλάσμα αντιπροσωπεύει πάνω από το 90% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του. Η καρνοσόλη είναι ένα διφαινολικό διτερπένιο με ομάδες υδροξυλίου στους άνθρακες C11 και C12 σε ορθό θέσεις και ένα τμήμα λακτόνης διαμέσου του μεσαίου δακτυλίου. Η καρνοσόλη είναι το προϊόν της οξειδωτικής αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος. Πέρα από την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή της δράση, η καρνοσόλη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντικαρκινικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας .



Εικόνα 1.4. Καρνοσόλη

1.2.5. Αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια από τις πιο κρίσιμες πτυχές της υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων, η οποία επηρεάζει επίσης και τις λειτουργικές τους ιδιότητες, τη θρεπτική αξία, την ασφάλεια, το χρώμα, τη γεύση καθώς και την αποδοχή των καταναλωτών. Ο έλεγχος της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα παραμένει πρόκληση, καθώς τα περισσότερα τρόφιμα αποτελούνται από πολύπλοκες μήτρες. Η οξείδωση των ακόρεστων λιπιδίων στα τρόφιμα περιλαμβάνει μια αλυσιδωτή αντίδραση ελεύθερων ριζών, η οποία γενικά προκαλείται από την παρουσία υπεριώδους και/ή ορατού φωτός, θερμότητα, αέρα και ιόντα μεταλλοξειδίου. Η οξείδωση λιπιδίων παράγει διάφορα πρωτογενή και δευτερογενή παραπροϊόντα που υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων. Για τον σκοπό αυτό, είναι απαραίτητο η καθυστέρηση της οξείδωσης των λιπιδίων με την χρήση αντιοξειδωτικών.

1.2.5.1. Οξείδωση λιπιδίων

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα εννοούμε κάθε άτομο ή μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Η ύπαρξη ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου, έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή τάση των ελευθέρων ριζών να αντιδρούν με άλλα μόρια ώστε να αποσπασουν ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν από τον ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού, όταν το ζεύγος ηλεκτρονίων που αποτελούσαν το δεσμό μοιραστούν ανά ένα σε κάθε ομάδα που προκύπτει από την διάσπαση. Σε αντίθεση με την ομολυτική σχάση, στην ετερόλυση, το ζεύγος ηλεκτρονίων δίνεται στο ηλεκτραρνητικότερο άτομο και προκύπτει ένα ανιόν και ένα κατιόν.

Η οξείδωση των λιπιδίων περιλαμβάνει τρία στάδια: το στάδιο έναρξης, το στάδιο διάδοσης και το στάδιο τερματισμού. Στο στάδιο έναρξης, μία ρίζα λιπαρού οξέος, γνωστή ως αλκυλο-ρίζα (L^*) σχηματίζεται από την αφαίρεση ενός υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ (LH) υπό την παρουσία ενός εκκινήτη (ln^*). Μόλις σχηματιστεί η αλκυλο-ρίζα, το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταφερθεί πάνω από το διπλό δεσμό με αποτέλεσμα την μετατόπιση του διπλού δεσμού, όπου στην περίπτωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σχηματίζονται συζευγμένοι διπλοί δεσμοί. Το πρώτο βήμα της διάδοσης περιλαμβάνει την προσθήκη οξυγόνου στην αλκυλο-ρίζα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υπεροξυδικής ρίζας (LOO^*) η οποία έχει υψηλότερη ενέργεια από το αλκύλιο. Έτσι η υπεροξυδική ρίζα μπορεί να αφαιρέσει υδρογόνο από ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ και να παράγει ένα υδροϋπεροξείδιο λιπιδίου ($LOOH$) και μία νέα ρίζα αλκυλίου. Η αλληλεπίδραση των δύο ελευθέρων ριζών για το σχηματισμό μη ριζικών ειδών ολοκληρώνει τη διεργασία (στάδιο τερματισμού). Αυτό το βήμα δεν είναι τόσο σημαντικό σε πολλά τρόφιμα, όπως η έναρξη και η διάδοση, δεδομένου ότι τα τρόφιμα είναι ήδη ταγγισμένα πριν σημαντικές αντιδράσεις τερματισμού λάβουν χώρα.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο μηχανισμός της οξείδωσης των λιπιδίων:

- ✓ Στάδιο έναρξης: $\text{In}^* + \text{LH} \rightarrow \text{InH} + \text{L}^*$
- ✓ Στάδιο διάδοσης: $\text{L}^* + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^*$, $\text{LOO}^* + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}^*$
- ✓ Στάδιο τερματισμού: $\text{LOO}^* + \text{LOO}^* \rightarrow \text{LOOL} + \text{O}_2$, $\text{L}^* + \text{LOO}^* \rightarrow \text{LOOL}$, $\text{L}^* + \text{L}^* \rightarrow \text{LL}$

Τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων (LOOH), που αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης, είναι συνήθως αρωματικές και άοσμες ενώσεις. Η αποσύνθεση τους, που συμβαίνει παρουσία μετάλλων ή σε υψηλή θερμοκρασία, οδηγεί στο σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπως αλδεΐδες, κετόνες, λακτόνες και φουρανικά παράγωγα. Αυτές οι ενώσεις συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των οσμών και στα αρώματα στα τρόφιμα. Η παρουσία φυσικών απαντώντων αντιοξειδωτικών όπως εκείνων που προέρχονται από το εκχύλισμα του δεντρολίβανου μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο αυτών των αντιδράσεων αποικοδόμησης.

1.2.5.2. Αντιοξειδωτικά

Με τον όρο αντιοξειδωτικό, ονομάζεται κάθε ένωση η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές περιεκτικότητες σε ένα οξειδούμενο υπόστρωμα επιβραδύνει ή παρεμποδίζει την πορεία οξείδωσης του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, δρουν ως δότες ατόμων υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες LOO^* και L^* διακόπτοντας έτσι τις αντιδράσεις διάδοσης.

Όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω, το δεντρολίβανο παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, το 90% της οποίας οφείλεται στην παρουσία του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης, τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά. Το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη μπορούν να οξειδωθούν περαιτέρω κατά την έκθεση σε αυξημένες θερμοκρασίες, οξυγόνο και φως, αλλά διατηρείται η ικανότητά τους να καθυστερούν την οξείδωση των λιπιδίων. Όταν το καρνοσικό οξύ αντιδράσει με ελεύθερες ρίζες λιπιδίων, μετατρέπεται σε μόριο καρνοσόλης. Η καρνοσόλη, στην συνέχεια, αντιδρά επίσης με ελεύθερες ρίζες λιπιδίων και μετατρέπεται σε ροσμανόλη. Τα πρωτογενή προϊόντα αποσύνθεσης του καρνοσικού οξέος είναι η καρνοσόλη και η ροσμανόλη ενώ το προϊόν δευτερεύουσας αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος είναι η επιροσμανόλη. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ροσμανόλη συνεχίζει τη διαδικασία απομάκρυνσης ελευθέρων ριζών μέχρι να γίνει γαλσοσόλη. Ο Liu και η ομάδα του (2013) μελέτησαν το μονοπάτι αποδόμησης του καρνοσικού οξέος σε μεθανολικό διάλυμα μέσω της απομόνωσης και της δομικής ταυτοποίησης των προϊόντων αποδόμησης του. Ανέφεραν ότι το καρνοσικό οξύ μπορεί να αποσυντεθεί σε κινόνη καρνοσικού οξέος σε μεθανόλη. Η κινόνη καρνοσικού οξέος είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν που μπορεί είτε να αναχθεί σε καρνοσικό οξύ είτε να μετατραπεί περαιτέρω σε καρνοσόλη. Η καρνοσόλη με την σειρά της μπορεί να αποσυντεθεί περαιτέρω για να σχηματίσει επιροσμανόλη, ροσμανόλη, 7-μεθοξυστανμαόλη και 7-μεθοξυεπιροσμανόλη.

1.2.6. Πτητικές αρωματικές ουσίες του δεντρολίβανου

Εκτός από τα αντιοξειδωτικά συστατικά, το εκχύλισμα δενδρολίβανου περιέχει αρκετά πτητικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για τα χαρακτηριστικά της γεύσης και της οσμής του. Οι κύριες πτητικές ενώσεις που βρίσκονται στο κλάσμα αιθέριου ελαίου εκχυλίσματος δενδρολίβανου είναι η καμφορά, η βορνεόλη, ο οξικός βορνυλεστέρας, η ευκαλυπτόλη (1,8 κινεόλη), η βερβενόνη, η α-τερπινεόλη, το α-πινένιο και το λιμονένιο, μεταξύ άλλων. Το κλάσμα αιθέριου ελαίου του εκχυλίσματος δενδρολίβανου είναι ένα άχρωμο ή ωχροκίτρινο υγρό που περιέχει αυτές τις πτητικές ενώσεις. Τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από δεντρολίβανο έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται για την αντιμικροβιακή δράση είναι η καμφορά, ο οξικός βορνυλεστέρας, το α-πινένιο και η ευκαλυπτόλη.

Ο Bozin και η ομάδα του (2007) διερεύνησαν την αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από δεντρολίβανο και φασκόμηλο έναντι πολλών μικροοργανισμών αλλοίωσης των τροφίμων. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αιθέρια έλαια τόσο του δεντρολίβανου όσο και του φασκόμηλου ήταν αποτελεσματικά έναντι *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* και *Shigella sonnei*. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου έδειξε και αντιμυκητιακή δραστηριότητα. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από τον Fu και τους συνεργάτες του (2007) για την αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων από δενδρολίβανο και φασκόμηλο κατά ορισμένων βακτηριακών στελεχών. Αν και το εκχύλισμα δενδρολίβανου περιέχει τόσο πτητικές ενώσεις όσο και αντιοξειδωτικά συστατικά, μπορεί να παραχθεί έτσι ώστε να ενισχυθεί η αντιοξειδωτική του δραστηριότητα. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω απόσταξης με ατμό για να απομακρυνθεί μέρος του κλάσματος του πτητικού ελαίου από το εκχύλισμα. Ωστόσο, υπολειμματικές ποσότητες πτητικών αρωματικών ενώσεων ενδέχεται να παραμείνουν στο τελικό εκχύλισμα και να έχουν κάποιες γευστικές επιδράσεις.

2. Εκχύλιση

Ως εκχύλιση ορίζεται η παραλαβή μιας ουσίας Α από μίγμα ουσιών με την χρήση ενός διαλύτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται κυρίως οργανικοί διαλύτες. Η εκχύλιση αποτελεί μιά από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρύτητα της εκχύλισης ως φυσική μέθοδος διαχωρισμού, οφείλεται στην απλότητα, στην ταχύτητα, στην ευελιξία και στην δυνατότητα εφαρμογής της σε μίγματα που περιέχουν είτε ίχνη, είτε μεγάλες ποσότητες μιας ουσίας. Οι τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιούνται, είναι κυρίως η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση υγρού-υγρού. Στην εκχύλιση στερεού-υγρού απομακρύνεται ένα η περισσότερα συστατικά από το στερεό χρησιμοποιώντας κατάλληλο διαλύτη. Από την άλλη, στην εκχύλιση υγρού-υγρού απομακρύνεται ένα ή περισσότερα συστατικά από την υγρή φάση σε μια δεύτερη, στην οποία τα αντίστοιχα συστατικά εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα.

2.1. Εκχύλιση στερεού-υγρού

Ως εκχύλιση ή έκπλυση στερεού καλείται η διεργασία μεταφοράς μάζας μέσω της διεπιφάνειας στερεού-υγρού που οδηγεί σε απομάκρυνση των συστατικών του στερεού με την χρήση κατάλληλου διαλύτη. Όταν ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό πραγματοποιείται μια σειρά από βήματα που επηρεάζουν τον διαχωρισμό του συστατικού από το στερεό και την παραλαβή του στον κυρίως όγκο του διαλύτη. Τα βήματα αυτά είναι τα εξής:

1. Είσοδος του διαλύτη στην μήτρα του στερεού.
2. Διαλυτοποίηση του συστατικού.
3. Μεταφορά του συστατικού προς το εξωτερικό της μήτρας του στερεού.
4. Μεταφορά του συστατικού από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού, μέσω του στατικού υμένα που περιβάλλει το στερεό, προς τον κύριο όγκο του διαλύτη.
5. Μετακίνηση του συστατικού στον κύριο όγκο του διαλύτη.
6. Διαχωρισμός του εκχυλίσματος (διαλύτης και διαλυμένο συστατικό) από το στερεό.

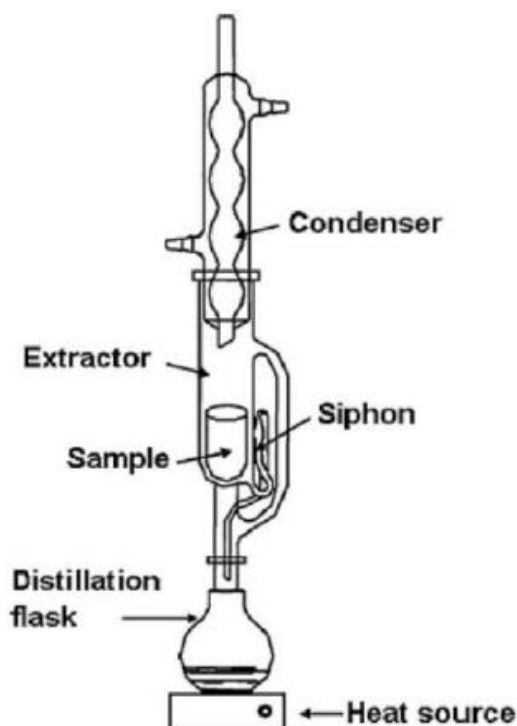
Η αποτελεσματικότητα της διεργασίας εξαρτάται από την καλή επαφή μεταξύ των φάσεων, οι οποίες και πρέπει να είναι μερικώς αναμίξιμες.

2.2. Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού αποτελεί μία από τις κυριότερες μεθόδους παραλαβής συστατικών από φυτικούς ιστούς. Για την εκχύλιση των φυτικών υλικών έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές εκχύλισης τα τελευταία χρόνια, που περιλαμβάνουν συμβατικές και μη συμβατικές μεθόδους. Οι συμβατικές μέθοδοι είναι η εκχύλιση Soxhlet, η διαβροχή και η απόσταξη με υδρατμούς. Για την ενίσχυση της συνολικής απόδοσης και της επιλεκτικότητας βιοδραστικών συστατικών από τα φυτικά υλικά, έχουν μελετηθεί ως μη συμβατικές μέθοδοι η χρήση υπερήχων, παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, μικροκυμάτων και υπερκρίσιμων και πεπιεσμένων υγρών.

2.2.1. Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet αναπτύχθηκε το 1987 από τον Γερμανό χημικό Von Soxhlet και αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης. Στην εικόνα 2.1 απεικονίζεται η πειραματική διάταξη της εκχύλισης Soxhlet. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε αυτή, παραμένουν πρωταρχικές αναφορές ως προς την απόδοση των νέων τεχνικών εκχύλισης. Τις τελευταίες δεκατίες έχουν πραγματοποιηθεί τροποποιήσεις της μεθόδου με σκοπό να την φέρουν πλησιέστερα προς τις νέες τεχνικές, μειώνοντας τον χρόνο έκπλυσης με την χρήση βοηθητικών πηγών ενέργειας και την αυτοματοποίηση της εκχύλισης.



Εικόνα 2.1. Πειραματική διάταξη της εκχύλισης Soxhlet

Η κλασική εφαρμογή της εκχύλισης Soxhlet ήταν ο προσδιορισμός του λίπους στο γάλα, όπου για τον σκοπό αυτό το στερεό δείγμα τοποθετείται σε μια φύσιγγα και γεμίζει σταδιακά με το συμπύκνωμα φρέσκου διαλύτη, ο οποίος προέρχεται από μια φιάλη στην οποία βράζει. Όταν ο διαλύτης υπερχειλίζει από τον εκχυλιστήρα, αναρροφάται από ένα σιφώνιο, απομακρύνεται από τη φύσιγγα και αδιάζεται στη φιάλη στην οποία έγινε ο βρασμός. Ο διαλύτης που υπέστη αναρρόφηση περιέχει τα στερεά συστατικά που έχουν εκχυλιστεί και έτσι τα μεταφέρει στον κύριο όγκο του διαλύτη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι ότου ο διαλύτης που βρίσκεται μέσα στη φύσιγγα αποχρωματιστεί, γεγονός που σημαίνει ότι η εκχύλιση έχει ολοκληρωθεί.

Μερικά από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- ✓ Υψηλό δυναμικό μεταφοράς των εκχυλίσιμων στερεών στο διαλύτη που οφείλεται στην συνεχή επαφή του δείγματος με φρέσκο διαλύτη.
- ✓ Υψηλή θερμοκρασία στην περιοχή που πραγματοποιείται η εκχύλιση, λόγω της παροχής θερμότητας για την επίτευξη του βρασμού του διαλύτη, με συνεπακόλουθη αύξηση της διαλυτότητας των εκχυλιζόμενων συστατικών στο διαλύτη.
- ✓ Δεν απαιτείται διήθηση του τελικού εκχυλίσματος μετά το πέρας της εκχύλισης, καθώς τα στερεά παραμένουν μέσα στην σύριγγα και δεν παρασύρονται με τον διαλύτη.
- ✓ Δυνατότητα εκχύλισης μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος σε σχέση με νεότερες μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης.

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει και μειονεκτήματα, κάποια από τα οποία είναι τα εξής:

- ✓ Μεγάλος χρόνος ολοκλήρωσης της εκχύλισης και μεγάλες ποσότητες διαλύτη γεγονός που συνεπάγεται υψηλό κόστος λειτουργίας αλλά και περιβαλλοντικά προβλήματα κατά την απόρριψη του. Λόγω των μεγάλων όγκων διαλύτη είναι απαραίτητο να ακολουθήσει ένα στάδιο, μετά το πέρας της εκχύλισης, που θα περιλαμβάνει εξάτμιση του διαλύτη για συμπύκνωση των εκχυλισμένων συστατικών.
- ✓ Πιθανή θερμική αποσύνθεση των εκχυλίσιμων συστατικών, ειδικά των θερμοευαίσθητων, λόγω της εκχύλισης των δειγμάτων στο σημείο βρασμού του εκάστοτε διαλύτη.
- ✓ Η συσκευή της συμβατικής μεθόδου Soxhlet δεν δίνει την δυνατότητα ανάδευσης, προσθήκη που θα οδηγούσε σε επιτάχυνση της διαδικασίας της εκχύλισης.
- ✓ Δεν παρέχει την δυνατότητα αυτοματοποίησής της, καθώς βασίζεται στην εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη.

2.2.2. Υδρο-ατμοαπόσταξη

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

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

Ο Boutekedjiret και οι συνεργάτες του (2003) μελέτησαν την εκχύλιση του ελαίου του δεντρολίβανου με υδροαπόσταξη και απόσταξη με ατμό αντίστοιχα. Η απόσταξη με ατμό φαίνεται να είναι η καταλληλότερη μέθοδος, δεδομένου ότι έδωσε καλύτερη απόδοση και μια σύνθεση ελαίου συγκρίσιμη με εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και που αναγνωρίζονται από τα εμπορικά πρότυπα. Η απόδοση αιθέριου ελαίου από την απόσταξη με ατμό ήταν 1,2%, ενώ η απόδοση της υδροαποστάξεως ήταν 0,44%. Με την απόσταξη με ατμό ανακτήθηκε περισσότερο από το 80% του αιθέριου ελαίου σε 10 λεπτά, ενώ για την υδροαποστάξη χρειάστηκαν τουλάχιστον 30 λεπτά για να εξαχθεί το 88% του ελαίου. Συνεπώς, με την απόσταξη του ελαίου με ατμό είναι δυνατή η μείωση του χρόνου εκχύλισης.

2.2.3. Διαβροχή

Η διαβροχή αποτελεί μια ευρέως οικονομική διεργασία για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών και την παραλαβή αιθέριων ελαίων. Για μικρής κλίμακας εκχύλιση, η διαβροχή απαιτεί πολλά στάδια επεξεργασίας του εκχυλίσματος υλικού όπως:

- ✓ Άλεση του φυτού για την επίτευξη μικρότερης κοκκομετρίας, με σκοπό την αύξηση της επιφάνειας επαφής του στερεού με τον διαλύτη για αποτελεσματικότερη ανάμιξη και απόδοση της εκχύλισης.
- ✓ Ανάμιξη του διαλύτη και του αλεσμένου υλικού σε ένα κλειστό δοχείο.
- ✓ Παραμονή του μίγματος για ορισμένο χρονικό διάστημα, στην συνέχεια στράγγιση και εφαρμογή πίεσης στο στερεό υπόλειμμα (marc) για να ανακτηθούν τα βιοδραστικά συστατικά που έχουν εγκλωβιστεί στους πόρους του φυτού.
- ✓ Το στραγγισμένο υγρό και το υγρό που προέκυψε από την εφαρμογή πίεσης αναμειγνύονται και φιλτράρονται για να αφαιρεθούν οι ακαθαρσίες.

2.3. Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού-υγρού

2.3.1. Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE)

Οι υπέρηχοι είναι μηχανικά κύματα υψηλής συχνότητας, που το ανθρώπινο αυτί δεν μπορεί να εντοπίσει και είναι συνήθως πάνω από 20 kHz. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, οι υπέρηχοι ισχύος που επηρεάζουν την χημεία και την επεξεργασία και έχουν συχνότητα από 20-100 kHz και οι διαγνωστικοί υπέρηχοι με πολύ υψηλότερη συχνότητα. Για τη διάδοσή τους χρειάζονται ένα μέσο στο οποίο θα σχηματίσουν πυκνώματα και αραιώματα, μέσω των οποίων θα προκληθεί το φαινόμενο της σπηλαιώσης, σηματοδοτώντας την παραγωγή, την ανάπτυξη και την εκτόνωση φυσαλίδων. Η σπηλαιώση παρατηρείται σε υλικά που περιέχουν υγρά στο εσωτερικό τους ή περιβάλλονται από υγρό μέσο.

Η χρήση υπερήχων κατά την εκχύλιση φυτικών υλικών οδηγεί σε διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων λόγω του φαινομένου της σπηλαιώσης, είσοδο του διαλύτη στη μήτρα, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της μήτρας και παράσυρση των εκχυλιζόμενων συστατικών από την μήτρα, λόγω της αύξησης της επιφάνειας επαφής μεταξύ της υγρής και στερεάς φάσης. Ως αποτέλεσμα, οι διαλυτές ουσίες διαχέονται γρήγορα από τη μήτρα στο διαλύτη με αυξανόμενη ταχύτητα μεταφοράς μάζας, μεταξύ των μεμβρανών. Για την επιτυχή και αποδοτική εκχύλιση εκτός από τα χαρακτηριστικά του συστήματος των υπερήχων όπως η συχνότητα τους, ο χρόνος εφαρμογής τους, η θερμοκρασία και η πίεση συνεισφέρουν και παράγοντες όπως η υγρασία του δείγματος, η κοκκομετρία, ο βαθμός άλεσης, το είδος του διαλύτη (πολικός, μη πολικός, πρωτικός, μη πρωτικός).

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

- ✓ Υψηλή μεταφοράς μάζας των ουσιών και του διαλύτη.
- ✓ Καλύτερη διείσδυση του διαλύτη.
- ✓ Μείωση του χρόνου εκχύλισης, της ενέργειας και της ποσότητας του διαλύτη.

- ✓ Χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης με αποτέλεσμα ομοιόμορφη κατανομή θερμοκρασίας στο μέσο.
- ✓ Η εκχύλιση γίνεται πιο εκλεκτική.

Ο Albu και οι συνεργάτες του (2004) πραγματοποίησαν χρήση υπερήχων, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης του δεντρολίβανου σε καρνοσικό οξύ, χρησιμοποιώντας βουτανόνη, οξικό αιθύλιο και αιθανόλη ως διαλύτες. Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσματα με υπέρηχους σε αποξηραμένα και φρέσκα φύλλα του βοτάνου, στην ίδια θερμοκρασία και τα αποτελέσματα έδειξαν βελτίωση των αποδόσεων του καρνοσικού οξέος και για τους τρεις διαλύτες και μείωση των χρόνων εκχύλισης. Η χρήση υπερήχων, επίσης, μείωσε την επίδραση του διαλύτη έτσι ώστε η αιθανόλη, η οποία είναι ένας φτωχός διαλύτης υπό συμβατικές συνθήκες, έφθασε σε παρόμοιο επίπεδο αποδοτικότητας με τους άλλους δύο διαλύτες.

2.3.2. Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF)

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία χρησιμοποιούνται ως μέθοδος προεπεξεργασίας των φυτικών υλικών, καθώς καθιστούν διαπερατές τις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων, μειώνοντας τις αντιστάσεις στην μεταφορά μάζας. Η επεξεργασία με παλμικά ηλεκτρικά πεδία περιλαμβάνει την επιβολή δυναμικού για την παραγωγή παλμών συνεχούς ρεύματος για μικρά χρονικά διάστημα (μs - ms) σε ένα υλικό που τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια. Η τάση που θα εφαρμοστεί μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων θα δημιουργήσει ηλεκτρικό πεδίο του οποίου η ένταση είναι ανάλογη του μέτρου της εφαρμοζόμενης τάσης και αντιστρόφως ανάλογη της απόστασης των ηλεκτροδίων. Όταν σε ένα αιώρημα από ζωντανά κύτταρα εφαρμοστεί παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, ηλεκτρικό δυναμικό εμφανίζεται στα άκρα της μεμβράνης. Με βάση την διπολική φύση των μορίων της μεμβράνης, τα μόρια χωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους πάνω στην μεμβράνη. Μετά την υπέρβαση μιας κρίσιμης τιμής του διαμεμβρανικού δυναμικού, τα μόρια που έχουν αντίθετα φορτία εγκαταλείπουν την μεμβράνη και δημιουργούνται πόροι (αδύναμα σημεία) πάνω στην μεμβράνη με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαπερατότητα της. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να εφαρμοστεί τάση 100-1000 V/cm για 100-10.000 μs ή τάση 1000-10000 V/cm για χρόνο μικρότερο των 100 μs .

Η αποτελεσματικότητα των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από παραμέτρους του συστήματος, όπως η ένταση του πεδίου που θα εφαρμοστεί, ο αριθμός των παλμών, ο χρόνος εφαρμογής αυτών και η θερμοκρασία. Από 100-1000 V/cm έχουμε αντιστρεπτή μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης, ενώ για τιμές από 500-3000 V/cm η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης είναι μη αντιστρεπτή, με αποτέλεσμα να ενισχύονται οι διεργασίες ξήρανσης, συμπύκνωσης και εκχύλισης, να αυξάνεται η απόδοση της κάθε διεργασίας, να μειώνεται ο χρόνος της διεργασίας και να μειώνεται η κατανάλωση ενέργειας.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, ως στάδιο προκατεργασίας των εκχυλίσμων στερεών πριν τη συμβατική εκχύλιση, είναι τα εξής:

- ✓ Αύξηση της μεταφοράς μάζας με την καταστροφή της δομής της μεμβράνης των φυτικών κυττάρων.
- ✓ Μείωση του απαιτούμενου χρόνου εκχύλισης
- ✓ Ελαχιστοποίηση της υποβάθμισης των θερμοευαίσθητων ουσιών. Ένα μέτριας έντασης ηλεκτρικό δυναμικό (500-1000 V/cm) για 0,0001-0,01 s κατέστρεψε την κυτταρική μεμβράνη ενός φυτικού ιστού με μικρή αύξηση της θερμοκρασίας.
- ✓ Διευκόλυνση της παραλαβής των ενδοκυτταρικών ουσιών από τους φυτικούς ιστούς.

Η Βοζίνου και η ομάδα της (2019) μελέτησαν την πιθανότητα εφαρμογής των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) για την παραγωγή εκχυλισμάτων από το φυτό μορίνγκα (*Moringa oleifera*), στο οποίο έχει προηγηθεί ξήρανση υπό κατάψυξη. Διάφορες συνθήκες PEF δοκιμάστηκαν και συγκεκριμένα η διάρκεια των παλμών PD (10-100 msec) και το διάστημα του παλμού PI (25-100 msec). Εφαρμόστηκε πεδίο έντασης 7 kV/cm. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και από υπερήχους, η απλή εκχύλιση με βραστό νερό και η απλή διαβροχή με νερό (πρότυπο). Η υψηλότερη απόδοση ολικών φαινολικών συστατικών επιτεύχθηκε με την εκχύλιση με χρήση PEF για 40 λεπτά με PD 20 msec και PI 100 msec (40,24 mg GAE/g_{DW}) και η μικρότερη με την απλή διαβροχή με νερό 27,76 mg GAE/g_{DW}. Επιπροσθέτως, η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων βρέθηκε ανάλογη προς το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, οπότε η μεγαλύτερη σημειώθηκε στο ίδιο πείραμα 98,31% και η μικρότερη στο πρότυπο πείραμα 42,94%. Όσον αφορά τη διαδικασία PEF, η χαμηλή διάρκεια παλμών με ένα υψηλό διάστημα παλμών συμβάλλουν στην επίτευξη υψηλότερης αποδοτικότητας εκχύλισης.

2.3.3. Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με εύρος συχνοτήτων από 0,3 μέχρι 300 GHz. Χάρη στην ηλεκτρομαγνητική τους φύση, τα μικροκύματα διαθέτουν ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο κάθετα μεταξύ τους. Η αρχή της θέρμανσης με μικροκύματα βασίζεται στην άμεση επίδραση τους με τα πολικά συστατικά και πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα μέσω δύο μηχανισμών:

- ✓ Της ιοντικής επαγωγής (ionic conduction mechanism). Η παραγωγή της θερμότητας συμβαίνει λόγω της αντίστασης του μέσου (στην προκειμένη περίπτωση ο διαλύτης της εκχύλισης) στην ροή των ιόντων.

- ✓ Της διπολικής περιστροφής (dipole rotation mechanism). Τα ιόντα ακολουθούν την κατεύθυνση του πεδίου, το οποίο αλλάζει συνεχώς, με αποτέλεσμα αυτή η συχνή αλλαγή κατεύθυνσης να οδηγεί στην σύγκρουση μεταξύ των μορίων, φαινόμενο το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή θερμότητας.

Κατά την εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται διαχωρισμός των διαλυτών συστατικών από τα ενεργά κέντρα της μήτρας του φυτού, ως αποτέλεσμα της υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, διάχυση του διαλύτη σε όλη την επιφάνεια της φυτικής μήτρας, αλληλεπίδραση και παραλαβή των συστατικών από τον διαλύτη και μεταφορά τους στον κύριο όγκο του.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με μικροκύματα συνοψίζονται ως εξής :

- ✓ Ταχύτερη θέρμανση του διαλύτη, με αποτέλεσμα την αύξηση της διεισδυτικότητας του διαλύτη στην μήτρα και την αποδοτικότερη παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών από τους φυτικούς ιστούς.
- ✓ Μειωμένες βαθμίδες θερμοκρασίας με αποτέλεσμα ομοιόμορφη κατανομή θερμοκρασίας στο μέσο.
- ✓ Μειωμένο μέγεθος εξοπλισμού και αυξημένη απόδοση εκχύλισης.
- ✓ Χρήσιμη κατά την εκχύλιση θερμοευαίσθητων ουσιών.

Ο Rodríguez-Rojo και οι συνεργάτες του (2012) μελέτησαν την εκχύλιση αντιοξειδωτικών από δενδρολίβανο με αιθανόλη και νερό ως διαλύτες και την επίδραση της χρήσης διαφορετικών διεργασιών εκχύλισης (συμβατική εκχύλιση με διαλύτη, εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα MAE και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους USAE) και προκατεργασίας του φυτού (απελαιωμένο και αλεσμένο, απελαιωμένο και μη αλεσμένο, φρέσκο). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προεπεξεργασία του φυτού, η απομάκρυνση των ελαίων με εκχύλιση μικροκυμάτων χωρίς διαλύτες (SFME, 3000 J/g) και η άλεση είναι απαραίτητη για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης χρησιμοποιώντας νερό και αιθανόλη ως διαλύτες. Η εκχύλιση αιθανόλης μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) και υπερήχους (USAE) με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας (300 J/g) και σύντομη χρονική διάρκεια (7 λεπτά). Η προτεινόμενη διεργασία, αφού έχει προηγηθεί απελαίωση του δεντρολίβανου χωρίς διαλύτη και άλεση του ακολουθούμενη από μια συμβατική εκχύλιση με διαλύτη (νερό ή αιθανόλη), παρέχει ένα εκχύλισμα δενδρολίβανου με ίσο ή υψηλότερο περιεχόμενο αντιοξειδωτικού από τις υπόλοιπες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, με μια ποσότητα ροσμαρινικού οξέος μεταξύ 50-140 mg/g_{DW}, περιεκτικότητα σε καρνοσικό οξύ, στα αιθανολικά εκχυλίσματα, περίπου 80 mg/g_{DW} και συνολική φαινολική περιεκτικότητα μεταξύ 110-180 mg GAE/g_{DW}. Η προτεινόμενη διαδικασία λαμβάνει μικρούς χρόνους, κάτω από 15 λεπτά και δείχνει μεγαλύτερη αποδοτικότητα στη χρήση της ενέργειας σε σύγκριση με παρόμοιες διεργασίες.

2.3.4. Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (PLE)

Κατά την εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό, χρησιμοποιούνται οι ίδιοι διαλύτες με αυτούς των συμβατικών τεχνικών ανάλυσης, αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες και πιέσεις. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται κυρίως στην εκχύλιση συμπιεσμένου υγρού είναι το νερό, η μεθανόλη, η ακετόνη και το εξάνιο σε ένα εύρος θερμοκρασιών 75-150°C και πίεση 10,4 MPa.

Η αρχή της εκχύλισης με συμπιεσμένο υγρό είναι η εφαρμογή υψηλής πίεσης, έτσι ώστε να παραμείνει ο διαλύτης σε υγρή κατάσταση όταν η θερμοκρασία του υπερβεί το κανονικό σημείο βρασμού του. Η άσκηση πίεσης συντελλεί στην αύξηση της επαφής μεταξύ του υγρού εκχύλισης και του δείγματος, ενώ η υψηλή θερμοκρασία οδηγεί στο σπάσιμο των δεσμών των φαινολικών συστατικών με τη μήτρα, στην οποία είναι προσδεμένα. Ο ζεστός διαλύτης προκαλεί μετουσίωση των λιποπρωτεϊνών του κυττάρου με την επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Ο όγκος του διαλύτη που διεισδύει στα κύτταρα αυξάνεται με τη θέρμανσή του, δημιουργεί αυξημένη εσωτερική πίεση στο κύτταρο και ωθεί τα διαλυμένα συστατικά στο εξωτερικό του κυττάρου μέσω των πόρων του κυτταρικού τοιχώματος.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με συμπιεσμένο υγρό συνοψίζονται ως εξής :

- ✓ Αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών στο διαλύτη.
- ✓ Αύξηση του ρυθμού μεταφοράς των ουσιών και του διαλύτη.
- ✓ Μείωση του ιξώδους του διαλύτη.
- ✓ Μείωση της επιφανειακής τάσης του διαλύτη.
- ✓ Αύξηση του ρυθμού εκχύλισης των συστατικών.

Ο Herrero και η ομάδα του (2010) μελέτησαν την εκχύλιση του δεντρολίβανου με συμπιεσμένο υγρό και σύγκριναν τα αποτελέσματα της με την εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (CO₂). Τα πειράματα των εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκαν υπό διάφορες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των θερμοκρασιών, των χρόνων και των πιέσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκχύλιση PLE, που χρησιμοποιεί αιθανόλη ως διαλύτη, σε υψηλές θερμοκρασίες (200°C) ήταν σε θέση να παράγει εκχυλίσματα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση (EC₅₀=8,8 g/ml), υψηλή απόδοση φαινολικών (περίπου 40%), καθώς και υψηλή απόδοση σε καρνοσικό και ροσμαρινικό οξύ, τα οποία και αποτελούν τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά του δεντρολίβανου.

2.3.5. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)

Κάθε ουσία βρίσκεται σε μία από τις τρεις καταστάσεις της ύλης: στερεή, υγρή ή αέρια. Η υπερκρίσιμη κατάσταση είναι μία ιδιαίτερη κατάσταση και μπορεί να προσεγγιστεί όταν η θερμοκρασία και η πίεση μίας ουσίας υπερβούν το κρίσιμο σημείο, δηλαδή την κρίσιμη θερμοκρασία και την κρίσιμη πίεση που είναι χαρακτηριστικές ιδιότητες κάθε ουσίας. Το υπερκρίσιμο ρευστό είναι βαρύ σαν υγρό, αλλά έχει την διεισδυτική ικανότητα ενός αερίου, ιδιότητες που το καθιστούν έναν αποτελεσματικό διαλύτη για την εκχύλιση συστατικών από φυτά και βιολογικά δείγματα. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπερκρίσιμο ρευστό είναι το CO₂, το οποίο είναι χημικά αδρανές, έχει χαμηλή τοξικότητα, είναι φιλικό προς το περιβάλλον και απαιτείται μικρός χρόνος για τη συμπύκνωσή του. Η κρίσιμη θερμοκρασία για το CO₂ είναι 31°C και η κρίσιμη πίεση 74 bar. Έτσι με εφαρμογή πιέσεων σε ένα εύρος 100-450 bar και μία θερμοκρασία λίγο μεγαλύτερη της θερμοκρασίας δωματίου το διοξείδιο του άνθρακα συμπεριφέρεται ως υπερκρίσιμο ρευστό. Τα συστήματα υπερκρίσιμης εκχύλισης με CO₂ ακολουθούν τα εξής στάδια:

- ✓ Υγρό CO₂ μετατρέπεται σε υπερκρίσιμη μορφή με κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας και της πίεσης του.
- ✓ Το υπερκρίσιμο CO₂ εκχυλίζει λιπόφιλα και πτητικά συστατικά.
- ✓ Αέριο CO₂ επιστρέφει στη δεξαμενή CO₂. Στην συνέχεια, νέα εκχύλιση ξεκινάει ανακυκλώνοντας το CO₂.

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

Ένα σημαντικό μειονέκτημα του διοξειδίου του άνθρακα στην εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό είναι η χαμηλή του πολικότητα. Αυτή η παράμετρος του επιτρέπει να εκχυλίζει άπολα συστατικά, όπως τα λιπίδια, ενώ τα πολικά συστατικά, που ανάμεσα σε αυτά βρίσκονται οι φαινολικές ουσίες, δεν μπορούν να εκχυλιστούν. Το εμπόδιο αυτό ξεπεράστηκε με την προσθήκη οργανικών διαλυτών που αυξάνουν την πολικότητα.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό είναι τα εξής :

- ✓ Μείωση του χρόνου εκχύλισης, καθώς τα υπερκρίσιμα ρευστά αυξάνουν τη διαπερατότητα της μήτρας του δείγματος και ενισχύουν τη μεταφορά μάζας.
- ✓ Πλήρης εκχύλιση των ουσιών του στερεού, μέσω της συνεχούς ανακύκλωσης του υπερκρίσιμου ρευστού και της έναρξης νέου κύκλου εκχύλισης.
- ✓ Υψηλή εκλεκτικότητα του υπερκρίσιμου ρευστού, αφού η ικανότητα διαλυτοποίησης του μπορεί να καθοριστεί τροποποιώντας την πίεση και τη θερμοκρασία.
- ✓ Αποτελεί ιδανική μέθοδο για θερμοευαίσθητα συστατικά, καθώς η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ✓ Εύκολος διαχωρισμός της διαλυμένης ουσίας και του μέσου διαλυτοποίησης μέσω της συμπίεσης του υπερκρίσιμου ρευστού.
- ✓ Απαιτεί μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη, συνεπώς αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο εκχύλισης.

Ο Carvalho και οι συνεργάτες του (2005) μελέτησαν την χημική σύνθεση του δεντρολίβανου και προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του, όπως αυτά προέκυψαν από υδροαπόσταξη, συμβατική εκχύλιση με αιθανόλη, συμβατική εκχύλιση με εξάνιο και εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό CO₂ σε θερμοκρασίες 30 και 40°C και σε πιέσεις 100 και 300 bar για την κάθε θερμοκρασία αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη ολική απόδοση (5% σε ξηρή βάση) σημειώθηκε κατά την εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό σε θερμοκρασία 40°C και πίεση 300 bar. Οι κύριες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα ήταν καμφορά και 1,8-κινεόλη. Η αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 80%, για το εκχύλισμα που λαμβάνεται σε πίεση 150 bar και θερμοκρασία 30°C, έως 95%, για το εκχύλισμα που λαμβάνεται σε πίεση 300 bar και θερμοκρασία 40°C. Η περιεκτικότητα του καρνοσικού οξέος ήταν εννέα φορές μεγαλύτερη για το εκχύλισμα που ελήφθη σε πίεση 300 bar και θερμοκρασία 40°C σε σύγκριση με το πτητικό έλαιο που προέκυψε από την υδροαπόσταξη.

2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών

2.4.1. Τύπος διαλύτη

Ο διαλύτης που θα επιλεγεί πρέπει να είναι ασφαλής, δηλαδή να έχει χαμηλή τοξικότητα και να μην είναι εύφλεκτος, να έχει χαμηλό κόστος, γρήγορη μεταφορά μάζας, χαμηλό σημείο βρασμού για καλύτερο διαχωρισμό από τις εκχυλιζόμενες ουσίες, να έχει χαμηλή τιμή δείκτη ιξώδους για εύκολη πρόσβαση στη φυτική μήτρα, να μην σχηματίζονται ή εκχυλίζονται σε αυτόν μη επιθυμητά συστατικά και τέλος να μπορεί να διαλύει τα επιθυμητά συστατικά. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από από την επιθυμητή προς εκχύλιση ουσία. Συγκεκριμένα, για την εκχύλιση πολικών συστατικών ενδείκνυνται πολικοί διαλύτες και αντίστοιχα για την εκχύλιση μη πολικών συστατικών μη πολικοί διαλύτες. Η αποδοτικότητα, επομένως, ενός διαλύτη εξαρτάται, κυρίως από την ικανότητα του να διαλυτοποιεί το επιθυμητό φαινολικό συστατικό. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για την εκχύλιση πολυφαινολών από αρωματικά φυτά είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη και τα μίγματα τους με το νερό. Η προσθήκη νερού σε έναν οργανικό διαλύτη προκαλεί διόγκωση του φυτικού υλικού οδηγώντας σε εύκολη είσοδο του διαλύτη στο φυτικό υλικό, με αποτέλεσμα την αύξηση της εκχυλισιμότητας. Επίσης, αυξάνει την πολικότητα του μέσου διευκολύνοντας την εκχύλιση των πολυφαινολών. Άλλοι διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε

εκχυλίσαις αλλά παρουσιάζουν χαμηλότερες αποδόσεις είναι η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας και μίγματα διαλυτών.

Ο Diem και η ομάδα του (2013) παρατήρησαν αύξηση της απόδοσης στο εκχύλισμα της λιμνοφύλης χρησιμοποιώντας διαφορετικές αναλογίες και συνδυασμούς μιγμάτων οργανικών διαλυτών με υδατικούς διαλύτες σε σχέση με τους αντίστοιχους καθαρούς οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη και ακετόνη). Ωστόσο, αυξάνοντας την περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό στο 50% παρατηρήθηκε μείωση του φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης. Σε σχετική μελέτη των Anwar και Przybylski (2012) για το λινάρι, η μεθανόλη 80% έδωσε την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης, αλλά το εκχύλισμα δεν εμφάνισε την υψηλότερη ποσότητα φαινολικών και φλαβονοειδών.

Για την μελέτη της επίδρασης του διαλύτη στην εκχύλιση δεντρολίβανου με διαβροχή, ο Kasparanivičienė και οι συνεργάτες του (2013) χρησιμοποίησαν αιθανολικά μίγματα με διαφορετικές περιεκτικότητες σε αιθανόλη (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 και 96%). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο διαλύτης με περιεκτικότητα 50% σε αιθανόλη εμφάνισε το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο και (49 mg/ml RAE) και το μέγιστο στερεό υπόλειμμα (2,2%), ενώ η αντιοξειδωτική δράση ήταν υψηλή σε όλα τα αιθανολικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου (72-85% απενεργοποίηση DPPH), με το εκχύλισμα με περιεκτικότητα 90% σε αιθανόλη να πετυχαίνει την μεγαλύτερη.

Ο Justine και η ομάδα του (2019) μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών διαλυτών στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού *Scurrula ferruginea*. Κατά την συμβατική εκχύλιση τους χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες όπως μίγματα με νερό περιεκτικότητας 80% μεθανόλη και 80% ακετόνη, καθώς και βενζόλιο και νερό (σε αναλογία 1:10 w/v). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες προέκυψαν με την εκχύλιση με διαλύτη 80% ακετόνη, συγκεκριμένα μέγιστη απόσοδη εκχυλίσματος 3,47 mg/10 g_{DW}, μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο 171,29 mg PAE/g_{DW}, μέγιστη απόδοση σε φλαβονοειδή 31,91 mg QE/g_{DW} και μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα 93,2%.

2.4.2. Λόγος υγρού-στερεού

Ο λόγος υγρού-στερεού αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα που έχει μελετηθεί για την αριστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης. Ο όγκος του διαλύτη πρέπει να είναι επαρκής, ώστε η στερεά μήτρα να είναι βυθισμένη μέσα σε αυτόν. Η αύξηση του λόγου του διαλύτη προς το φυτικό υλικό οδηγεί σε αποτελεσματικότερη διάλυση των επιθυμητών βιοδραστικών ενώσεων, οπότε και σε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Οι μεγάλοι όγκοι διαλύτη μπορούν να κάνουν τη διεργασία δύσκολη και να οδηγήσουν σε αχρείαστα απόβλητα, ενώ μικροί όγκοι μπορεί να οδηγήσουν σε μη ολοκληρωμένη εκχύλιση.

Σε υψηλές αναλογίες υγρού προς στερεό, θεωρείται ότι υπάρχει μεγαλύτερη βαθμίδα συγκέντρωσης μεταξύ των φαινολικών που είναι παγιδευμένα μέσα στα σωματίδια των φύλλων και εκείνων που βρίσκονται στην επιφάνεια, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της κινητικής της εκχύλισης (Gertenbach, 2001).

Ο Vuong και η ομάδα του (2014) μελέτησαν την επίδραση του λόγου διαλύτη προς στερεό, κατά την εκχύλιση φύλλων παπάγιας, στην απόδοση των φαινολικών ενώσεων και στην αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση τόσο στην απόδοση των φαινολικών όσο στην αντιοξειδωτική δράση με την αύξηση της μάζας των φύλλων ανά 100mL διαλύτη. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη αναλογία υγρού-στερεού, κατά την εκχύλιση φύλλων παπάγιας, βρέθηκε ίση με 100:7,5 ml/g, με την οποία ήταν δυνατή η εκχύλιση φαινολικών συστατικών σε ποσοστό 80% και η εξοικονόμηση κατά 7,5 φορές του όγκου του νερού με αποτέλεσμα λιγότερη απαιτούμενη ενέργεια για την διεξαγωγή της εκχύλισης. Μία χαμηλότερη αναλογία υγρού προς στερεό μπορεί να είχε σαν αποτέλεσμα μεγάλη απώλεια φαινολικών συστατικών και δυσκολίες κατά τον διαχωρισμό των φύλλων από το εκχύλισμα.

2.4.3. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στην εκχύλιση των ουσιών. Οι υψηλές θερμοκρασίες καθιστούν τα κυτταρικά τοιχώματα διαπερατά με αποτέλεσμα την αύξηση της αποδοτικότητας της εκχύλισης, της διαλυτότητας και της διάχυσης των επιθυμητών προς εκχύλιση φαινολικών συστατικών, των ρυθμών μεταφοράς μάζας στους φυτικούς ιστούς αλλά και στην μείωση του ιξώδους του διαλύτη, καθιστώντας τον ικανό να διεισδύσει ευκολότερα στο στερεό υπόστρωμα και να παραλάβει τις εκχυλιζόμενες ουσίες. Όσοσο, οι υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσουν σε υποβάθμιση των φαινολικών συστατικών.

Ο Vuong και οι συνεργάτες του (2014) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην τελική απόδοση φαινολικών και στην αντιοξειδωτική ικανότητα φύλλων παπάγιας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας από 50 σε 70°C, αλλά μειώθηκε με την αύξηση της στους 100°C, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε θερμικά επαγόμενη αποσύνθεση. Συνεπώς, η υψηλότερη απόδοση σε φαινολικά (28,61mg GAE/g_{DW}) και η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση σημειώθηκε κατά την εκχύλιση των φύλλων παπάγιας σε θερμοκρασία 70°C. Προηγούμενες μελέτες για την εκχύλιση πολυφαινολών από πηγές όπως το πράσινο τσάι (Vuong et al., 2011), τα υπολείμματα σταφυλιών (Pinelo et al., 2005), τα φιστίκια (Ballard et al., 2009) και οι ελιές (Alu'datt et al., 2011) έχουν φανερώσει σημαντική εξάρτηση της εκχύλισης από την θερμοκρασία. Ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες τυπικά αυξάνουν τις ταχύτητες μεταφοράς της μάζας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, στην περίπτωση των πολυφαινολών, προκαλούν επίσης και ανταγωνιστικές διαδικασίες όπως αποσύνθεση και επιμερισμό (Gertenbach, 2001).

Ο M.B. Hossain και η ομάδα του (2010) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας και της σύστασης της μεθανόλης στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος δεντρολίβανου και στην ανάκτηση των φαινολών εφαρμόζοντας επιταχυνόμενη εκχύλιση. Η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν οι 129°C. Ωστόσο, κάθε μεμονωμένο συστατικό παρουσίαζε διαφορετική συμπεριφορά στην αύξηση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, με την αύξηση της θερμοκρασίας μειωνόταν το ροσμαρινικό οξύ, η λουτεολίνη και η απιγενίνη ενώ αυξανόταν το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και οι μελανοϊδίνες. Το ροσμαρινικό οξύ όμως διασπάστηκε σε καφεϊκό το οποίο συνέδραμε στην αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η τιμή του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλη έμειναν σταθερά με την αυξομείωση της θερμοκρασίας. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η θερμοκρασία είναι ο κύριος παράγοντας ρύθμισης της απόδοσης της εκχύλισης σε φαινολικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εφόσον ρυθμίζει την διαλυτότητα και τον ρυθμό διάχυσης των ουσιών. Επιπλέον, η παράλληλη εφαρμογή υψηλής πίεσης (1500 psi) κατά τη διάρκεια της εκχύλισης περιορίσε των υποβάθμιση των ουσιών εξαιτίας της θερμότητας λόγω της ιδιότητας της υψηλής πίεσης να ενισχύει την σταθερότητα των ομοιοπολικών δεσμών.

2.4.4. pH

Το pH του μέσου εκχύλισης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την απόδοση της εκχύλισης και της ανάκτησης του συνόλου των φαινολικών συστατικών, καθώς ανάλογα με το αν είναι όξινο, ουδέτερο ή αλκαλικό διαλύονται και διαφορετικές κατηγορίες μεταβολιτών και αν τροποποιηθεί μπορεί να αυξήσει την εκλετικότητα συγκεκριμένων συστατικών. Ήπια αλκαλική υδρόλυση διασπά τους εστερικούς δεσμούς απελευθερώνοντας τα δεσμευμένα με εστερικούς δεσμούς φαινολικά συστατικά, ενώ η όξινη υδρόλυση διασπά τους αλκυλο-αρυλο-αιθερικούς δεσμούς απελευθερώνοντας τα δεσμευμένα με αιθερικούς δεσμούς φαινολικά συστατικά (Krygier et al., 1928).

Ο Chethan και η ομάδα του (2007) μελέτησαν την επίδραση του pH του μέσου εκχύλισης, σε κεχρί του γένους Ελευσύνης, στο ολικό φαινολικό περιέχομενο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εκχύλιση του φυτού με διαλύτη 1% HCl σε μεθανόλη εμφάνισε την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών με την αύξηση του pH προς την αλκαλικότητα.

Ο Arabshahi-Delouee και οι συνεργάτες του (2007) μελέτησαν την επίδραση του pH του μέσου εκχύλισης στην αντιοξειδωτική ικανότητα σε μούρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε ουδέτερο pH, τα εκχυλίσματα εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία και μειωνόταν όταν το pH γινόταν αλκαλικό. Η μείωση της δραστηριότητας σε αλκαλικό pH μπορεί να σχετίζεται είτε με την απώλεια αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του εκχυλίσματος είτε με την ενίσχυση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Ο Liu (1970) ανέφερε ότι η καταλυόμενη από αιμοπρωτεΐνη οξείδωση είναι περισσότερο δραστική σε αλκαλικό pH. Οι Mansour και Khalil (2000) διαπίστωσαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των σπόρων

τριγωνέλλας και τζίντζερ μειώνεται αυξάνοντας το pH των μέσων εκχύλισης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των διαφόρων εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα κακάου είναι υψηλότερη σε αλκαλικό pH (Azizah, Nik Ruslawati, SweeTee, 1999).

Ο Librán και η ομάδα του (2013) αναζήτησαν την βέλτιστη τιμή pH και της περιεκτικότητας του διαλύτη σε αιθανόλη για την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από απόβλητα σταφυλιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της απόδοσης σε φαινολικά σε ουδέτερο pH, κατά τις εκχυλίσεις με διαλύτες μίγματα αιθανόλης-νερού περιεκτικότητας 0% και 25% σε αιθανόλη. Στις εκχυλίσεις με διαλύτες υδατικά μίγματα με υψηλότερες περιεκτικότητες αιθανόλης, το όξινο pH σημείωσε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά.

2.4.5. Μέθοδος συντήρησης

Σύμφωνα με τον Mulinacci και τους συνεργάτες του (2011), η απόδοση της εκχύλισης του δεντρολίβανου επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από την μέθοδο συντήρησής του. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την επίδραση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου σε δείγματα φρέσκου δεντρολίβανου, δεντρολίβανου διατηρημένου στο ψυγείο για έξι μήνες, δεντρολίβανου αποξηραμένου σε θερμοκρασία δωματίου και δεντρολίβανου αποξηραμένου με ξήρανση υπό κατάψυξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καταλληλότερη μέθοδος συντήρησης του δεντρολίβανου είναι η ξήρανση υπό κατάψυξη. Το δείγμα του δεντρολίβανου που είχε διατηρηθεί στο ψυγείο υπέστη ενζυμικό μαύρισμα και έδειξε σημαντική μείωση του ροσμαρινικού οξέος μεταξύ 65% και 80%. Μετά από ψύξη, παρατηρήθηκε μία μείωση 1,5% στο φαινολικό περιεχόμενο. Ταυτόχρονα, στο ίδιο δείγμα παρατηρήθηκε μείωση της συνολικής περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή σε 11,5%. Το αποξηραμένο, σε θερμοκρασία δωματίου, δεντρολίβανο και το δεντρολίβανο που ξηράνθηκε υπό κατάψυξη έδειξαν, επίσης, σημαντική μείωση της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή κοντά στο 34% και 53% αντίστοιχα. Τα ολικά φαινολικά διτερπένια δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων ξήρανσης. Το φρέσκο δεντρολίβανο έχει 60% υγρασία. Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα που περιείχαν νερό ήταν πολύ πιο ευαίσθητα στην οξείδωση του καρνοσικού οξέος και στην μετατροπή του σε καρνοσόλη και υπολογίστηκε για όλα τα κλάσματα του δεντρολίβανου ο λόγος καρνοσικό οξύ (CA)/καρνοσόλη (COH). Έτσι, το φρέσκο δεντρολίβανο είχε τις μικρότερες ποσότητες καρνοσικού οξέος (CA/COH=0,6-1,8) ενώ στα αποξηραμένα (CA/COH=4,9-8,4).

Ο Justine και η ομάδα του (2019) μελέτησαν, επίσης, την επίδραση διαφορετικών μεθόδων ξήρανσης στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού *Scurrula ferruginea*. Στα φύλλα του *S. ferruginea* πραγματοποιήθηκε ξήρανση με αέρα και ξήρανση σε φούρνο (60 ° C) και μετέπειτα εκχύλιση με διαλύτες, όπως μίγματα με νερό περιεκτικότητας διαλύτες 80% μεθανόλη και 80% ακετόνη, καθώς και βενζόλιο και νερό (σε αναλογία 1:10 w/v). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες προέκυψαν με την εκχύλιση με διαλύτη 80% ακετόνη σε φύλλα του φυτού που είχαν ξηραθεί σε φούρνο. Το

γεγονός αυτό φανερώνει την σημαντικότητα της προετοιμασίας του δείγματος με τη χρήση κατάλληλης μεθόδου ξήρανσης, καθώς διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής δράσης των τελικών εκχυλισμάτων. Σε παρόμοιες μελέτες, αρκετοί ερευνητές έδειξαν ότι η ξήρανση σε φούρνο (40 έως 80°C) των φυτών αποδίδει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Anwar et al., 2013, Bernard et al., 2014, Ngoc et al., 2015, Rodriguez et al., 2016).

Ο Zhang και οι συνεργάτες του (2009) παρατήρησαν διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων του φυτικού ιστού με θερμική ξήρανση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των φαινολικών συστατικών στο μέσο του διαλύτη. Επίσης, απέδειξαν ότι η θερμική ξήρανση οδήγησε σε περιορισμό ή ακόμα και σε αδρανοποίηση της οξείδωσης των πολυφαινολών, προστατεύοντας έτσι τις φαινολικές ουσίες από πιθανή αποικοδόμηση.

3. Μαθηματική μοντελοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης

Η μαθηματική μοντελοποίηση των διεργασιών εκχύλισης στερεού-υγρού αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο μηχανικής, κατά την διαδικασία σχεδιασμού, με απότερο σκοπό την μείωση κατανάλωσης ενέργειας, χρόνου και χημικών αντιδραστηρίων. Δίνει την δυνατότητα καλύτερης κατανόησης των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της εκχύλισης (σύνθετη διάχυση και μεταφορά μάζας), καθώς και των θερμοδυναμικών παραμέτρων που επηρεάζουν την διαδικασία της εκχύλισης. Συνεπώς, η μαθηματική μοντελοποίηση καθιστάται αναγκαία για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών μιας τυπικής διαδικασίας εκχύλισης στερεού-υγρού. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα κύρια κινητικά μοντέλα, μέσω των οποίων υπολογίζονται οι συντελεστές διάχυσης, οι ρυθμοί εκχύλισης και οι θερμοδυναμικές παράμετροι της διαδικασίας της εκχύλισης.

3.1. Μοντέλο μεταφοράς μάζας

Η διαδικασία της εκχύλισης στερεού-υγρού θεωρείται ότι πραγματοποιείται υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

- ✓ Το διασκορπισμένο στερεό υλικό είναι ένα σύνολο σφαιρικών σωματιδίων ίδιου μεγέθους.
- ✓ Τα σωματίδια του στερεού είναι συμμετρικά και πορώδη.
- ✓ Η διάχυση της διαλυμένης ουσίας και των άλλων ενώσεων διεξάγεται παράλληλα χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους.
- ✓ Η διάχυση της διαλυμένης ουσίας είναι σταθερή.
- ✓ Τα δραστικά συστατικά, αρχικά, περιέχονται ομοιογενώς στο στερεό.
- ✓ Τα εκχυλισμένα φαινορικά συστατικά θεωρούνται ως μεμονωμένες ενώσεις, ισοδύναμες του γαλλικού οξέος.
- ✓ Η περιεκτικότητα των δραστικών συστατικών στο στερεό ποικίλει με τον χρόνο.

Η εκχύλιση γίνεται σε δύο βήματα. Πρώτον, ο διαλύτης διεισδύει στο στερεό για να διαλύσει το εκχυλίσιμο υλικό και κατόπιν το εκχυλίσιμο υλικό διαχέεται από το εσωτερικό του στερεού στο υγρό. Το στάδιο καθορισμού του ρυθμού της συνολικής διαδικασίας είναι η διάχυση.

Η εκχύλιση μιας διαλυμένης ουσίας από σφαιρικά σωματίδια, θεωρώντας ότι η εσωτερική διάχυση είναι σταθερή και ότι η διαδικασία υπακούει στο δεύτερο νόμο του Fick, λαμβάνεται από την σχέση:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(-D\nabla C) \quad (1),$$

όπου t ο χρόνος εκχύλισης. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη σφαιρική γεωμετρία των σωματιδίων με ακτίνα r , οι αντίστοιχες αρχικές και οριακές συνθήκες μπορούν να γραφτούν ως εξής:

$$\checkmark \quad t=0, \quad C=C_0 \quad \forall r \quad (2)$$

$$\checkmark \quad t>0, \quad C=C_i=0 \quad r=R \quad (3)$$

$$\checkmark \quad t>0, \quad \frac{\partial C}{\partial r}=0 \quad r=0 \quad (4)$$

όπου C_0 η αρχική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο σωματίδιο του δείγματος και C_i η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στη διεπιφάνεια του σωματιδίου του δείγματος.

Με την παραδοχή της αμελητέας εξωτερικής αντίστασης μεταφοράς μαζών, η εξίσωση που δίνει την ανηγμένη διαφορά συγκέντρωσης για τη σφαιρική γεωμετρία του δείγματος είναι:

$$\frac{C-C_0}{C_i-C_0} = 1 + \left[\frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin \frac{\pi n r}{R} \exp \left\{ -\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2} \right\} \right] \quad (5)$$

Η μάζα της διαλυμένης ουσίας που μεταφέρεται από το σωματίδιο του δείγματος σε κάθε χρόνο (M) μπορεί να υπολογιστεί με την ολοκλήρωση της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας στην ακτίνα των σωματιδίων στην εξίσωση (5), οπότε λαμβάνεται η ακόλουθη εξίσωση:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left\{ -\frac{Dn^2\pi^2 t}{R^2} \right\} \quad (6)$$

όπου M_{∞} είναι η συνολική ποσότητα της διαλυμένης ουσίας που μεταφέρεται μετά από άπειρο χρόνο. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα ή συνήθως μετά το στάδιο πλύσης, μόνο ο πρώτος όρος της σειράς παραμένει σημαντικός. Η εξίσωση (6) μπορεί να απλοποιηθεί στην ακόλουθη μορφή:

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - Ae^{-Bt} \quad (7)$$

όπου A είναι η σταθερά του μοντέλου και B εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης. Θεωρητικά, $B = \alpha^2 D / r^2$ για σφαιρικά σωματίδια. Η έκφραση της εξίσωσης (7) μπορεί να τροποποιηθεί περαιτέρω, με βάση το μη εκχυλισμένο κλάσμα της διαλυμένης ουσίας στα σωματίδια του δείγματος, στην εξής σχέση:

$$E = 1 - \frac{M}{M_\infty} = Ae^{-Bt} \quad (8)$$

$$\ln E = \ln A - Bt \quad (9)$$

Εναλλακτικά, η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στον διαλύτη εκχύλισης σε κάθε χρονική στιγμή μπορεί να εκφραστεί λαμβάνοντας υπόψη μόνο τον πρώτο όρο της εξίσωσης (6), δηλαδή για $n=1$, στην απλούστερη μορφή που παρουσιάζεται ως εξής:

$$\ln\left(\frac{C_\infty}{C_\infty - C}\right) = 0,498 + \frac{9,78D}{R^2} t \quad (10)$$

όπου C_∞ η συγκέντρωση της εκχυλισμένης ουσίας στον διαλύτη σε άπειρο χρόνο (Spiro, 1990).

Αυτή η εξίσωση μπορεί να ξαναγραφεί ως εξής:

$$\ln\left(\frac{C_\infty}{C_\infty - C}\right) = a + K_{\text{obs}} t \quad (11), \quad K_{\text{obs}} = \frac{9,78D}{R^2}$$

3.2. Λογαριθμικό μοντέλο

Για την μελέτη της κινητικής της εκχύλισης έχει προτεθεί, επιπλέον, το ακόλουθο λογαριθμικό μοντέλο:

$$C(t) = a \cdot \log t + b \quad (12)$$

όπου a και b οι σταθερές του λογαριθμικού μοντέλου και C(t) η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε κάθε χρονική στιγμή t (Jurinjak Tusek et al., 2016).

3.3. Μοντέλο Peleg

Για την περιγραφή της εκχύλισης στερού-υγρού αναπτύχθηκε, επίσης, το μοντέλο του Peleg σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$C(t) = C_o + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (13)$$

Όπου $C(t)$ η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στο διάλυμα σε χρόνο t , εκφρασμένη ως ανάκτηση από το στερεό (mg GAE/ g DW), C_o η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών σε χρόνο μηδέν ($t=0$), K_1 σταθερά ρυθμού (min·g DW/mg GAE) και K_2 σταθερά χωρητικότητας (g DW/mg GAE).

Σε χρόνο $t=0$, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών C_o ισούται με το μηδέν, συνεπώς η εξίσωση (13) γίνεται:

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (14)$$

Η σταθερά ρυθμού του Peleg (K_1) σχετίζεται με τον ρυθμό εκχύλισης (B_o) στην αρχή της ($t=t_0$):

$$B_o = \frac{1}{K_1} \quad (\text{mg GAE/g}_{\text{DW}} \text{ min}) \quad (15)$$

Η σταθερά χωρητικότητας του Peleg (K_2) σχετίζεται με την μέγιστη απόδοση εκχύλισης. Όταν $t \rightarrow \infty$, η παρακάτω εξίσωση παρουσιάζει την σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών (C_e) και της σταθεράς K_2 (Tusek et al.,2016):

$$C_{t \rightarrow \infty} = C_e = \frac{1}{K_2} \quad (\text{mg GAE/g}_{\text{DW}}) \quad (16)$$

Η αντιστοιχία μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και της υπολογισμένης τιμής καθορίστηκε από τον συντελεστή συσχέτισης (R) και τη μέση τετραγωνική απόκλιση ρίζας (RMSD) ως εξής:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{n=1}^{\infty} (\text{experiment} - \text{calculated})^2} \quad (17)$$

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων και των διάφορων μεθόδων εκχύλισης στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών, με απώτερο στόχο την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την βελτιστοποίηση της διαδικασίας της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αλεσμένο δεντρολίβανο μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας, όπως είχε προκύψει από προηγούμενη διπλωματική εργασία (Αλεξανδράκη, 2018), ως κύρια μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η απλή εκχύλιση υπό ανάδευση και ως χρόνος εκχύλισης ορίστηκαν τα 70 min.

Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι η επίδραση του διαλύτη στην απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά. Συγκεκριμένα, ως διαλύτες της εκχύλισης υπό ανάδευση επιλέχθηκαν το νερό, μίγματα αιθανόλης - νερού (80% αιθανόλη - 20% νερό και 60% αιθανόλη - 40 % νερό), αιθανόλη, μίγματα ακετόνης - νερού (80% ακετόνη - 20% νερό, 60% ακετόνη - 40% νερό και 40% ακετόνη - 60% νερό) και ακετόνη. Οι παραπάνω διαλύτες εκχυλίζουν ορισμένα από τα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου, όπως το ροσμαρινικό οξύ, τα φλαβονοειδή, την καρνσόλη, το καρνοσικό οξύ και τα φαινολικά διτερπένια. Στην συνέχεια, λοιπόν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και ποσοτικοποίηση των παραπάνω συστατικών του δεντρολίβανου, για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του εκάστοτε διαλύτη και τέλος προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τελικών εκχυλισμάτων, όπως προέκυψαν από την εκχύλιση του δεντρολίβανου με κάθε διαλύτη.

Η δεύτερη παράμετρος που μελετήθηκε είναι η επίδραση της κοκκομετρίας του δεντρολίβανου στην τελική απόδοση των φαινολικών, αλλά και των επιμέρους συστατικών του δεντρολίβανου. Για τον σκοπό αυτό, με την χρήση ειδικών κοσκίνων, πραγματοποιήθηκε διαίρεση μιας ορισμένης ποσότητας δεντρολίβανου σε 5 επιμέρους κλάσματα (>1000 μm, 1000-800 μm, 800-600 μm, 600-315 μm και <315 μm) και στη συνέχεια εκχύλιση τους υπό ανάδευση με διαλύτη 80% ακετόνη - 20% νερό, λόγω της υψηλής απόδοσής του. Ακολούθησε ανάλυση, ποσοτικοποίηση των επιμέρους συστατικών του δεντρολίβανου και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τελικών εκχυλισμάτων για κάθε κοκκομετρία.

Η τρίτη παράμετρος που μελετήθηκε είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση των φαινολικών. Πραγματοποιήθηκαν, λοιπόν, εκχυλίσεις υπό ανάδευση του δεντρολίβανου σε τρεις θερμοκρασίες (22°C, 40°C και 60°C) και στην συνέχεια ανάλυση HPLC και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τελικών εκχυλισμάτων για κάθε θερμοκρασία αντίστοιχα.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των υπερήχων στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε λουτρό υπερήχων για 50 min με διαλύτες 80% ακετόνη - 20% νερό, 60% ακετόνη - 40% νερό και 60% αιθανόλη - 40% νερό και μετέπειτα ανάλυση HPLC και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τελικών εκχυλισμάτων για κάθε πείραμα και σύγκριση με τα αντίστοιχα πειράματα των εκχυλίσεων υπό ανάδευση.

Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της διαβροχής του δεντρολίβανου πριν την εκχύλισή του. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε διαβροχή ορισμένης ποσότητας δεντρολίβανου με νερό και φύλαξή του σε ψυγείο σε κλειστό δοχείο για τρεις χρόνους αντίστοιχα (2 h, 4 h και 24 h). Στη συνέχεια, προστέθηκε η υπόλοιπη ποσότητα του νερού και της αιθανόλης ώστε ο διαλύτης της εκχύλισης να έχει περιεκτικότητα 60% αιθανόλη - 40% νερό με αναλογία υγρού-στερεού 20:1, για εκχύλιση υπό ανάδευση. Στα τελικά εκχυλίσματα προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με την μέθοδο DPPH.

Τέλος, σε ήδη διαβρεγμένο για 24 h δεντρολίβανο πραγματοποιήθηκε προκατεργασία με χρήση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου και μετέπειτα εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη 60% αιθανόλη - 40% νερό, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της χρήσης PEF στις τελικές αποδόσεις φαινολικών και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος σε σχέση με την απλή εκχύλιση υπό ανάδευση διαβρεγμένου για 24 h και μη διαβρεγμένου δεντρολίβανου.

4.2. Πρώτες ύλες, αντιδραστήρια και συσκευές

4.2.1. Πρώτες ύλες

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας ήταν αλεσμένο δεντρολίβανο, όπως είχε προκύψει από προηγούμενη διπλωματική εργασία (Αλεξανδράκη, 2018). Είχε καλλιεργηθεί στο Κιλκίς από την εταιρία Organic Island και η συγκομιδή του πραγματοποιήθηκε την άνοιξη του 2017.

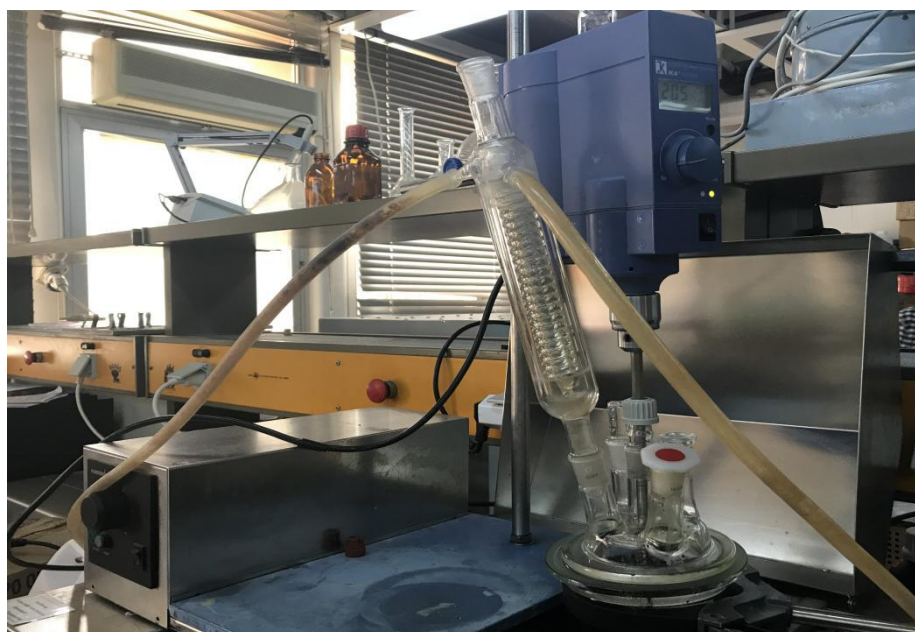
4.2.2. Αντιδραστήρια

Κατά τις εκχυλίσεις του δεντρολίβανου χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες αιθανόλη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και ακετόνη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε χρήση των αντιδραστηρίων Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) και ανθρακικού νατρίου (Mallinckrodt, St.Louis, Missouri) και για την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς τους χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ 98% w/w (Aros Organics, Fair Lawn, New Jersey). Στην συνέχεια, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας

χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα DPPH ή 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και για την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς το ίδιο αντιδραστήριο γαλλικού οξέος που είχε χρησιμοποιηθεί για την καμπύλη αναφοράς των φαινολικών. Τέλος, για τις χρωματογραφικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν νερό, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και τριφθοροξικό οξύ ποιότητας HPLC και βαθμού MS (Fisher Chemical, Leicestershire, UK).

4.2.3. Συσκευές

Για την εκχύλιση υπό ανάδευση του δεντρολίβανου χρησιμοποιήθηκε μια διάταξη που αποτελείται από μια σφαιρική φιάλη, η οποία είναι εμβαπτισμένη σε υδατόλουτρο, έναν αναδευτήρα, ένα ψυκτήρα και μεταλλικά στηρίγματα, όπως απεικονίζονται στην εικόνα 4.1



Εικόνα 4.1. Διάταξη εκχύλισης υπό ανάδευση

Οι χρωματογραφικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC πραγματοποιήθηκαν σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης, ο οποίος αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης HP 1100 και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett-Packard, Waldborn, Germany), συνδεδεμένο με στήλη Hypersil C18 ODS 5 μ m, 250x4,6 mm (Mz. Analysentechnik, Mainz, Germany).

Για τις φασματομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Hitachi U29000.

Για την διαίρεση του δεντρολίβανου σε κλάσματα των επιθυμητών κοκκομετριών, έγινε χρήση μιας σειράς πρότυπων κοσκίνων σε δονητή (Cisa, BA200N, Italy).

Τέλος, η διάταξη για την διεξαγωγή των εκχυλίσεων με υπερήχους περιλαμβάνει μια σφαιρική φιάλη εμβαπτισμένη στο λουτρό υπερήχων (Elmasonic S, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) έναν κάθετο ψυκτήρα, θερμομόμετρο και μεταλλικά στηρίγματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2. Διάταξη εκχύλισης με υπερήχους

4.3. Πειραματικές τεχνικές

4.3.1. Εκχύλιση υπό ανάδευση

Στα πειράματα εκχύλισης υπό ανάδευση τοποθετούνται 5 g δεντρολίβανου σε 100 mL διαλύτη στην σφαιρική φιάλη, με σκοπό την επίτευξη αναλογίας υγρού-στερεού 20:1. Τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (22°C), με εξαίρεση την περίπτωση όπου πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην εκχύλιση. Σε αυτήν την περίπτωση, το λουτρό ρυθμίζεται στην επιθυμητή θερμοκρασία. Σε κάθε εκχύλιση λαμβάνονται δείγματα 1,5 mL σε erpendorf τις χρονικές στιγμές 2, 5, 10, 20, 30, 50 και 70 min και ένα δείγμα από το ολικό εκχύλισμα.

4.3.2. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Για την εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, το δεντρολίβανο παραμένει στο ψυγείο για 24 h με ορισμένη ποσότητα νερού, ώστε να βρίσκεται σε μορφή αιωρήματος. Στην συνέχεια τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια (απόστασης 2 cm) και προστίθεται διαλύτης μέχρι πλήρωσης του υλικού. Στο αιώρημα, λοιπόν, εφαρμόζεται τάση 2,6 kV/cm με την ταυτόχρονη παραγωγή 1000 παλμών για 15 μs. Το αιώρημα που παραλαμβάνεται στην συνέχεια προστίθεται στην σφαιρική φιάλη ώστε να πραγματοποιηθεί εκχύλιση υπό ανάδευση με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύτη για την επίτευξη της επιθυμητής περιεκτικότητας σε αναλογία υγρού-στερεού 20:1.

4.3.3. Εκχύλιση με υπέρηχους

Όμοια με την εκχύλιση υπό ανάδευση, στην σφαιρική φιάλη προστίθενται 5 g δεντρολίβανου σε 100 mL διαλύτη. Πραγματοποιούνται δειγματοληψίες 1,5 mL σε erpedorf τις χρονικές στιγμές 2, 5, 10, 20, 30 και 50 min.

4.4. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.4.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των φαινολικών στα εκχυλίσματα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό περιβάλλον από τα φαινολικά συστατικά προς συμπλέγματα φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος, που οδηγεί στην δημιουργία μπλε συμπλόκων τα οποία και προσδιορίζονται φασματομετρικά στα 765 nm. Η επίτευξη του αλκαλικού περιβάλλοντος επιτυγχάνεται με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου.

Για την παρασκευή κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) προστέθηκαν 200 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 800 mL απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια, το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με την βοήθεια θερμαντικής πλάκας και συνεχή ανάδευση μέχρι πλήρη διαλυτοποίηση του ανθρακικού νατρίου. Μετά την ψύξη του διαλύματος, τοποθετήθηκε σε ψυγείο για 24 h και με τον επιτυχή σχηματισμό κρυστάλλων, πραγματοποιήθηκε διήθηση του με μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη του 1 L, η οποία και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

Για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε προσθήκη 7,9 mL απιονισμένου νερού, 100 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, με τον αντίστοιχο διαλύτη της εκάστοτε εκχύλισης, 500 mL αντιδραστηρίου Folin και 1500 mL κορεσμένου ανθρακικού νατρίου σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες για κάθε δείγμα. Παράλληλα, προετοιμαζόταν και ένα τυφλό δείγμα στο οποίο προστίθονταν 100 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ανάδευση των διαλυμάτων με vortex και επώαση τους στο σκοτάδι για 2 h. Τέλος, πραγματοποιούνταν φωτομέτρηση σε φασματόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm.

Τέλος, για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς με την χρήση γαλλικού οξέος ως φαινολικό υπόστρωμα. Αρχικά, για την παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος, προστέθηκαν 0,1004 g γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και ακολούθησε αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή (stock διάλυμα). Στη συνέχεια, σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, προστέθηκαν 1, 3, 5 και 7 mL από το stock διάλυμα γαλλικού οξέος και ακολούθησε αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Έτσι, προέκυψαν διαλύματα με περιεκτικότητες 703 mg/L, 502 mg/L, 301 mg/L και 100 mg/L. Με την μέθοδο Folin-Ciocalteu πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 765 nm, οπότε και από τις τιμές των απορροφήσεων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς, με πολύ καλή γραμμικότητα ($R^2=0,998$): $A=0,00110 \cdot C_{\text{φαινολών}} - 0,02508$.

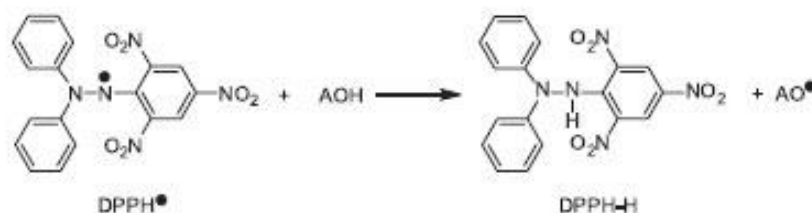
4.4.2. Ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC

Με σκοπό την ανάλυση των φαινολικών συστατικών, τα δείγματα ενσωματώθηκαν μετά την διήθηση (0,45 μm, φίλτρα σύριγγας PVDF, Teknokroma, Βαρκελώνη, Ισπανία) σε μια στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil C18 (ODS 5 μm, 250x4,6 mm, AZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας ήταν η Flan, η οποία μας επιτρέπει κυρίως την ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών. Η ροή του διαλύτη μέσα στην στήλη ήταν 1 mL/min. Ο διαλύτης A ήταν νερό ποιότητας HPLC με 0,2% TFA, ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη ποιότητας HPLC με 0,2% TFA και ο διαλύτης C ήταν ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC με 0,2% TFA. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90% A, 6% B και 4% C και με γραμμικές κλίσεις άλλαξε σε 71% A, 17,4% B και 11,6% C σε διάστημα 30 min και σε 0% A, 85% B και 15% C σε διάστημα 70 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 2-20 μL ανάλογα την συγκέντρωση του εκχυλίσματος και η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 280 nm για τις φλαβονόνες και τις φλαβόνες και στα 360 nm για τις φλαβονόλες. Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών διτερπενίων ήταν η Carnosic. Η ροή των διαλυτών παρέμεινε ίδια με αυτήν που είχε οριστεί στην μέθοδο Flan. Ο διαλύτης A ήταν νερό ποιότητας HPLC με 0,1% H₃PO₄ και ο B διαλύτης ήταν μεθανόλη ποιότητας HPLC με 0,1% H₃PO₄. Η αρχική σύνθεση της

κινητής φάσης ήταν 10% A και 90% B και με γραμμική κλίση άλλαξε σε 40% A και 60% B σε διάστημα 15 min και σε 100% A και 0% B και 15% C σε διάστημα 40 min. Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 230 nm για τα φαινολικά διτερπένια. Η ποσοτικοποίηση των επιμέρους ενώσεων βασίστηκε σε καμπύλες αναφοράς που έχουν κατασκευαστεί για χαρακτηριστικές ουσίες κάθε κατηγορίας, στα προαναφερθέντα μήκη κύματος για κάθε μέθοδο (Παρασκευοπούλου, 2015).

4.4.3. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH

Το μόριο του 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) αποτελεί μια σταθερή ρίζα, με χαρακτηριστικό μωβ χρώμα, η οποία παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515 nm. Όταν στο διάλυμα του DPPH προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, με μείωση της απορρόφησης στα 515 nm. Ο βαθμός αποχρωματισμού του διαλύματος είναι ανάλογος της αντιοξειδωτικής δράσης του αντιοξειδωτικού παράγοντα.



Εικόνα 4.3. Αντίδραση της σταθερής ρίζας (DPPH[•]) με μια αντιοξειδωτική ένωση (AOH)

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τελικών εκχυλισμάτων, αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH. Για τον σκοπό αυτό, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστίθεται 0,0025 g DPPH και μεθανόλη ποιότητας HPLC μέχρι την χαραγή. Ακολουθεί ανακίνηση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του DPPH. Στην συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 3,9 mL του παρασκευασμένου διαλύματος DPPH και 100 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, με παράλληλη παρασκευή τυφλού διαλύματος στο οποίο προστίθεται 0,1 mL DPPH. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 30 min σε σκιερό μέρος. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται στο φωτόμετρο στα 515 nm (ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται με καθαρή μεθανόλη). Για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε stock διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 1139 mg/L. Στην συνέχεια, σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, προστέθηκαν 1, 2, 3 και 5 mL από το stock διάλυμα γαλλικού οξέος και ακολούθησε αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Έτσι, προέκυψαν διαλύματα με συγκεντρώσεις 11, 23, 34 και 57 mg/L. Με την μέθοδο DPPH πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 515 nm, οπότε και από

τις τιμές των απορροφήσεων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς, με πολύ καλή γραμμικότητα ($R^2=0,994$): $A=329,21619 \cdot C_{\text{antiox}} + 0,01177$, όπου C_{antiox} σε g_{antiox}/L .

4.4.4. Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα

Για τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας της εκχύλισης είναι απαραίτητη η εύρεση της απόδοσης της σε στερεές ουσίες. Για τον σκοπό αυτό, χρειαζόμαστε την μάζα των στερεών που ανέκτησε ο διαλύτης. Σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζονταν 2 γυάλινα φιαλίδια και στην συνέχεια τοποθετούνταν 5 mL του τελικού εκχυλίσματος σε καθένα από αυτά. Πραγματοποιούνταν ξήρανση σε φούρνο (Binder, Germany) στους 100 °C για 24 h και έπειτα τοποθέτηση σε ξηραντήρα για 20 min. Ζυγίζονται και πάλι σε αναλυτικό ζυγό, οπότε και η διαφορά της μάζας των φιαλιδίων αντιστοιχεί στην μάζα των στερεών της εκχύλισης.

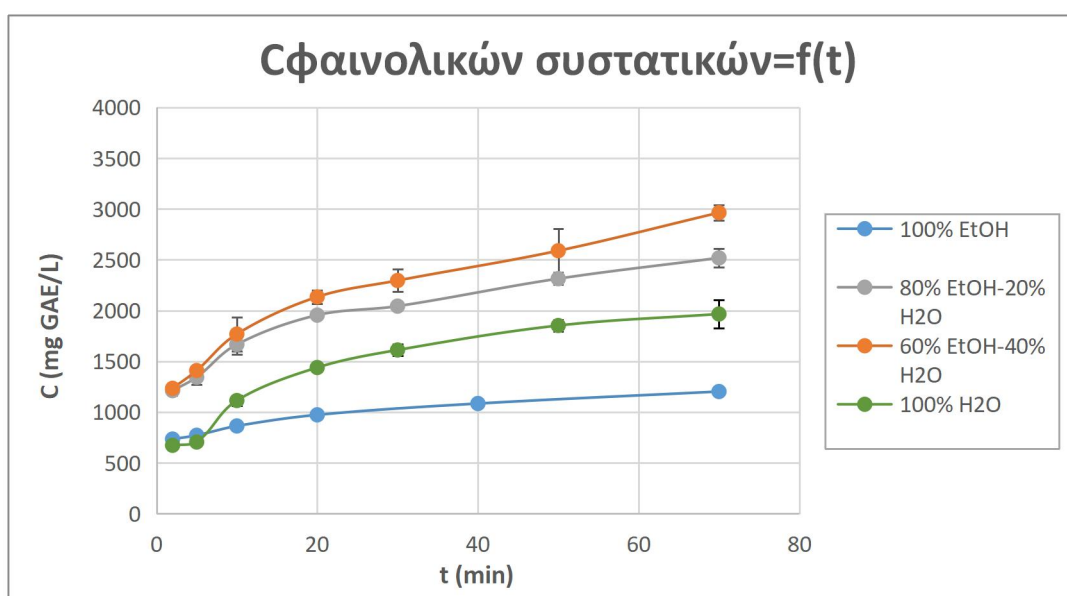
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα - Συζήτηση

5.1. Επίδραση του διαλύτη

Κατά την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων διαλείποντος έργου του δεντρολίβανου χρησιμοποιήθηκαν αιθανολικά (100% EtOH, 80% EtOH - 20% H₂O, 60% EtOH - 40% H₂O) και ακετονικά διαλύματα (100% Acetone, 80% Acetone - 20% H₂O, 60% Acetone - 40% H₂O, 40% Acetone - 60% H₂O), τα οποία και συγκρίθηκαν μεταξύ τους και με το νερό ως προς την απόδοση σε ολικές φαινόλες. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH.

5.1.1. Μίγματα αιθανόλης - νερού

5.1.1.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη



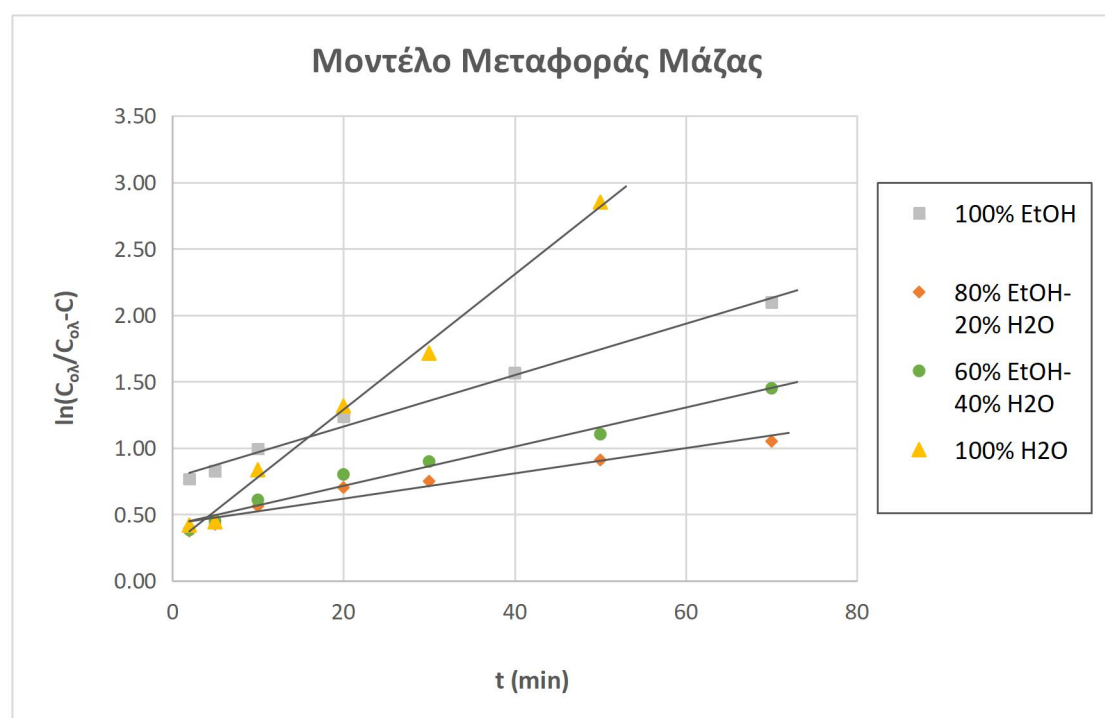
Διάγραμμα 5.1.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε υδραλκοολικό διάλυμα και το νερό

Με βάση το διάγραμμα 5.1.1 παρατηρούμε ότι τα υδραλκοολικά μίγματα επιτυγχάνουν μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο από την καθαρή αιθανόλη και το νερό. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O παρουσιάζει την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών με τον μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης των φαινολικών, ακολουθεί το εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O, το 100% H₂O και τέλος εκείνο της καθαρής αιθανόλης.

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται μελέτη της κινητικής της εκχύλισης για κάθε διαλύτη με βάση το μοντέλο μεταφοράς μάζας, το λογαριθμικό μοντέλο και το μοντέλο του Peleg. Ως C_{∞} ή $C_{ολ}$, κατά την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας, έχει επιλεγεί για τους καθαρούς διαλύτες (100% EtOH και 100% H₂O) η τελική συγκέντρωση των φαινολικών που επιτεύχθηκε σε κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη σε χρόνο 70 min, ενώ για τα μίγματα αιθανόλης-νερού (80% EtOH - 20% H₂O και 60% EtOH - 40% H₂O) επιλέχθηκε η συγκέντρωση που έχει σημειώσει την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά ανάμεσα στο σύνολο των εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν με τους αντίστοιχους διαλύτες. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά ανάμεσα στα πειράματα με τα μίγματα αιθανόλης-νερού προέκυψε στο πείραμα υπερήχων με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O. Στο μοντέλο μεταφοράς μάζας, η αρχική συγκέντρωση θεωρείται μηδέν και ως ακτίνα του υλικού θεωρείται μια μέση διάμετρος όπως αυτή προέκυψε από τη διαίρεση μιας συγκεκριμένης ποσότητας του σε πέντε επιμέρους κλάσματα με γνωστή διάμετρο.

✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας:

Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα στο οποίο έχει εφαρμοστεί το μοντέλο μεταφοράς για όλους τους διαλύτες εκχύλισης.



Διάγραμμα 5.1.2. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε διαλύτη εκχύλισης

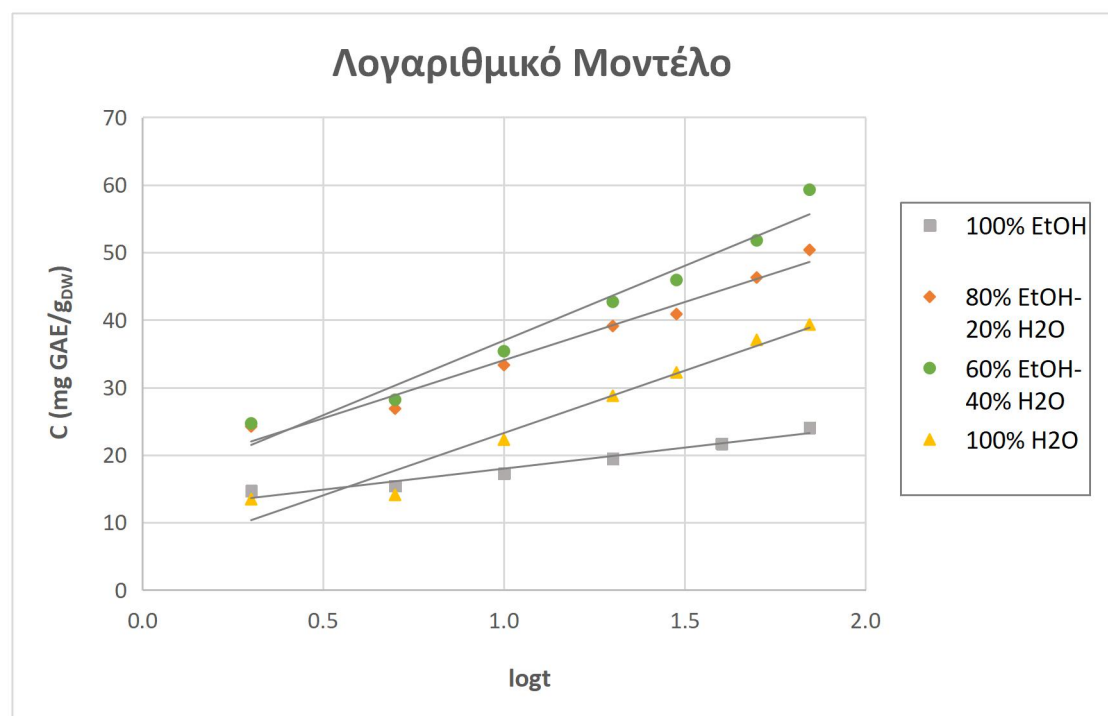
Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν με την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας, είναι αρκετά υψηλοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,948-0,995 στο σύνολο των πειραμάτων.

Πίνακας 5.1.1. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου μεταφοράς μάζας	
	α	$D \cdot 10^{-12} (m^2/s)$
100% EtOH	0,77	20,26
80% EtOH-20% H ₂ O	0,43	9,92
60% EtOH-40% H ₂ O	0,42	15,35
100% H ₂ O	0,27	53,16

Κατά την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας παρατηρείται ότι τα αιθανολικά μίγματα σημειώνουν τους μικρότερους ρυθμούς εκχύλισης και επομένως τους μικρότερους συντελεστές διάχυσης, όπως βλέπουμε από τον πίνακα 5.1.1. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά την εφαρμογή του μοντέλου σε αυτούς τους διαλύτες είναι εμφανής η ύπαρξη δύο ρυθμών εκχύλισης, ενός γρήγορου ρυθμού μέχρι τα 10 min και ενός αργού από τα 20 μέχρι τα 70 min. Συνεπώς, η θεώρηση ότι η εκχύλιση με τα αιθανολικά μίγματα εξελίσσεται με έναν ρυθμό δεν δίνει ακριβή αποτελέσματα.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα όπως προέκυψε από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου, σε κάθε διαλύτη αντίστοιχα.



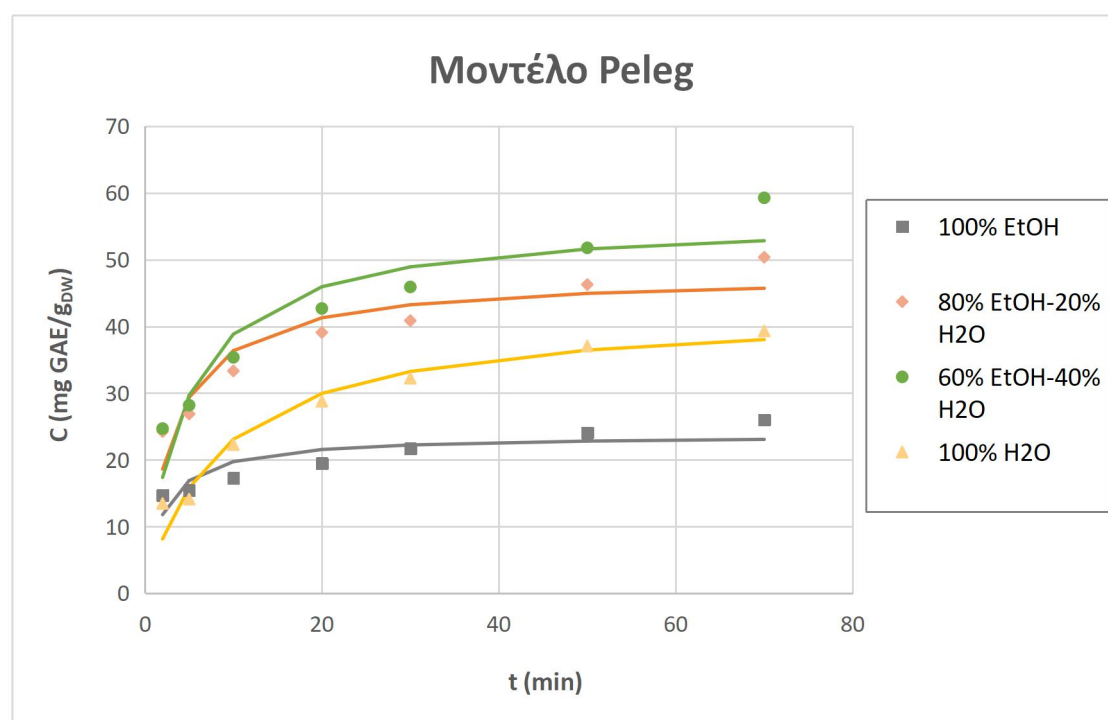
Διάγραμμα 5.1.3. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη εκχύλισης

Πίνακας 5.1.2. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
100% EtOH	7,099	11,016	0,705
80% EtOH-20% H ₂ O	17,212	16,824	2,081
60% EtOH-40% H ₂ O	22,115	14,833	4,878
100% H ₂ O	18,504	4,717	3,511

Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,963-0,974. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,705-4,878, γεγονός που φανερώνει μια αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg : Στο διάγραμμα 5.1.4 παρουσιάζονται ως σημεία οι πειραματικές τιμές και ως καμπύλες οι υπολογισμένες από το μοντέλο τιμές των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών για κάθε διαλύτη εκχύλισης.



Διάγραμμα 5.1.4. Εφαρμογή του μοντέλου Peleg για κάθε διαλύτη εκχύλισης

Πίνακας 5.1.3. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg		
	K_1 (min·g _{DW} / mg GAE)	K_2 (g _{DW} / mg GAE)	RMSD
100% EtOH	0,085	0,042	4,492
80% EtOH-20% H ₂ O	0,066	0,021	11,571
60% EtOH-40% H ₂ O	0,080	0,018	18,416
100% H ₂ O	0,199	0,023	5,181

Η σταθερά K_1 του μοντέλου του Peleg αντιπροσωπεύει την σταθερά ρυθμού, η οποία σχετίζεται με τον αρχικό ρυθμό εκχύλισης ($t=0$). Από την άλλη, η σταθερά K_2 αντιπροσωπεύει την σταθερά χωρητικότητας, η οποία σχετίζεται με την συγκέντρωση ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών ($t \rightarrow \infty$). Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,924-0,977. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 4,492-18,416, γεγονός που φανερώνει μια σχετικά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

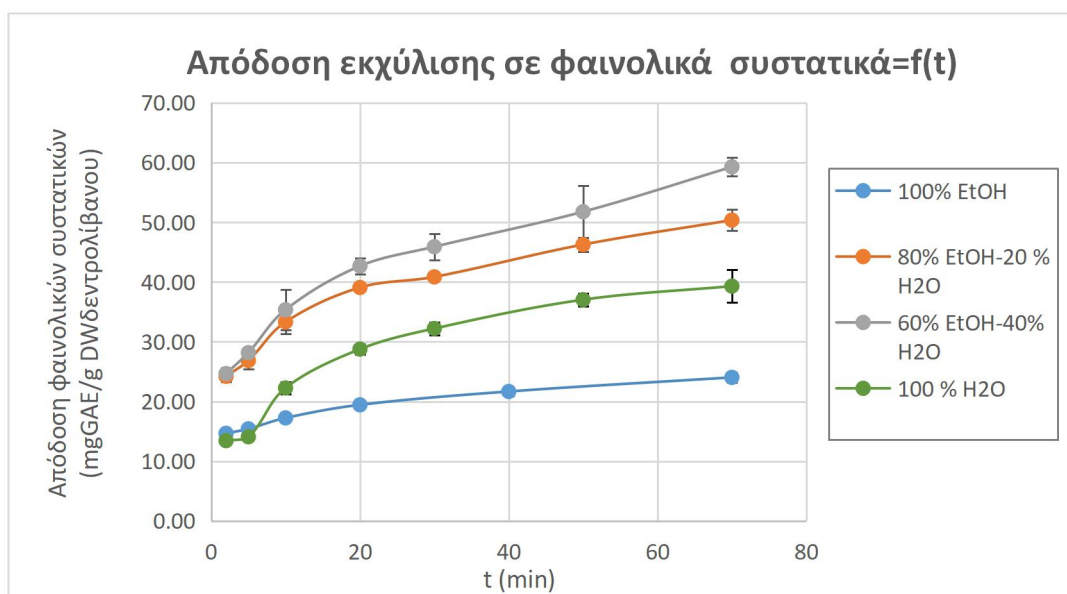
Πίνακας 5.1.4. Τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών για κάθε αιθανολικό μίγμα και το νερό

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg	
	B_0 (mg GAE/min·g _{DW})	C_e (mg GAE/g _{DW})
100% EtOH	12	24
80% EtOH-20% H ₂ O	15	48
60% EtOH-40% H ₂ O	13	56
100% H ₂ O	5	43

Με βάση το μοντέλο Peleg, βλέπουμε λοιπόν ότι τα αιθανολικά μίγματα παρουσιάζουν τους μεγαλύτερους αρχικούς ρυθμούς εκχύλισης και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών.

Συγκρίνοντας τις προσαρμογές των πειραματικών σημείων στα παραπάνω κινητικά μοντέλα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο μεταφοράς μάζας εμφανίζει τις καλύτερες προσαρμογές στο σύνολο των πειραμάτων, ακολουθεί το λογαριθμικό μοντέλο και τέλος το μοντέλο του Peleg.

5.1.1.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.1.5. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε υδραλκοολικό διάλυμα και το νερό

Με βάση το διάγραμμα 5.1.5 παρατηρούμε ότι τα υδραλκοολικά μίγματα επιτυγχάνουν μεγαλύτερη τελική απόδοση φαινολικών από την καθαρή αιθανόλη και το νερό. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O παρουσιάζει την μεγαλύτερη τελική απόδοση φαινολικών συστατικών με τον μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της, ακολουθεί το εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O, το 100% H₂O με γοργό ρυθμό αύξησης και τέλος εκείνο της καθαρής αιθανόλης.

Πίνακας 5.1.5. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε υδραλκοολικό διάλυμα και το νερό

Διαλύτης	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
100% EtOH	27,4 ± 0,3	153,4 ± 23,2	17,9
80% EtOH-20% H₂O	50,4 ± 1,8	243,5 ± 15,1	20,7
60% EtOH-40% H₂O	59,3 ± 1,5	257,8 ± 6,5	23,0
100% H₂O	39,3 ± 2,8	233,1 ± 5,2	16,9

Οι ακριβείς τιμές των αποδόσεων στο τέλος της εκχύλισης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.5. Αν συγκρίνουμε τις τιμές των αποδόσεων στο τέλος της εκχύλισης με των μέγιστων αποδόσεων εκχύλισης, όπως προέκυψαν από το μοντέλο του Peleg (Πίνακας 5.1.4), παρατηρούμε μικρές διαφορές με τις τιμές των αποδόσεων στο τέλος της εκχύλισης να είναι μεγαλύτερες, με εξαίρεση την περίπτωση του διαλύτη 100% H₂O, κάτι που οφείλεται στην όχι τόσο καλή προσαρμογή του μοντέλου. Όσον αφορά τις αποδόσεις στερεών ουσιών, παρατηρούμε την ίδια ακριβώς τάση.

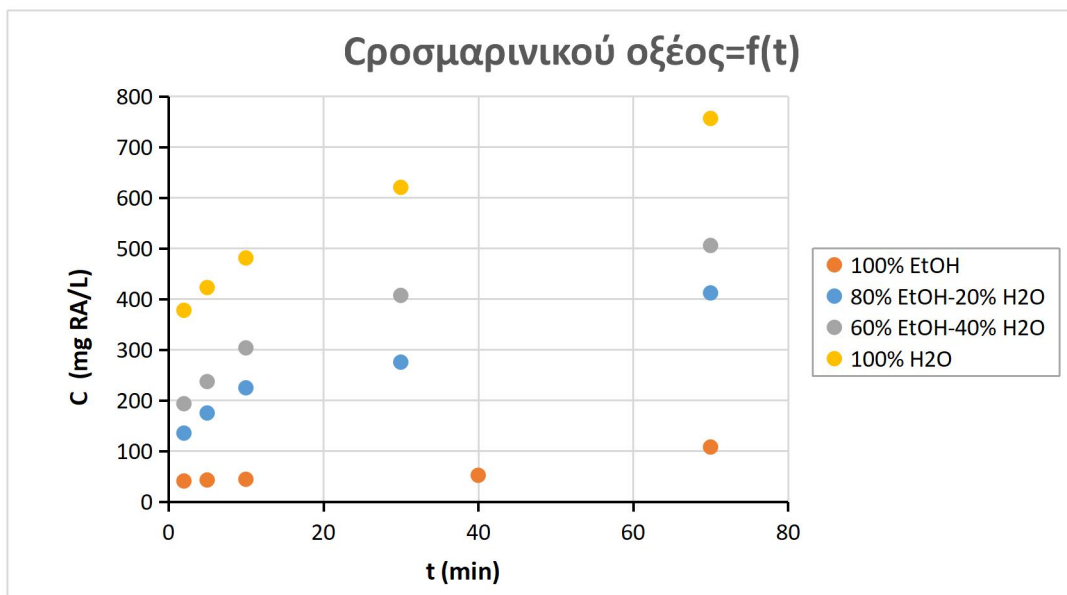
Μεγαλύτερη απόδοση σε στερεές ουσίες σημειώνει ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O, ακολουθεί ο διαλύτης 80% EtOH - 20% H₂O, ο 100% H₂O και τελευταίος ο 100% EtOH. Την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα παρουσιάζει ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O (23,0%), ακολουθεί ο διαλύτης 80% EtOH - 20% H₂O (20,7%) και στην συνέχεια ο διαλύτης 100% EtOH (17,9%) έχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από το καθαρό νερό (16,9%). Ολά τα παραπάνω, καθιστούν τον διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O ως το αποδοτικότερο μέσο εκχύλισης και τον διαλύτη 100% EtOH ως το λιγότερο αποδοτικό.

5.1.1.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των αιθανολικών εκχυλισμάτων και του νερού με την μέθοδο HPLC

Τα εκχυλίματα των αιθανολικών μιγμάτων και του νερού αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με σκοπό την ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών τους και την επακόλουθη ποσοτικοποίησή τους με την βοήθεια γνωστών καμπυλών αναφοράς. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Flan για την ποσοτικοποίηση του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών και η μέθοδος Carnosic για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων.

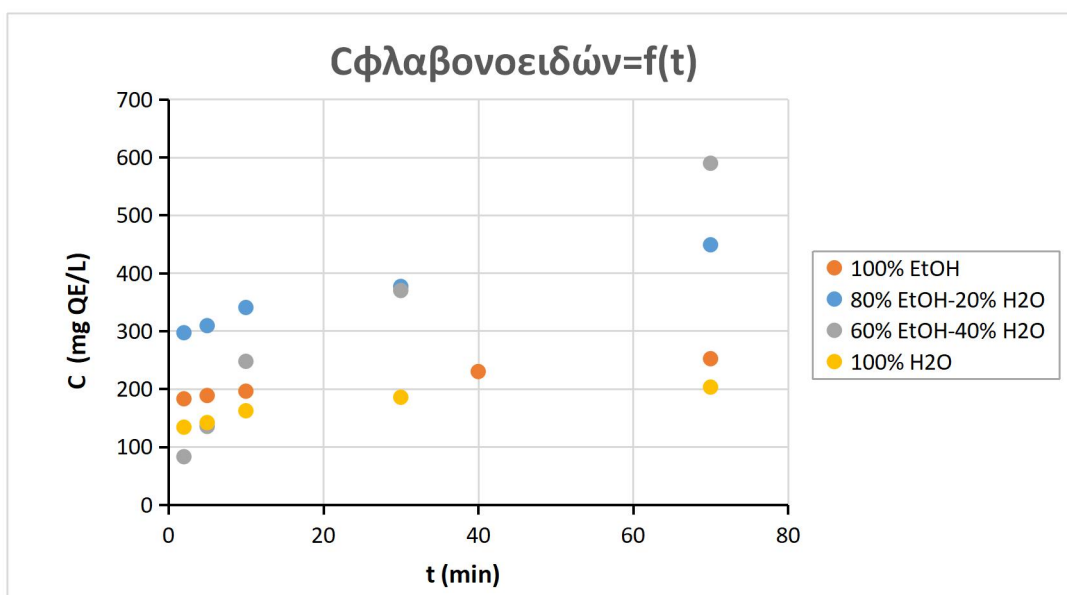
Η αντιστοίχιση των κορυφών στα επιμέρους συστατικά γίνεται με βάση τα αντίστοιχα φάσματα, όπου συγκρίνεται η μορφή τους με τα αντίστοιχα που έχουν προκύψει από την βιβλιογραφία. Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο flav (διαγράμματα F.1-F.4 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 280 nm τις μεγάλες κορυφές του ροσμαρινικού οξέος για κάθε εκχύλιση αντίστοιχα γύρω στα 37 min. Στο αιθανολικό εκχύλιμα 100% EtOH μεγάλες κορυφές φλαβονοειδών σημειώνονται στα 47,974 min, 48,893 min, 50,766 min και 52,117 min, στο αιθανολικό εκχύλιμα 80% EtOH-20% H₂O στα 48,245 min, 49,149 min, 51,022 min και 52,308 min, στο αιθανολικό εκχύλιμα 60% EtOH-40% H₂O στα 40,038 min, 47,902 min, 50,679 min και 52,039 min και στο εκχύλιμα 100% H₂O στα 28,297 min, 33,904 min, 41,947 min και 50,395 min.

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο carnosic (διαγράμματα C.1-C.3 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 230 nm τόσο τις κορυφές της καρνοσόλης όσο και τις μεγαλύτερες κορυφές του καρνοσικού οξέος για κάθε αιθανολικό εκχύλιμα. Στο αιθανολικό εκχύλιμα 100% EtOH η κορυφή της καρνοσόλης σημειώνεται στα 6,345 min και του καρνοσικού οξέος στα 9,689 min, στο αιθανολικό εκχύλιμα 80% EtOH-20% H₂O στα 6,323 min και 9,614 min και στο αιθανολικό εκχύλιμα 60% EtOH-40% H₂O στα 6,356 min και 7,548 min αντίστοιχα.



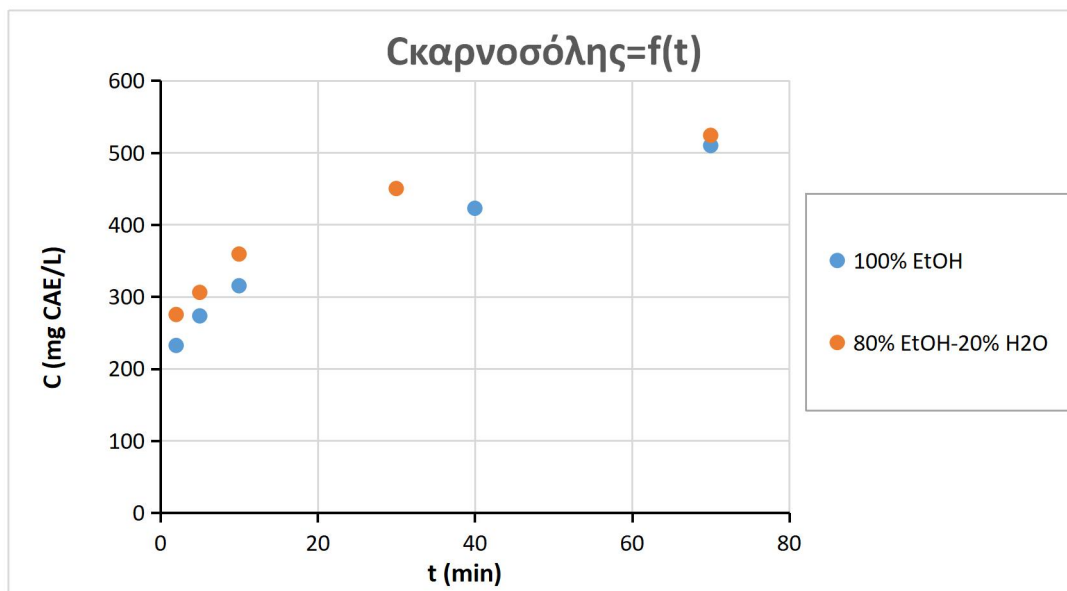
Διάγραμμα 5.1.6. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα αιθανολικά διαλύματα

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.6, το εκχύλισμα με διαλύτη το καθαρό νερό εκχυλίζει την μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος με γρήγορο ρυθμό, ακολουθεί το εκχύλισμα του αιθανολικού μίγματος 60% EtOH - 40% H₂O, στην συνέχεια το 80% EtOH - 20% H₂O με παρόμοιο ρυθμό εκχύλισης και τέλος το εκχύλισμα 100% EtOH, όπου ο ρυθμός εκχύλισης του ροσμαρινικού οξέος είναι αισθητά πιο βραδύς. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, καθώς τα εκχυλίσματα που περιέχουν νερό είναι ικανά να εκχυλίσουν μεγαλύτερες ποσότητες ροσμαρινικού οξέος, λόγω της μεγαλύτερης πολικότητάς τους. Συνεπώς, με την αύξηση του ποσοστού νερού στα εκχυλίσματα επιτυγχάνεται εκχύλιση μεγαλύτερης ποσότητας ροσμαρινικού οξέος.

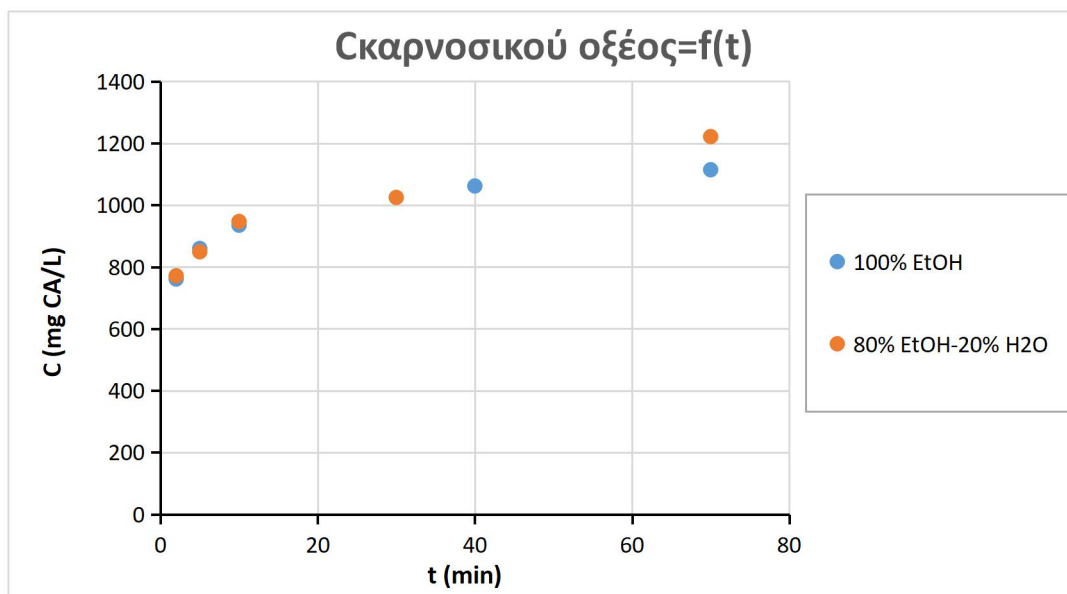


Διάγραμμα 5.1.7. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα αιθανολικά διαλύματα

Στο διάγραμμα 5.1.7 παρατηρούμε ότι στο αιθανολικό εκχύλισμα 60% EtOH - 40% H₂O επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση φλαβονοειδών με τον πιο ταχύ ρυθμό αύξησης, ακολουθεί το αιθανολικό εκχύλισμα 80% EtOH - 20% H₂O και τέλος το εκχύλισμα 100% EtOH και το εκχύλισμα 100% H₂O με παρόμοιο ρυθμό εκχύλισης των φλαβονοειδών.

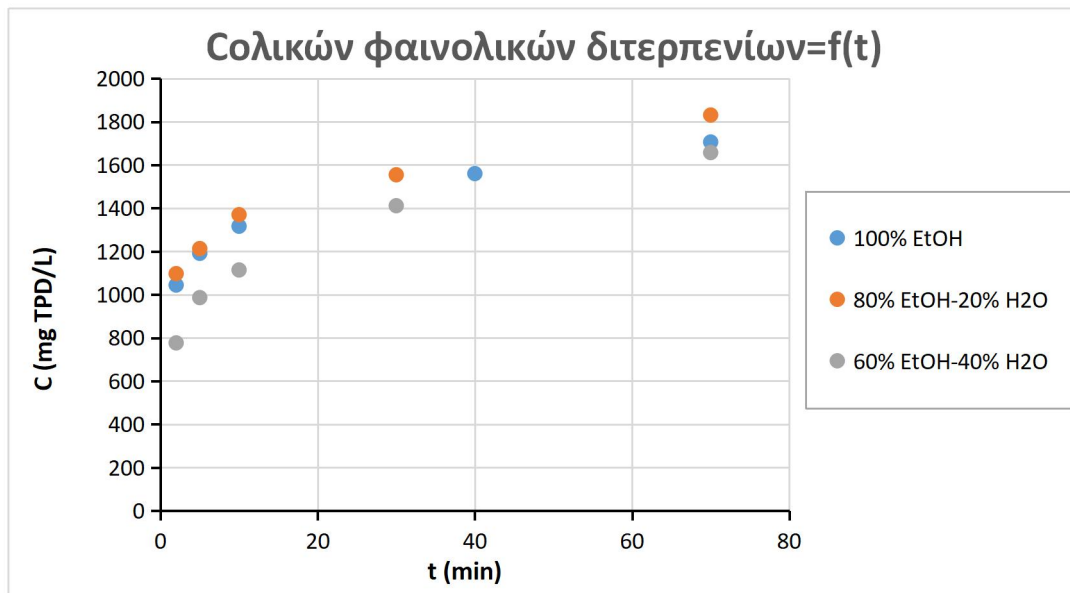


Διάγραμμα 5.1.8. Συγκέντρωση καρνοσόλης στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα αιθανολικά διαλύματα



Διάγραμμα 5.1.9. Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα αιθανολικά διαλύματα

Στα διαγράμματα 5.1.8 και 5.1.9 δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα της συγκέντρωσης της καρνοσόλης και του καρνοσικού οξέος για το αιθανολικό εκχύλισμα 60% EtOH - 40% H₂O λόγω αδυναμίας ταυτοποίησης των αντίστοιχων κορυφών τους στο χρωματογράφημα έτσι όπως προέκυψε από την μέθοδο carnosic της HPLC.



Διάγραμμα 5.1.10. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα αιθανολικά διαλύματα

Όπως παρατηρούμε στα διαγράμματα 5.1.8, 5.1.9 και 5.1.10 οι ρυθμοί εκχύλισης της καρνοσόλης, του καρνοσικού οξέος και των ολικών φαινολικών διτερπενίων είναι παρόμοιοι στα αιθανολικά εκχυλίσματα 80% EtOH - 20% H₂O και 100% EtOH. Τα φαινολικά διτερπένια είναι μόρια χαμηλής πολικότητας γι αυτό και αλληλεπιδρούν αποδοτικότερα με διαλύτες, επίσης, χαμηλής πολικότητας (με μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης). Όσον αφορά τον διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών διτερπενίων στο εκχύλισμα είναι μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθανολικά εκχυλίσματα αλλά αυξάνεται με εξίσου γοργό ρυθμό.

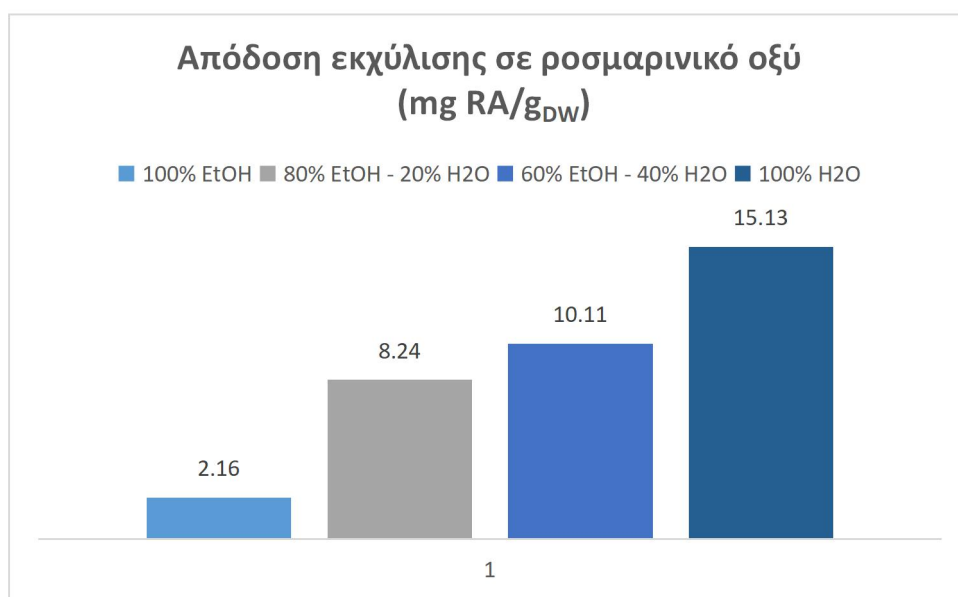
Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της εκχύλισης των επιμέρους συστατικών του δεντρολίβανου με το μοντέλο μεταφοράς μάζας, το λογαριθμικό μοντέλο και το μοντέλο του Peleg. Ο Πίνακας 5.1.6 παρουσιάζει τις τιμές των παραμέτρων και τους συντελεστές συσχέτισης των κινητικών μοντέλων για κάθε συστατικό και σε κάθε διαλύτη.

Εκχύλισμα	100% EtOH			80% EtOH-20% H ₂ O			60% EtOH-40% H ₂ O			100% H ₂ O		
Μοντέλο μεταφοράς μάζας												
	α	D_{eff}·10⁻¹² (m²/s)	R²	α	D_{eff}·10⁻¹² (m²/s)	R²	α	D_{eff}·10⁻¹² (m²/s)	R²	α	D_{eff}·10⁻¹² (m²/s)	R²
Ροσμαρινικό οξύ	0,48	4,80	0,992	0,21	7,73	0,979	0,33	15,14	0,958	0,63	37,80	0,999
Φλαβονοειδή	1,22	31,54	0,999	0,47	5,22	0,981	0,12	24,54	0,991	1,01	36,76	0,986
Καρνισόλη	0,55	42,61	0,999	0,46	9,40	0,944	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	1,10	68,72	0,993	0,01	15,35	0,978	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	0,91	54,62	0,994	0,67	12,43	0,972	0,48	11,49	0,940	-	-	-
Λογαριθμικό Μοντέλο												
	α	b	R²	α	b	R²	α	b	R²	α	b	R²
Ροσμαρινικό οξύ	0,69	0,40	0,986	3,38	1,29	0,928	4,12	2,00	0,982	4,97	5,34	0,959
Φλαβονοειδή	0,90	3,21	0,927	1,92	5,04	0,927	6,46	-1,17	0,949	0,94	2,30	0,982
Καρνισόλη	3,66	3,11	0,973	3,33	4,11	0,978	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	4,70	13,92	0,993	5,55	13,35	0,958	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	8,78	17,93	0,997	9,35	18,30	0,976	11,35	11,70	0,994	-	-	-
Μοντέλο Peleg												
K ₁ (min g _{DW} / mg GAE) K ₂ (g _{DW} / mg GAE)	K₁	K₂	R²	K₁	K₂	R²	K₁	K₂	R²	K₁	K₂	R²
Ροσμαρινικό οξύ	3,14	0,57	0,891	0,82	0,13	0,929	0,51	0,10	0,962	0,20	0,07	0,900
Φλαβονοειδή	0,16	0,21	0,803	0,13	0,12	0,819	1,61	0,07	0,988	0,31	0,26	0,901
Καρνισόλη	0,36	0,10	0,931	0,24	0,10	0,918	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	0,05	0,05	0,951	0,05	0,05	0,878	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	0,04	0,03	0,933	0,04	0,03	0,895	0,09	0,03	0,951	-	-	-

Πίνακας 5.1.6. Τιμές των παραμέτρων των κινητικών μοντέλων για κάθε συστατικό σε κάθε αιθανολικό εκχύλισμα και το νερό

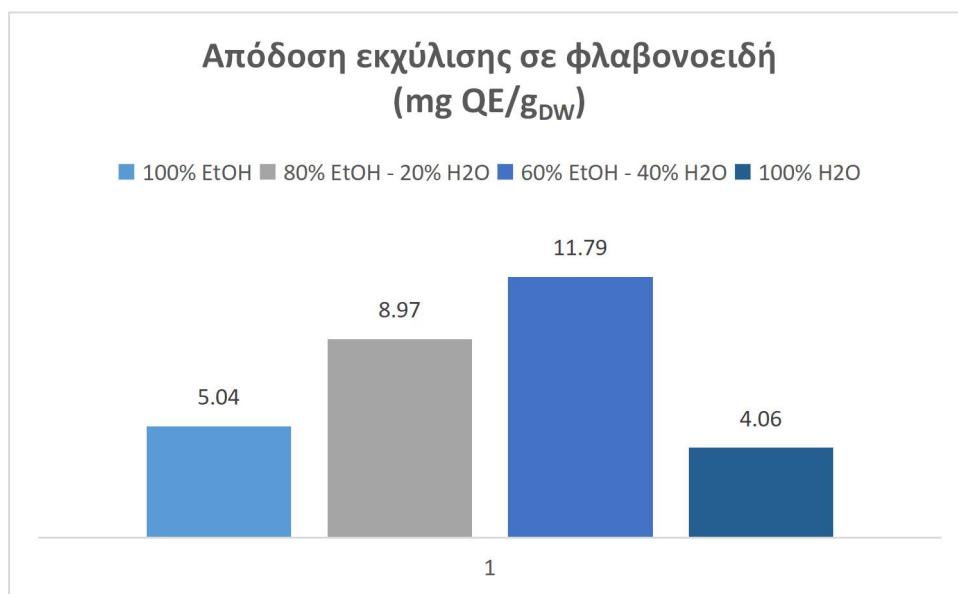
Συγκρίνοντας τις λαμβανόμενες τιμές των συντελεστών συσχέτισης, συμπεραίνουμε ότι το μοντέλο μεταφοράς μάζας έδωσε την καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών σημείων στο σύνολο των πειραμάτων. Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του κυμαίνονται σε εύρος τιμών μεταξύ 0,923 και 0,999. Οι χαμηλότερες τιμές των συντελεστών συσχέτισης σημειώθηκαν κατά την εφαρμογή του μοντέλου Peleg, με εύρος τιμών 0,803-0,988. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου του Peleg, κυμαίνονταν σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,052-5,468, ενώ οι αντίστοιχες που προέκυψαν από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου, είναι αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,021-0,669 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα, γεγονός που φανερώνει μεγαλύτερη συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών. Συνεπώς, το μοντέλο μεταφοράς μάζας επιλέγεται ως το καταλληλότερο μοντέλο για την ποσοτικοποίηση των αποδόσεων των επιμέρους συστατικών του δεντρολίβανου κατά την εκχύλιση με αιθανολικά μίγματα και νερό.

Οι τελικές αποδόσεις για καθένα από τα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου για κάθε διαλύτη παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.1.11, 5.1.12 και 5.1.13.



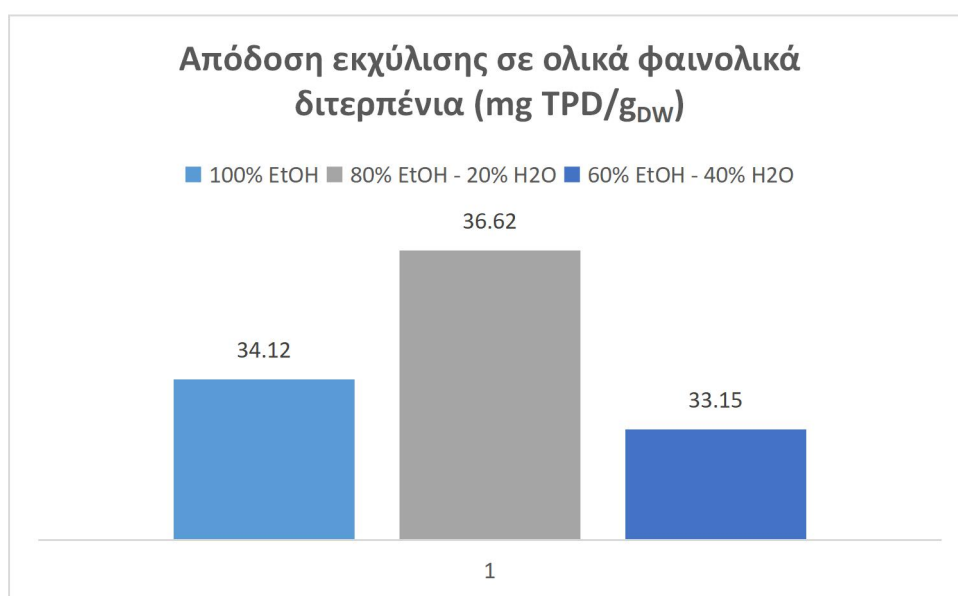
Διάγραμμα 5.1.11. Απόδοση της εκχύλισης σε ροσμαρινικό οξύ για κάθε αιθανολικό εκχύλισμα και το νερό

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.11, η απόδοση της εκχύλισης σε ροσμαρινικό οξύ αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού νερού στο διαλύτη και συγκεκριμένα η μέγιστη απόδοση σημειώνεται στο εκχύλισμα με διαλύτη 100% H₂O (15,13 mg RA/g_{DW}) και η ελάχιστη σε εκείνο με διαλύτη 100% EtOH (2,16 mg RA/g_{DW}).



Διάγραμμα 5.1.12. Απόδοση της εκχύλισης σε φλαβονοειδή για κάθε αιθανολικό εκχύλισμα και το νερό

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.12, οι μέτριοι σε πολικότητα διαλύτες, δηλαδή τα μίγματα αιθανόλης-νερού, εμφανίζουν την μεγαλύτερη απόδοση σε φλαβονοειδή, με τον διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O να σημειώνει την μέγιστη απόδοση φλαβονοειδών (11,79 mg QE/g_{DW}). Ακολουθεί ο διαλύτης 80% EtOH - 20% H₂O, έπειτα ο διαλύτης 100% EtOH και τέλος ο διαλύτης 100% H₂O πετυχαίνει την μικρότερη τελική απόδοση εκχύλισης σε φλαβονοειδή (4,06 mg QE/g_{DW}).



Διάγραμμα 5.1.13. Απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά διτερπένια για κάθε αιθανολικό εκχύλισμα

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.13, η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά διτερπένια δεν εμφανίζει ξεκάθαρη τάση. Η μέγιστη απόδοση σε ολικά φαινολικά διτερπένια σημειώνεται στο εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O

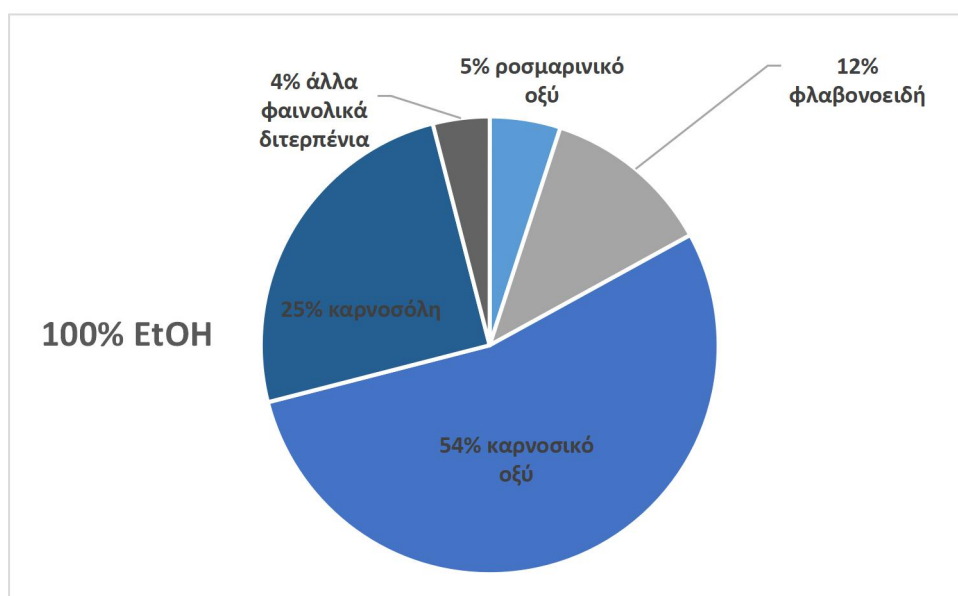
(36,62 mg TPD/g_{DW}), ακολουθεί εκείνο με διαλύτη 100% EtOH και τέλος εκείνο με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O.

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται η σύσταση κάθε εκχυλίσματος:



Διάγραμμα 5.1.14. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 100% H₂O

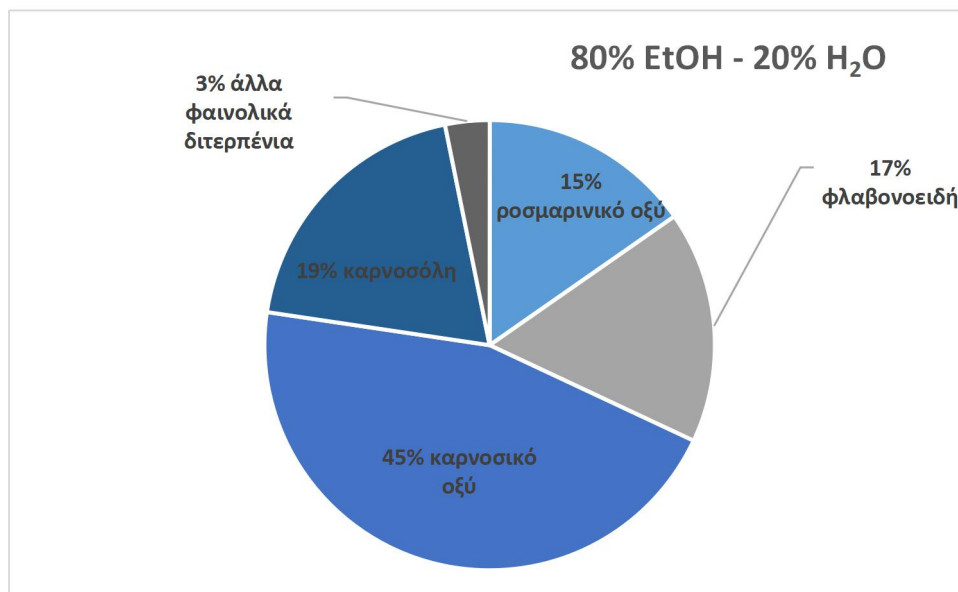
Το εκχύλισμα με διαλύτη 100% H₂O περιλαμβάνει σε μεγάλο ποσοστό ροσμαρινικό οξύ (79%) και φλαβονοειδή (21%). Τα συστατικά του είναι πολικά και δεν παραλαμβάνει καθόλου φαινολικά διτερπένια.



Διάγραμμα 5.1.15. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 100% EtOH

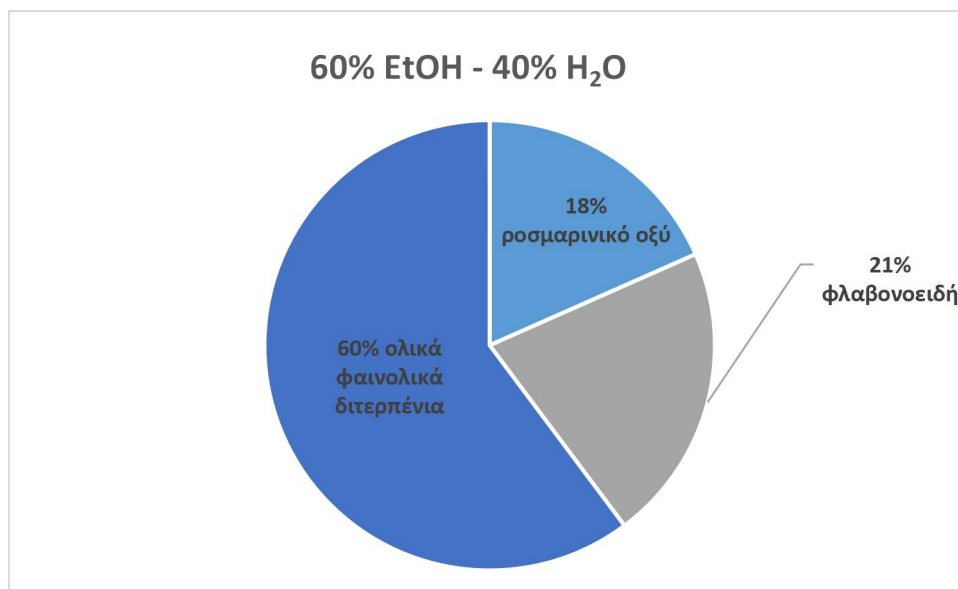
Το εκχύλισμα της καθαρής αιθανόλης περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 83%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 12% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 5%. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι ο διαλύτης της καθαρής αιθανόλης, λόγω χαμηλής

πολικότητας, εκχυλίζει περισσότερα φαινολικά διτερπένια και μικρές ποσότητες ροσμαρινικού.



Διάγραμμα 5.1.16. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% EtOH-20% H₂O

Το αιθανολικό εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 68%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 17% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 15%. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι με την προσθήκη νερού στον διαλύτη της εκχύλισης, αυξήθηκε το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος και μειώθηκε το ποσοστό των ολικών φαινολικών διτερπενίων, λόγω αύξησης της πολικότητας του διαλύτη εκχύλισης.



Διάγραμμα 5.1.17. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% EtOH-40% H₂O

Το αιθανολικό εκχύλισμα με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 60%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 21% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 18%. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι με την περαιτέρω αύξηση του ποσοστού

νερού στον διαλύτη της εκχύλισης, αυξήθηκε το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος από 15% σε 18%, μειώθηκε το ποσοστό των ολικών φαινολικών διτερπενίων από 68% σε 60% και τέλος αυξήθηκε το ποσοστό των φλαβονοειδών από 17% σε 21%, σε σχέση με το εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O.

5.1.1.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

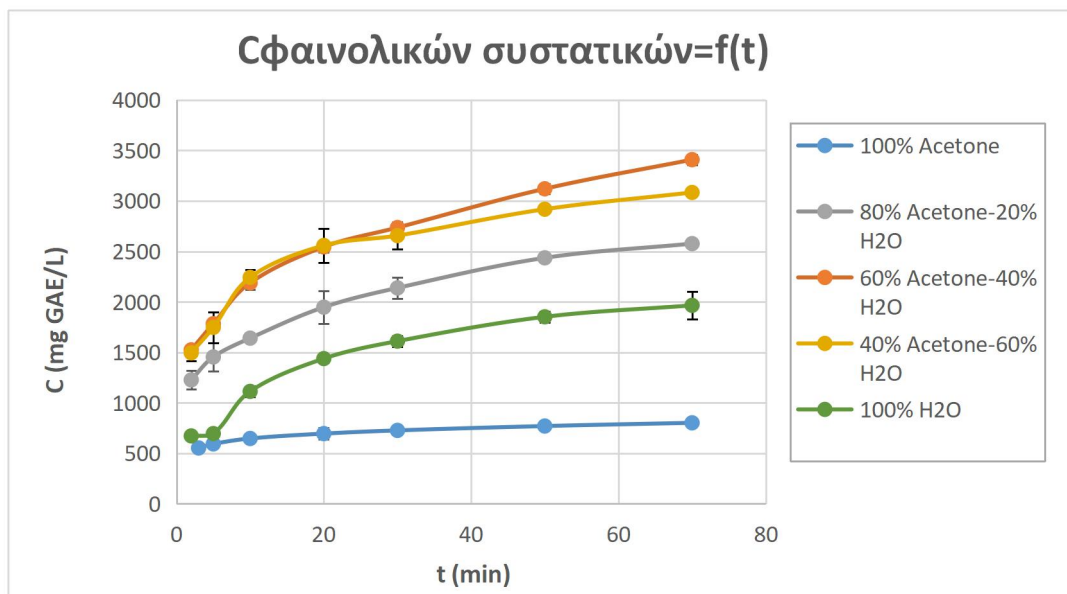
Πίνακας 5.1.7. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	GAEAC (mg GAE/L)
100% EtOH	619 ± 3
80% EtOH-20% H ₂ O	1088 ± 60
60% EtOH-40% H ₂ O	1196 ± 69
100% H ₂ O	1022 ± 11

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.1.7, παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1196 mg GAE/L), ακολουθεί το εκχύλισμα με διαλύτη 80% EtOH - 20% H₂O, στη συνέχεια το εκχύλισμα 100% H₂O και τέλος το 100% EtOH. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι τα εκχυλίσματα με τους μέτριους ποικιλότητας διαλύτες εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το καθαρό νερό, καθώς είναι ικανά να εκχυλίζουν φαινολικά διτερπένια και περισσότερα φλαβονοειδή, και από την καθαρή αιθανόλη αφού λόγω αυξημένης ποικιλότητας με την προσθήκη νερού είναι ικανά να εκχυλίζουν περισσότερο ροσμαρινικό οξύ. Τα συστατικά αυτά του δεντρολίβανου είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές του δράσεις.

5.1.2 Μίγματα ακετόνης - νερού

5.1.2.1 Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη

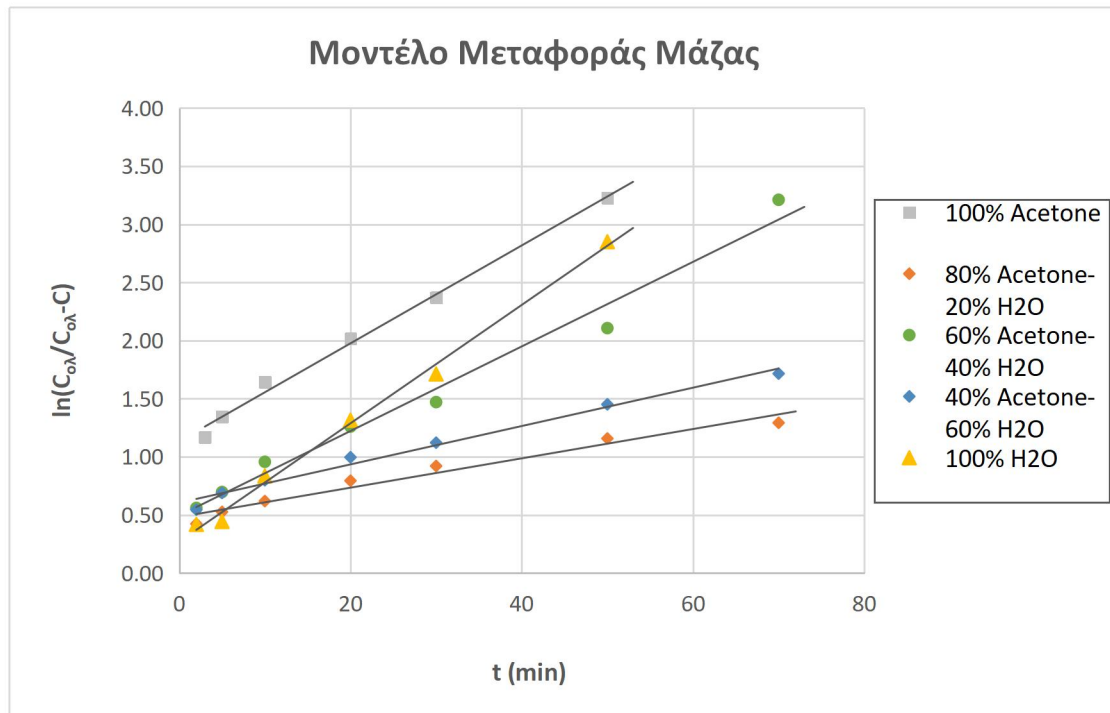


Διάγραμμα 5.1.18. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε ακετονικό διάλυμα και το νερό

Με βάση το διάγραμμα 5.1.18 παρατηρούμε ότι τα ακετονικά μίγματα με το νερό επιτυγχάνουν μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο από την καθαρή ακετόνη και το νερό. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O παρουσιάζει την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, ακολουθεί το εκχύλισμα με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O, στην συνέχεια το εκχύλισμα με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O, το 100% H₂O και τέλος εκείνο της καθαρής ακετόνης 100% Acetone.

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται μελέτη της κινητικής της εκχύλισης για κάθε διαλύτη με βάση το μοντέλο μεταφοράς μάζας, το λογαριθμικό μοντέλο και το μοντέλο του Peleg. Ως C_{∞} ή $C_{ολ}$ έχει επιλεγεί για τους καθαρούς διαλύτες (100% Acetone και 100% H₂O) η τελική συγκέντρωση των φαινολικών που επιτεύχθηκε σε κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη σε χρόνο 70 min, ενώ για τα μίγματα ακετόνης-νερού (80% Acetone-20% H₂O, 60% Acetone-40% H₂O και 40% Acetone-60% H₂O) επιλέχθηκε η συγκέντρωση που έχει σημειώσει την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά ανάμεσα στο σύνολο των εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν με τους αντίστοιχους διαλύτες. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά ανάμεσα στα πειράματα με τα μίγματα ακετόνης-νερού προέκυψε στο πείραμα υπερήχων με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα προσαρμογής του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα για κάθε διαλύτη.



Διάγραμμα 5.1.19. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε διαλύτη εκχύλισης

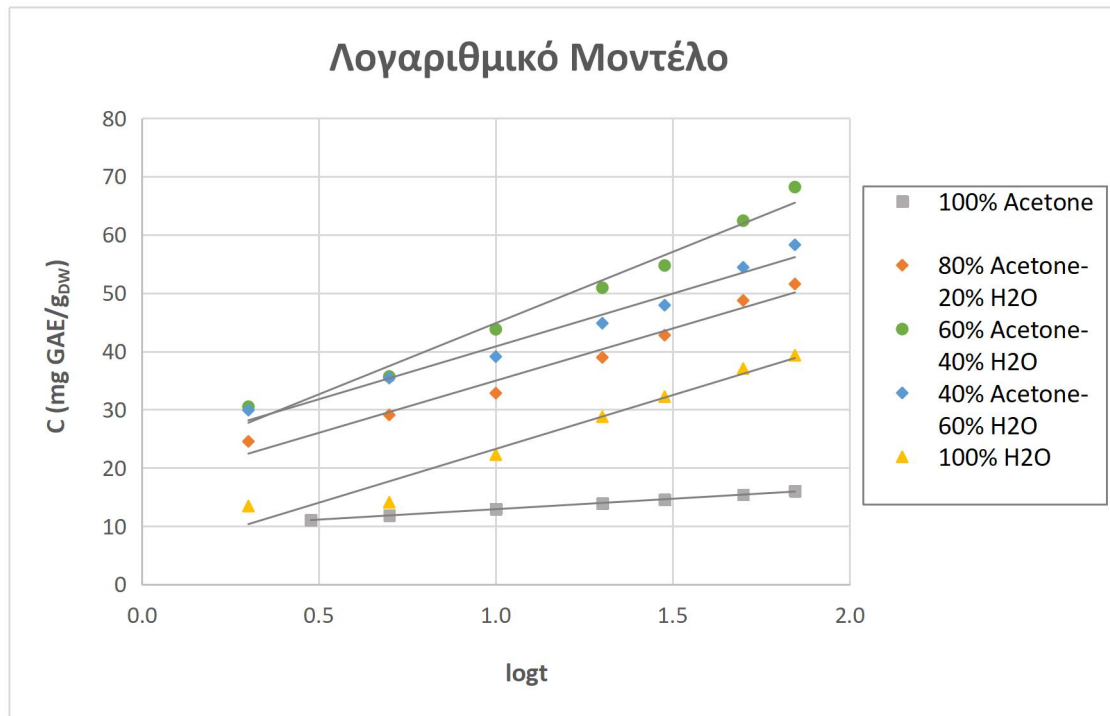
Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,965-0,995 στο σύνολο των πειραμάτων. Στον πίνακα 5.1.8, παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς.

Πίνακας 5.1.8. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου μεταφοράς μάζας	
	α	$D \cdot 10^{-12} (m^2/s)$
100% Acetone	1,14	43,97
80% Acetone-20% H₂O	0,48	13,16
60% Acetone-40% H₂O	0,50	38,01
40% Acetone-60% H₂O	0,61	17,23
100% H₂O	0,27	53,16

Όπως, αναφέρθηκε και στην περίπτωση των αιθανολικών μιγμάτων, κατά την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας στα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από τις εκχυλίσεις των ακετονικών μιγμάτων παρατηρείται η ύπαρξη δύο ρυθμών εκχύλισης των φαινολικών συστατικών, γι αυτό και οι συντελεστές διάχυσης τους παρουσιάζονται μικρότεροι από τους αντίστοιχους των καθαρών διαλυτών.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου για κάθε διαλύτη παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 5.1.20. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη εκχύλισης

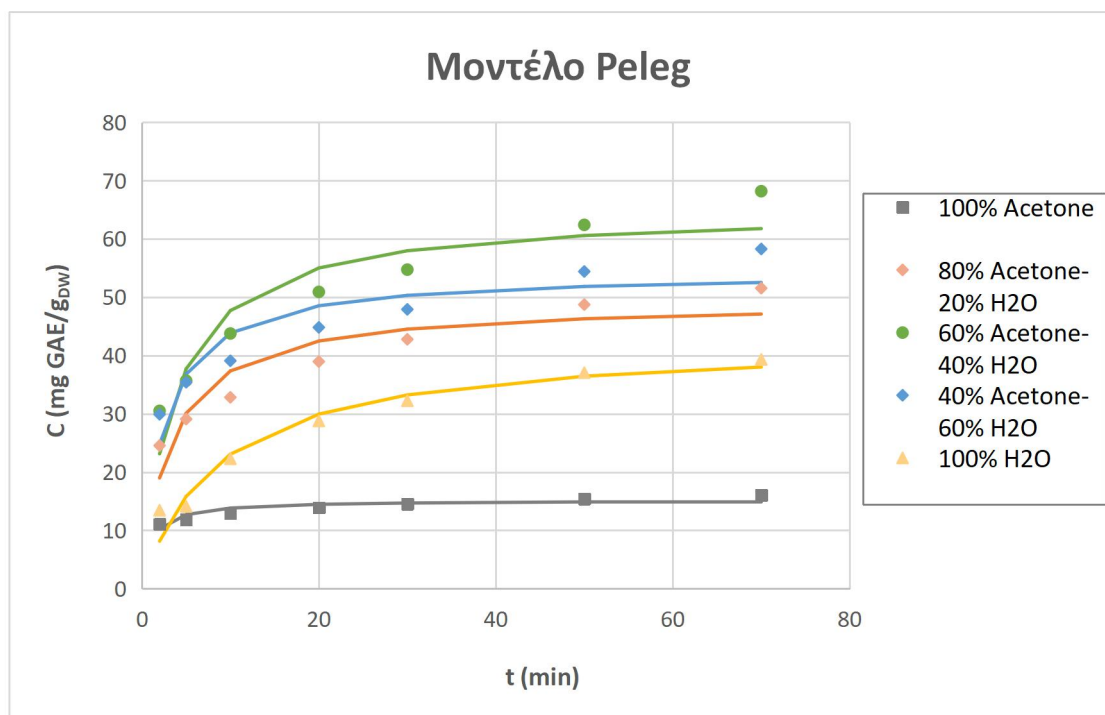
Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,963-0,999. Στον πίνακα 5.1.9 παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων και η μέση τετραγωνική απόκλιση του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη αντίστοιχα.

Πίνακας 5.1.9. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
100% Acetone	3,577	9,344	0,004
80% Acetone - 20% H ₂ O	17,905	17,065	2,199
60% Acetone - 40% H ₂ O	24,443	20,397	3,453
40% Acetone - 60% H ₂ O	18,126	22,712	2,292
100% H ₂ O	18,504	4,717	3,511

Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,004-3,511, γεγονός που φανερώνει μια αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg: Στο διάγραμμα 5.1.21 παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές, με τη μορφή σημείων, καθώς και οι υπολογισμένες από το μοντέλο συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών, με τη μορφή καμπυλών, για κάθε διαλύτη αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.1.21. Εφαρμογή του μοντέλου Peleg για κάθε διαλύτη εκχύλισης

Πίνακας 5.1.10. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg		
	K_1 (min·g _{DW} / mg GAE)	K_2 (g _{DW} / mg GAE)	RMSD
100% Acetone	0,098	0,066	0,568
80% Acetone - 20% H ₂ O	0,065	0,020	13,351
60% Acetone - 40% H ₂ O	0,056	0,015	20,810
40% Acetone - 60% H ₂ O	0,044	0,018	15,731
100% H ₂ O	0,199	0,023	5,181

Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,897-0,977. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,568-20,810. Από την σταθερά ρυθμού K_1 και την σταθερά χωριτικότητας K_2 , πραγματοποιείται προσδιορισμός του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών, αντίστοιχα.

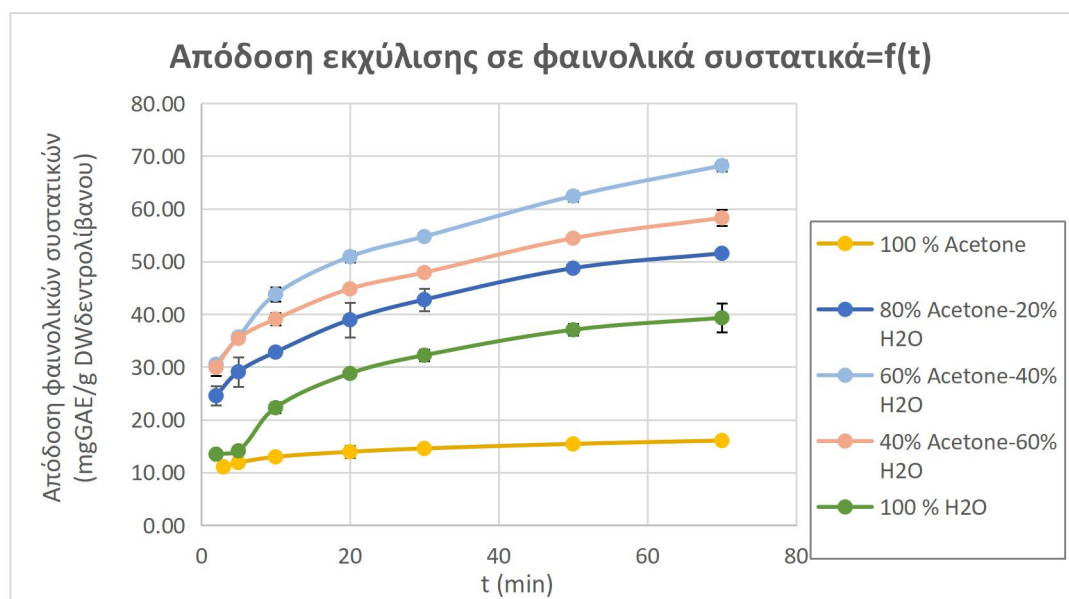
Πίνακας 5.1.11. Τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης (B_0) και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών (C_e) για κάθε αιθανολικό μίγμα και το νερό

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg	
	B_0 (mg GAE/min g_{DW})	C_e (mg GAE/ g_{DW})
100% Acetone	10	15
80% Acetone-20% H₂O	15	49
60% Acetone-40% H₂O	18	65
40% Acetone-60% H₂O	23	54
100% H₂O	5	43

Με βάση το μοντέλο Peleg, βλέπουμε λοιπόν ότι τα ακετονικά μίγματα παρουσιάζουν τους μεγαλύτερους αρχικούς ρυθμούς εκχύλισης και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών.

Συγκρίνοντας τις προσαρμογές των πειραματικών σημείων στα παραπάνω κινητικά μοντέλα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το μοντέλο μεταφοράς μάζας και το λογαριθμικό μοντέλο εμφανίζουν εξίσου τις καλύτερες προσαρμογές στο σύνολο των πειραμάτων, με τον συντελεστή προσαρμογής να κυμαίνεται γύρω στο 0,98 κατά μέσο όρο και στις 2 περιπτώσεις.

5.1.2.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.1.22. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε ακετονικό μίγμα και το νερό

Με βάση το διάγραμμα 5.1.22 παρατηρούμε ότι τα μίγματα της ακετόνης επιτυγχάνουν μεγαλύτερη τελική απόδοση φαινολικών από την καθαρή ακετόνη και το νερό. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O παρουσιάζει την μεγαλύτερη τελική απόδοση φαινολικών συστατικών με τον μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της, ακολουθεί το εκχύλισμα με διαλύτη 40% Acetone - 60% H₂O και εκείνο με διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O με παρόμοιους ρυθμούς αύξησης, στη συνέχεια ακολουθεί το 100% H₂O με επίσης γοργό ρυθμό αύξησης και τέλος εκείνο της καθαρής ακετόνης με αισθητά βραδύ ρυθμό.

Πίνακας 5.1.12. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε ακετονικό μίγμα και το νερό

Διαλύτης	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
100% Acetone	16,0 ± 0,6	132,5 ± 10,3	12,1
80% Acetone-20% H ₂ O	51,5 ± 0,1	227,2 ± 7,0	22,7
60% Acetone-40% H ₂ O	68,2 ± 1,0	249,0 ± 0,0	27,4
40% Acetone-60% H ₂ O	58,3 ± 1,5	234,5 ± 27,6	24,9
100% H ₂ O	39,3 ± 2,8	233,1 ± 5,2	16,9

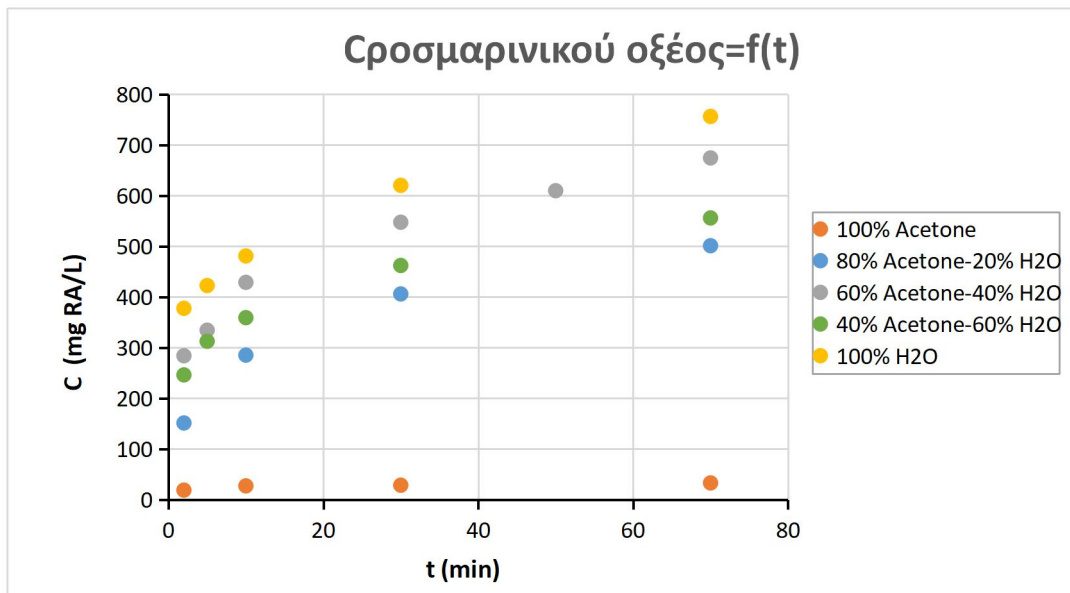
Αν συγκρίνουμε τις τελικές αποδόσεις σε φαινολικά του πίνακα 5.1.12 με τις μέγιστες αποδόσεις, όπως προέκυψαν από το μοντέλο Peleg, παρατηρούμε ότι οι τελευταίες είναι μικρότερες, κάτι που δείχνει την όχι τόσο καλή προσαρμογή του μοντέλου Peleg στα πειραματικά σημεία. Όσον αφορά τις αποδόσεις στερεών ουσιών, παρατηρούμε την ίδια ακριβώς τάση μείωσης με τις αποδόσεις φαινολικών. Τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα παρουσιάζει ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O (27,4%) και την μικρότερη ο διαλύτης 100% Acetone (12,1%). Όλα τα παραπάνω, καθιστούν τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O ως το αποδοτικότερο μέσο εκχύλισης και τον διαλύτη 100% Acetone ως το λιγότερο αποδοτικό.

5.1.2.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των ακετονικών εκχυλισμάτων και του νερού με την μέθοδο HPLC

Τα εκχυλίσματα των ακετονικών μιγμάτων και του νερού αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Flav για την ποσοτικοποίηση του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών και η μέθοδος Carnosic για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων.

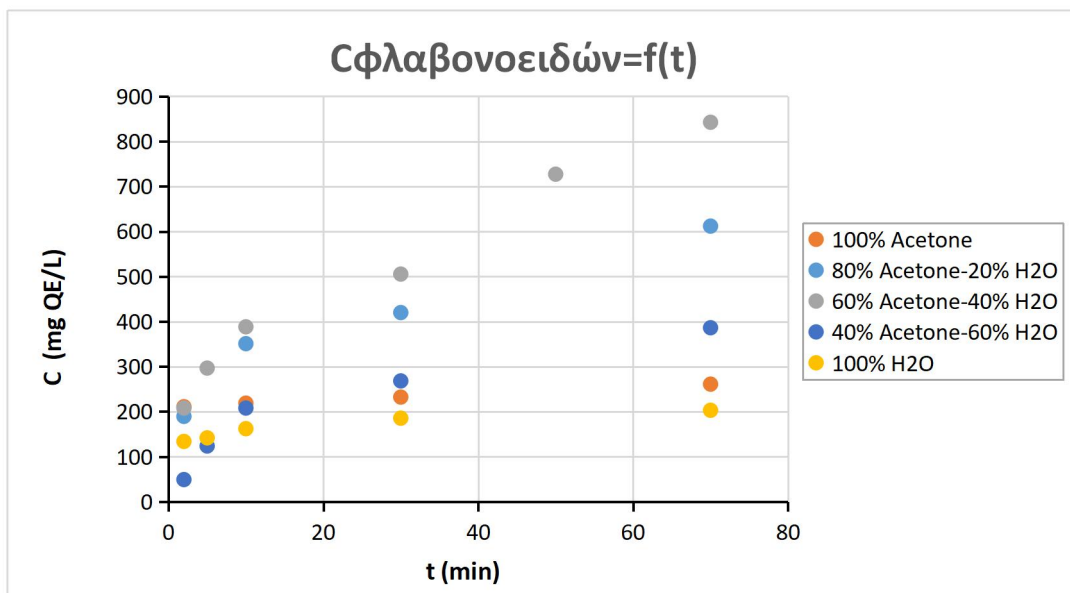
Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο Flav (διαγράμματα F.4-F.8 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 280 nm τις μεγάλες κορυφές του ροσμαρινικού οξέος για κάθε εκχύλισμα αντίστοιχα γύρω στα 37 min. Στα ακετονικά εκχυλίσματα οι κορυφές των φλαβονοειδών παρουσιάζουν μικρές διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης.

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο carnosic (διαγράμματα C.4-C.7 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 230 nm τόσο τις κορυφές της καρνοσόλης όσο και τις μεγαλύτερες κορυφές του καρνοσικού οξέος για κάθε ακετονικό εκχύλισμα. Στο ακετονικό εκχύλισμα 100% Acetone η κορυφή της καρνοσόλης σημειώνεται στα 6,353 min και του καρνοσικού οξέος στα 9,705 min και στο εκχύλισμα 60% Acetone - 40% H₂O στα 6,325 min και 9,658 min αντίστοιχα. Με βάση τα χρωματογραφήματα των ακετονικών εκχυλισμάτων 80% Acetone - 20% H₂O και 40% Acetone - 60% H₂O, δεν είναι δυνατή η αντιστοίχιση των κορυφών των φαινολικών διτερπενίων σε καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ, καθώς και στις δύο περιπτώσεις παρατηρούμε μια μεγάλη κορυφή η οποία ακολουθείται από μια μικρότερη.



Διάγραμμα 5.1.23. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα ακετονικά διαλύματα και τον νερό

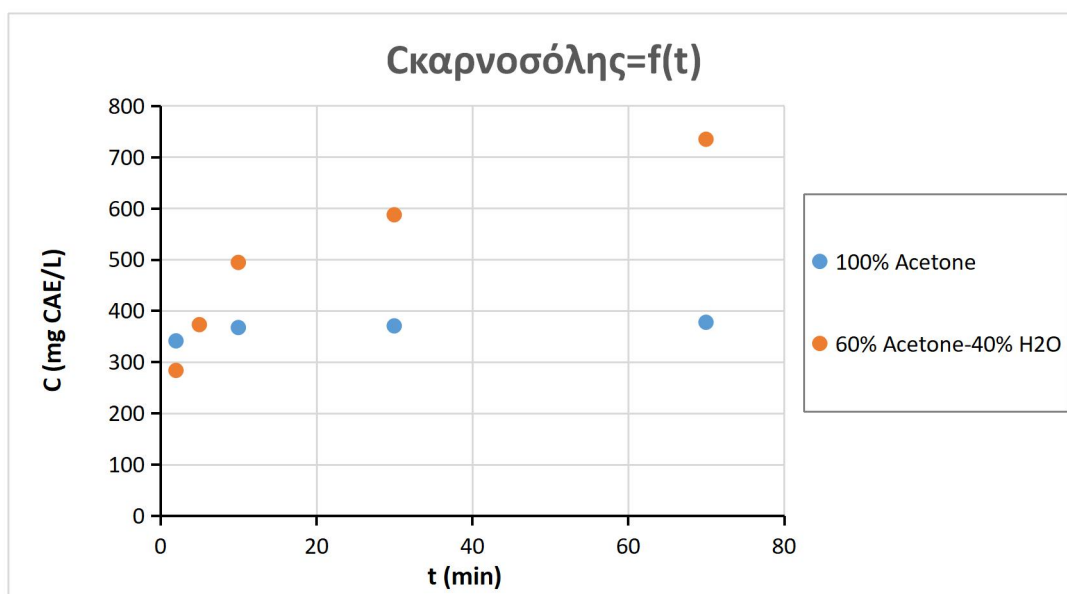
Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.23, το εκχύλισμα με διαλύτη το καθαρό νερό και το εκχύλισμα του ακετονικού μίγματος 60% Acetone - 40% H₂O εκχυλίζουν την μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος με γρήγορο ρυθμό, ακολουθεί το εκχύλισμα του ακετονικού μίγματος 40% Acetone - 60% H₂O, στην συνέχεια το 80% Acetone - 20% H₂O με παρόμοιο ρυθμό εκχύλισης και τέλος το εκχύλισμα 100% Acetone, όπου ο ρυθμός εκχύλισης του ροσμαρινικού οξέος είναι αισθητά πιο βραδύς.



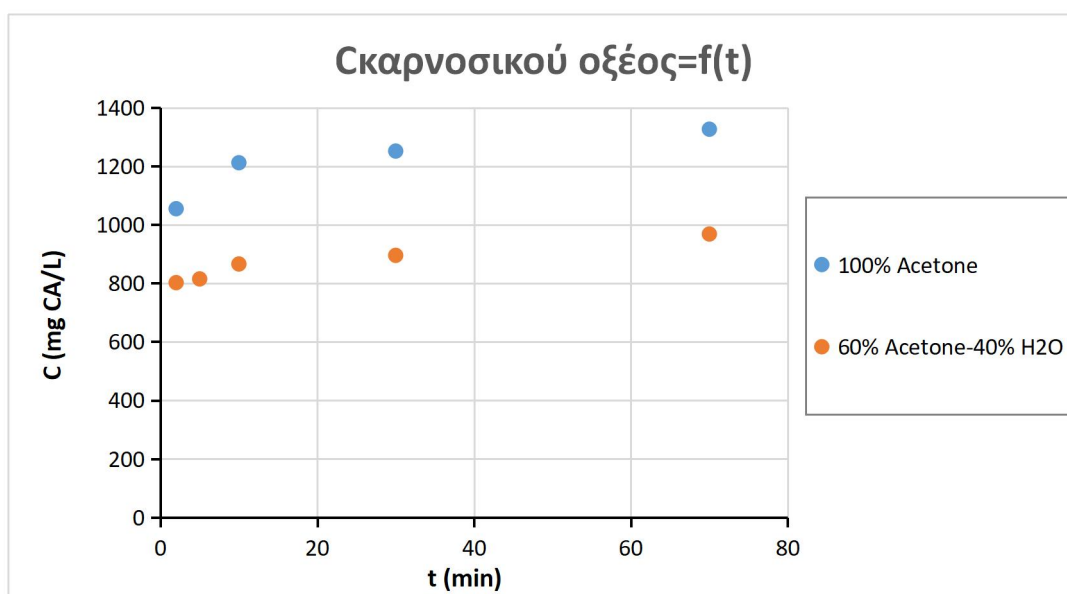
Διάγραμμα 5.1.24. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα ακετονικά διαλύματα και το νερό

Στο διάγραμμα 5.1.24 παρατηρούμε ότι στο ακετονικό εκχύλισμα 60% Acetone - 40% H₂O επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση φλαβονοειδών με τον πιο ταχύ ρυθμό αύξησης, ακολουθεί το ακετονικό εκχύλισμα 80% Acetone - 20%

H₂O και το εκχύλισμα 40% Acetone - 60% H₂O, και τέλος το εκχύλισμα 100% Acetone και το εκχύλισμα 100% H₂O με παρόμοιο ρυθμό εκχύλισης των φλαβονοειδών.

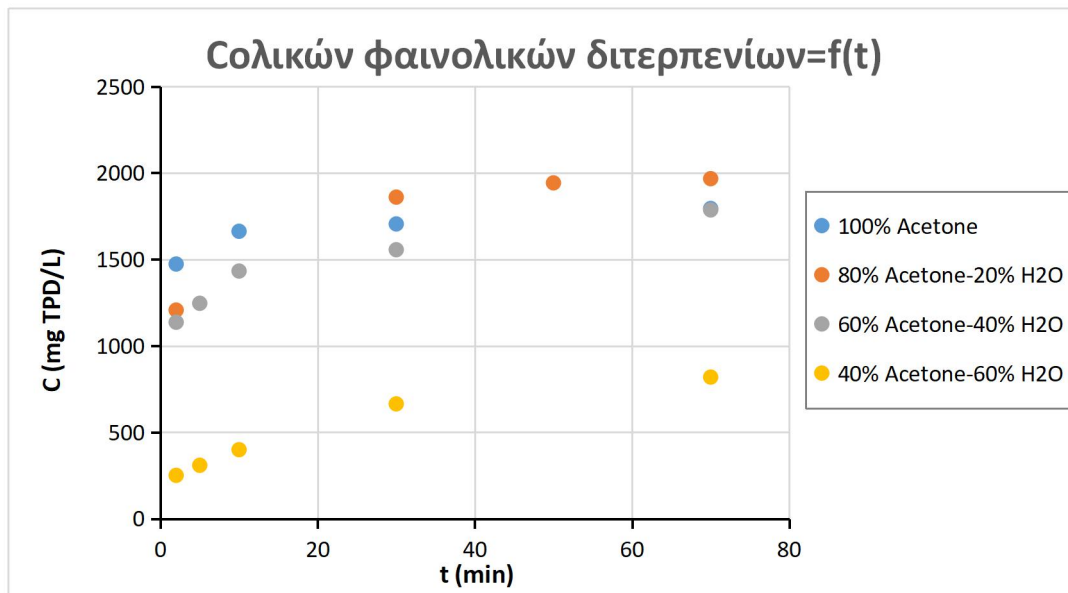


Διάγραμμα 5.1.25. Συγκέντρωση καρνοσόλης στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα ακετονικά διαλύματα



Διάγραμμα 5.1.26. Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα ακετονικά διαλύματα

Στα διαγράμματα 5.1.25 και 5.1.26 δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα της συγκέντρωσης της καρνοσόλης και του καρνοσικού οξέος για το ακετονικό εκχύλισμα 80% Acetone - 20% H₂O και για το εκχύλισμα 40% Acetone - 60% H₂O λόγω αδυναμίας ταυτοποίησης των αντίστοιχων κορυφών τους στο χρωματογράφημα έτσι όπως προέκυψαν από την μέθοδο carnosic της HPLC.



Διάγραμμα 5.1.27. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για τα ακετονικά διαλύματα

Όπως παρατηρούμε στα διαγράμματα 5.1.25 και 5.1.26, το ακετονικό εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O σημειώνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση καρνοσόλης με μεγαλύτερο ρυθμό εκχύλισης από το εκχύλισμα με διαλύτη 100% Acetone, σε αντίθεση με το καρνοσικό οξύ όπου το εκχύλισμα 100% Acetone επιτυγχάνει μεγαλύτερη συγκέντρωση με ταχύτερο ρυθμό εκχύλισης. Όσον αφορά τα ολικά φαινολικά διτερπένια (διάγραμμα 5.1.27), το ακετονικό εκχύλισμα 80% Acetone - 20% H₂O επιτυγχάνει την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση με γρήγορο ρυθμό εκχύλισης, ακολουθεί το εκχύλισμα 100% Acetone και το ακετονικό εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O με μεγαλύτερο ρυθμό εκχύλισης από το προηγούμενο και τέλος το ακετονικό εκχύλισμα με διαλύτη 40% Acetone - 60% H₂O επιτυγχάνει την μικρότερη τελική συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων.

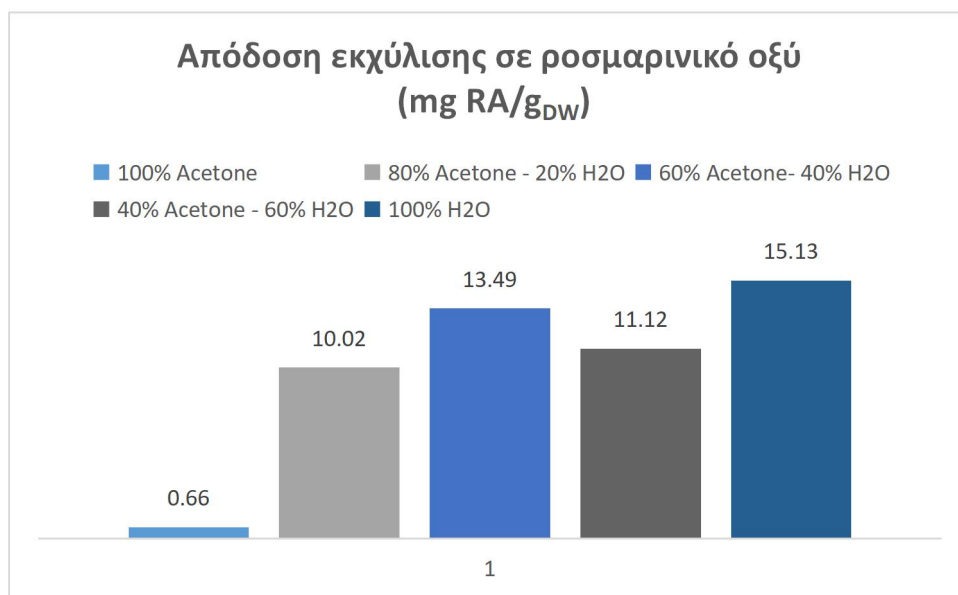
Στον πίνακα 5.1.13 παρουσιάζονται οι παράμετροι των κινητικών μοντέλων.

Εκχύλισμα	100% Acetone			80% Acetone-20% H ₂ O			60% Acetone-40% H ₂ O			40% Acetone-60% H ₂ O			100% H ₂ O		
Μοντέλο μεταφοράς μάζας															
	α	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	α	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	α	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	α	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	α	$D_{\text{eff}} \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²
Ροσμρινικό οξύ	1,03	37,60	0,926	0,30	14,52	0,943	5,20	37,80	0,977	0,45	15,66	0,921	0,63	37,80	0,999
Φλαβονοειδή	1,62	20,57	0,999	0,30	14,93	0,972	0,22	33,94	0,942	0,13	7,52	0,915	1,01	36,76	0,986
Καρνισόλη	2,60	53,16	0,930	-	-	-	0,50	35,82	0,986	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	1,72	43,13	0,922	-	-	-	0,90	5,01	0,945	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	1,19	42,40	0,898	0,90	20,16	0,861	0,78	12,43	0,944	0,14	5,12	0,925	-	-	-
Λογαριθμικό Μοντέλο															
	α	b	R ²	α	b	R ²	α	b	R ²	α	b	R ²	α	b	R ²
Ροσμρινικό οξύ	0,17	0,34	0,957	4,53	1,48	0,994	5,10	3,63	0,984	3,99	3,50	0,990	4,97	5,34	0,959
Φλαβονοειδή	0,60	3,92	0,932	5,10	1,96	0,945	7,86	0,69	0,921	4,21	-0,35	0,983	0,94	2,30	0,982
Καρνισόλη	0,46	6,76	0,916	-	-	-	5,75	3,77	0,987	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	3,39	20,31	0,973	-	-	-	2,13	15,13	0,943	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	4,00	28,56	0,968	10,23	21,27	0,991	8,28	19,81	0,979	7,78	1,49	0,958	-	-	-
Μοντέλο Peleg															
K_1 (min g _{DW} /mg GAE) K_2 (g _{DW} / mg GAE)	K_1	K_2	R ²	K_1	K_2	R ²	K_1	K_2	R ²	K_1	K_2	R ²	K_1	K_2	R ²
Ροσμρινικό οξύ	2,31	1,58	0,967	0,69	0,10	0,985	0,32	0,08	0,960	0,31	0,09	0,950	0,20	0,07	0,900
Φλαβονοειδή	0,07	0,21	0,918	0,55	0,08	0,940	0,70	0,06	0,954	1,53	0,11	0,985	0,31	0,26	0,901
Καρνισόλη	0,03	0,13	0,989	-	-	-	0,29	0,07	0,970	-	-	-	-	-	-
Καρνισικό οξύ	0,02	0,04	0,964	-	-	-	0,02	0,05	0,821	-	-	-	-	-	-
Ολικά φαινολικά διτερπένια	0,01	0,03	0,964	0,03	0,03	0,997	0,04	0,03	0,911	0,54	0,06	0,977	-	-	-

Πίνακας 5.1.13. Τιμές των παραμέτρων των κινητικών μοντέλων για κάθε συστατικό σε κάθε ακετονικό εκχύλισμα και το νερό

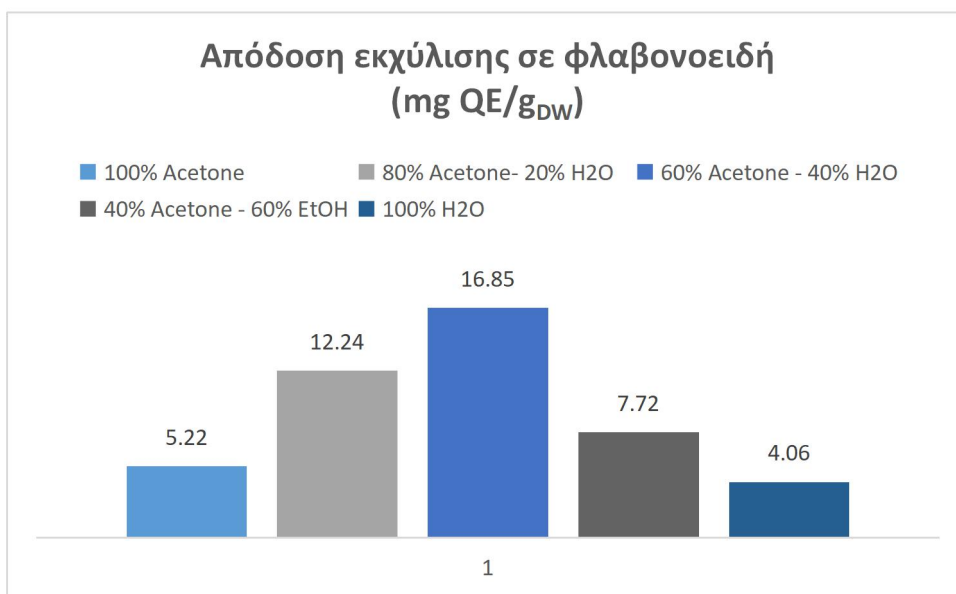
Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 5.1.13 παρατηρούμε αρκετά υψηλούς συντελεστές συσχέτισης κατά την εφαρμογή και των τριών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου και του μοντέλου Peleg, είναι αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,0005-1,616 και 0,001-3,630, αντίστοιχα, στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλιση, γεγονός που φανερώνει συμφωνία των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών. Βλέπουμε, λοιπόν, ότι υπάρχει καλή προσαρμογή των πειραματικών σημείων και με τα τρία κινητικά μοντέλα.

Οι τελικές αποδόσεις των εκχυλίσεων για καθένα από τα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου για κάθε διαλύτη παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.1.28, 5.1.29 και 5.1.30.



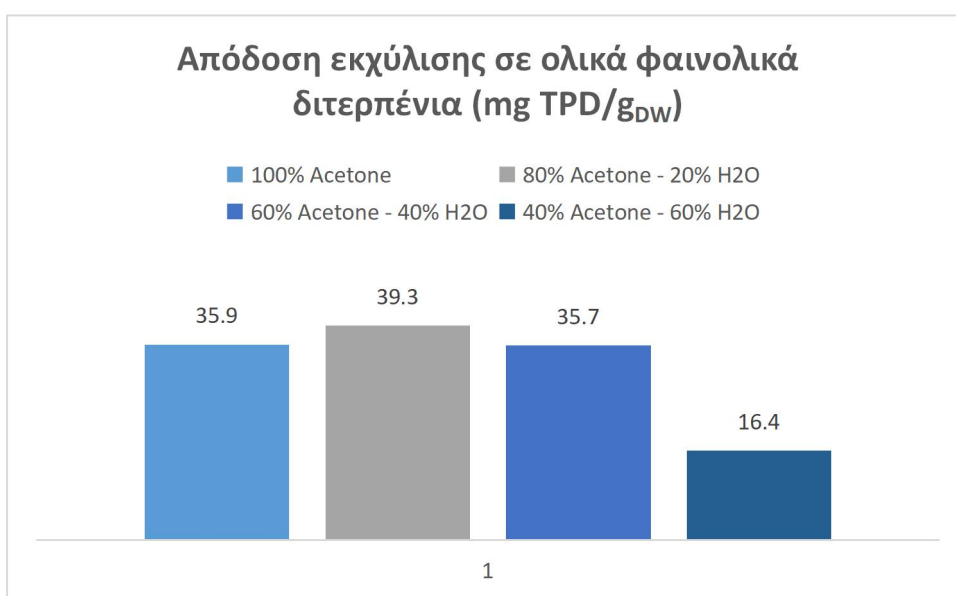
Διάγραμμα 5.1.28. Απόδοση της εκχύλισης σε ροσμαρινικό οξύ για κάθε ακετονικό εκχύλιση και το νερό

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.28, η απόδοση της εκχύλισης σε ροσμαρινικό οξύ αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού νερού στα ακετονικά εκχυλίσματα. Εξαιρέση αποτελεί το εκχύλιση με διαλύτη 40% Acetone - 60% H₂O, όπου παρά το μεγαλύτερο ποσοστό νερού ανάμεσα στα ακετονικά μίγματα παρουσιάζει μικρότερη απόδοση σε ροσμαρινικό από εκείνο με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O, κάτι που πιθανότατα οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα. Η μέγιστη απόδοση, όπως ήταν αναμενόμενο, σημειώνεται στο εκχύλιση με διαλύτη 100% H₂O και η ελάχιστη σε εκείνο με διαλύτη 100% Acetone.



Διάγραμμα 5.1.29. Απόδοση της εκχύλισης σε φλαβονοειδή για κάθε ακετονικό εκχύλισμα και το νερό

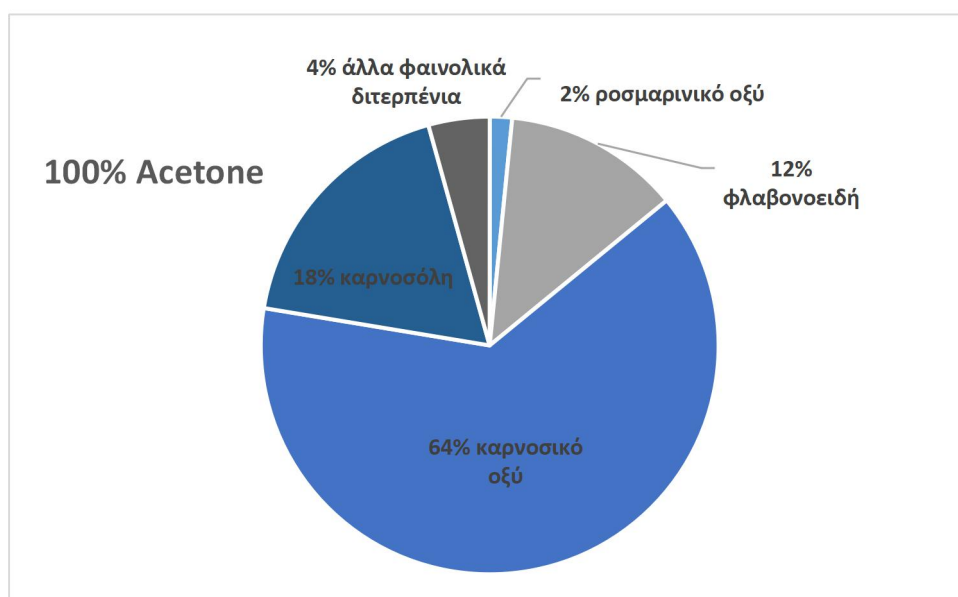
Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.29, οι μέτριοι σε πολικότητα διαλύτες, δηλαδή τα μίγματα ακετόνης-νερού, εμφανίζουν την μεγαλύτερη απόδοση σε φλαβονοειδή, με τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O να σημειώνει την μέγιστη απόδοση φλαβονοειδών. Ακολουθεί ο διαλύτης 80% Acetone - 20% H₂O, έπειτα ο διαλύτης 40% Acetone - 60% H₂O και ο διαλύτης 100% Acetone και τέλος ο διαλύτης 100% H₂O πετυχαίνει την μικρότερη τελική απόδοση εκχύλισης σε φλαβονοειδή.



Διάγραμμα 5.1.30. Απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά διτερπένια για κάθε ακετονικό εκχύλισμα

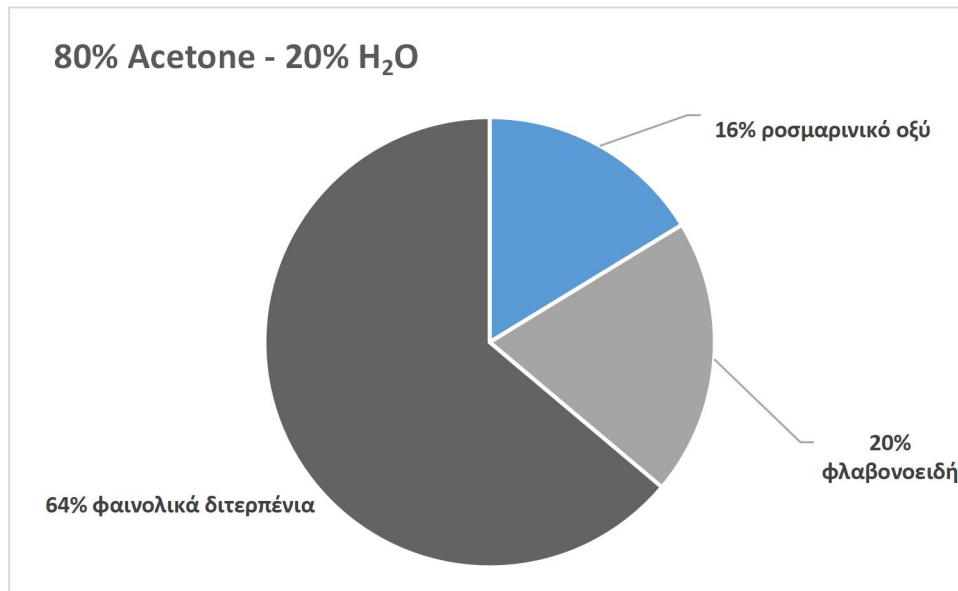
Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.1.30, η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά διτερπένια δεν εμφανίζει ξεκάθαρη τάση. Τα εκχυλίσματα με 100% Acetone έως και 60% Acetone - 40% H₂O εμφανίζουν παρόμοιες τιμές αποδόσεων, υπερδιπλάσιες εκείνων με διαλύτη 40% Acetone - 60% H₂O.

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται η σύσταση κάθε εκχυλίσματος:



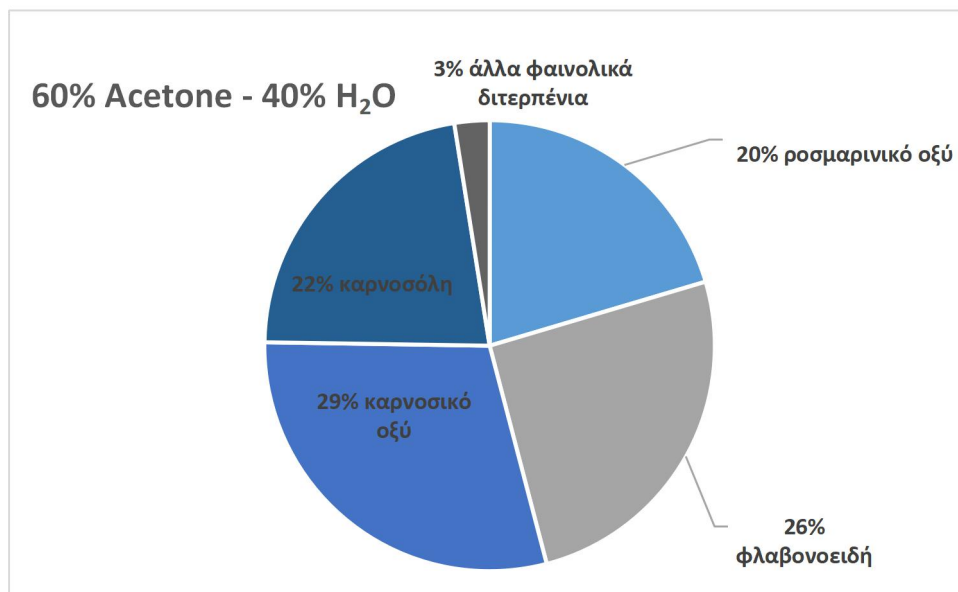
Διάγραμμα 5.1.31. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 100% Acetone

Το εκχύλισμα με διαλύτη 100% Acetone περιλαμβάνει σε μεγάλο ποσοστό φαινολικά διτερπένια (86%), όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο, φλαβονοειδή (12%) και ροσμαρινικό οξύ σε πολύ μικρό ποσοστό (2%).



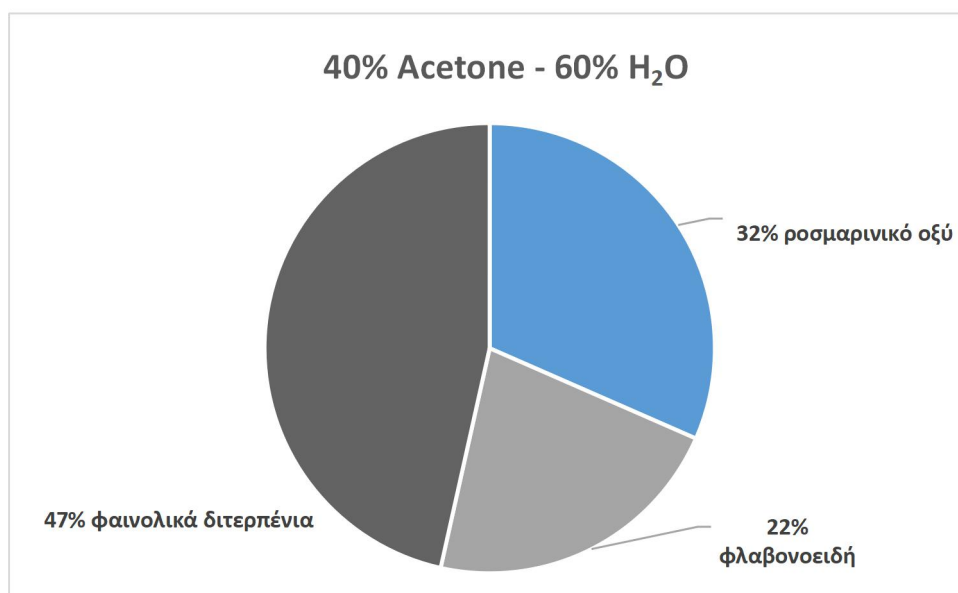
Διάγραμμα 5.1.38. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O

Το εκχύλισμα με διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 64%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 20% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 16%. Βλέπουμε, λοιπόν, ότι η αύξηση της πολικότητας του διαλύτη οδήγησε σε μείωση των φαινολικών διτερπενίων και αύξηση του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών.



Διάγραμμα 5.1.39. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% Acetone-40% H₂O

Το εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 54%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 26% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 20%. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι με την περαιτέρω αύξηση της πολικότητας του διαλύτη της εκχύλισης, αυξήθηκε το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών, ενώ μειώθηκε το ποσοστό των ολικών φαινολικών διτερπενίων.



Διάγραμμα 5.1.40. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O

Το εκχύλισμα με διαλύτη 40% Acetone - 60% H₂O περιέχει φαινολικά διτερπένια σε ποσοστό 47%, φλαβονοειδή σε ποσοστό 22% και ροσμαρινικό οξύ σε ποσοστό 32%. Όπως, ήταν αναμενόμενο παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό ροσμαρινικού οξέος ανάμεσα στα ακετονικά εκχυλίσματα και το μικρότερο ποσοστό ολικών φαινολικών διτερπενίων.

5.1.2.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

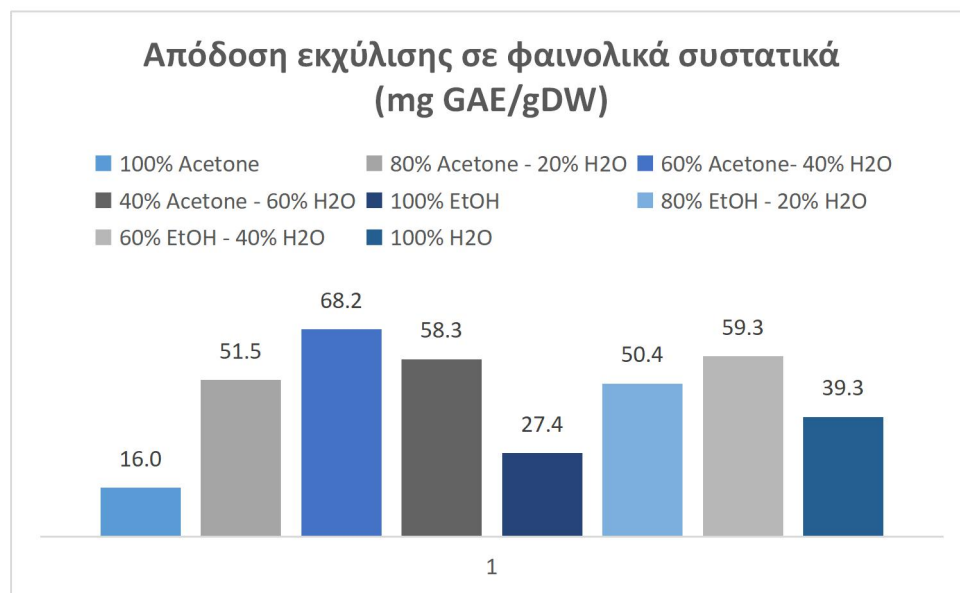
Πίνακας 5.1.15. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	GAEAC (mg GAE/L)
100% Acetone	568 ± 69
80% Acetone-20% H ₂ O	1153 ± 54
60% Acetone-40% H ₂ O	1394 ± 52
40% Acetone-60% H ₂ O	1337 ± 23
100% H ₂ O	1022 ± 11

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.1.15, παρατηρούμε ότι το εκχύλισμα με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1394 mg GAE/L) και εκείνο με διαλύτη 100% Acetone την μικρότερη (568 mg GAE/L). Παρατηρούμε ότι το νερό εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την ακετόνη, γεγονός που οφείλεται στην εκχύλιση μεγαλύτερης ποσότητας ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών στην περίπτωση του νερού. Τα μέτριας πολικότητας ακετονικά μίγματα παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες αντιοξειδωτικές δράσεις λόγω της παρουσίας περισσότερων φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα τους. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O έχει εκχυλίσει φλαβονοειδή στο μεγαλύτερο ποσοστό (26%) σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

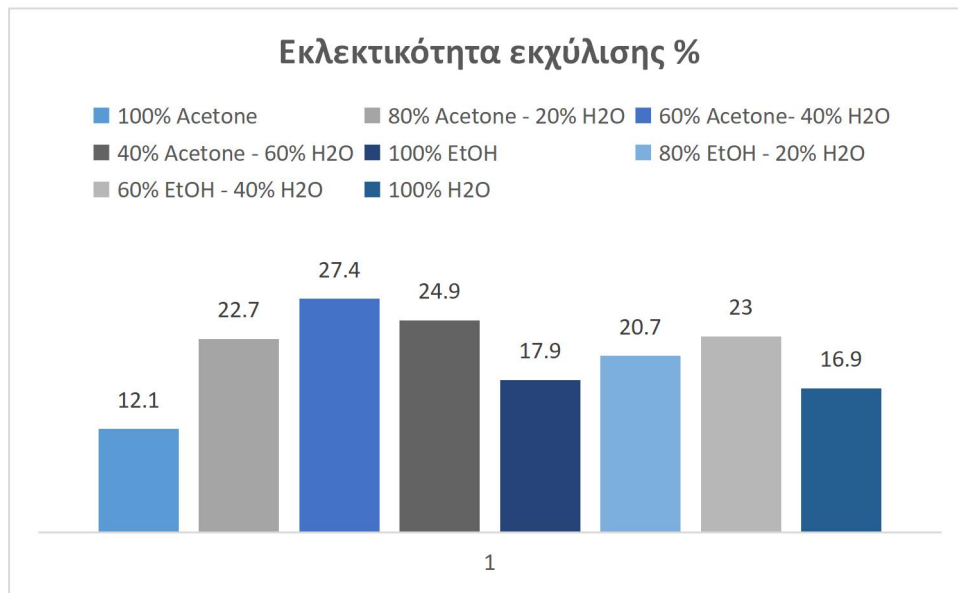
5.1.3. Σύγκριση αιθανολικών, ακετονικών μιγμάτων και νερού

5.1.3.1. Σύγκριση αποδόσεων σε ολικά φαινολικά, στερεά συστατικά και εκλεκτικότητα



Διάγραμμα 5.1.41. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά των εκχυλίσεων για κάθε αιθανολικό,ακετονικό διάλυμα και το νερό

Όπως παρατηρούμε στον διάγραμμα 5.1.41, την μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά σημειώνει ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O, ακολουθούν οι διαλύτες 60% EtOH - 40% H₂O και 40% Acetone - 60% H₂O με μικρή διαφορά μεταξύ τους και στην συνέχεια ακολουθούν οι διαλύτες 80% Acetone - 20% H₂O και 80% EtOH - 20% H₂O με επίσης μικρή διαφορά μεταξύ τους. Έπειτα, ακολουθεί ο διαλύτης του καθαρού νερού και τις μικρότερες αποδόσεις σημειώνουν οι διαλύτες της καθαρής αιθανόλης και της καθαρής ακετόνης. Από τα παραπάνω μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι τα μίγματα των οργανικών διαλυτών και στις δύο περιπτώσεις επιτυγχάνουν μεγαλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με τους αντίστοιχους καθαρούς διαλύτες και το νερό. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερες αποδόσεις σημειώθηκαν στα μίγματα που περιλαμβάνουν τον οργανικό διαλύτη σε ποσοστό 60%. Αυτό συμβαίνει καθώς οι διαλύτες μέτριας πολικότητας μπορούν να παραλαμβάνουν τα χαμηλής πολικότητας συστατικά του δεντρολίβανου, όπως είναι τα φαινολικά διτερπένια και τα φλαβονοειδή, αλλά και με το νερό που περιέχουν μπορούν να εκχυλίζουν και ροσμαρινικό οξύ.



Διάγραμμα 5.1.42. Εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε αιθανολικό, ακετονικό διάλυμα και το νερό

Το διάγραμμα 5.1.42 παρουσιάζει την εκλεκτικότητα κάθε διαλύτη ως προς τα φαινολικά συστατικά. Είναι φανερό ότι ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O επιτυγχάνει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης (27,4%) και ακολουθούν τα υπόλοιπα μίγματα οργανικών διαλυτών με παραπλήσιες τιμές. Συγκεκριμένα, ακολουθούν οι διαλύτες 40% Acetone - 60% H₂O (24,9%), 60% EtOH - 40% H₂O (23,0%), 80% Acetone - 20% H₂O (22,7%) και 80% EtOH - 20% H₂O (20,7%). Έπειτα, ακολουθεί ο διαλύτης της καθαρής αιθανόλης (17,9%) και τις μικρότερες αποδόσεις σημειώνουν οι διαλύτες του καθαρού νερού (16,9%) και της καθαρής ακετόνης (12,1%). Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την απόδοση σε φαινολικά συστατικά και από τα στερεά που εκχυλίζει. Ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O εκχύλισε μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών άλλα μικρότερη ποσότητα στερεών σε σχέση με τον διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O, με αποτέλεσμα να έχει τη μέγιστη εκλεκτικότητα.

Από τους πίνακες 5.1.5 και 5.1.12, βλέπουμε τις αποδόσεις σε στερεές ουσίες για κάθε διαλύτη. Η καθαρή ακετόνη εκχύλισε τη μικρότερη ποσότητα στερεών όμως δεν είχε υψηλή απόδοση σε φαινολικά συστατικά. Ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O εμφάνισε την μεγαλύτερη απόδοση σε στερεά τα οποία του μείωσαν την εκλεκτικότητα, παρά το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο. Οι διαλύτες 80% Acetone - 20% H₂O και 80% EtOH - 20% H₂O ενώ σημείωσαν παραπλήσιες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά, παρουσιάζουν διαφορά στην εκλεκτικότητα της εκχύλισης, γεγονός που οφείλεται στην εκχύλιση περισσότερων στερεών από το αιθανολικό μίγμα με την επακόλουθη μείωση της εκλεκτικότητας. Το νερό ενώ σημείωσε την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά από την καθαρή αιθανόλη, εμφάνισε μικρότερη εκλεκτικότητα, λόγω της υψηλότερης απόδοσης σε στερεά.

5.1.3.2. Σύγκριση αποδόσεων των συστατικών κάθε εκχύλισματος με βάση τη χρωματογραφική ανάλυση HPLC

Πίνακας 5.1.16. Αποδόσεις για κάθε συστατικό στο συνολικό εκχύλισμα για κάθε διαλύτη

Εκχύλισμα	Ροσμαρινικό οξύ (mg RA/g DW)	Φλαβονοειδή (mg QE/g DW)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (mg TPD/g DW)
100% EtOH	2,16	5,04	34,1
80% EtOH-20% H ₂ O	8,24	8,97	36,6
60% EtOH-40% H ₂ O	10,1	11,8	33,1
100% H ₂ O	14,2	5,10	-
100% Acetone	0,66	5,22	35,9
80% Acetone-20% H ₂ O	10,0	12,2	39,3
60% Acetone-40% H ₂ O	13,5	16,8	35,7
40% Acetone-60% H ₂ O	11,1	7,71	16,4

Με βάση τον πίνακα 5.1.16, παρατηρούμε μείωση της απόδοσης του ροσμαρινικού με την μείωση της πολικότητας του διαλύτη. Το καθαρό νερό εμφανίζει την μεγαλύτερη απόδοση ροσμαρινικού οξέος (14,2 mg RA/g_{DW}).

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, στο νερό, την καθαρή ακετόνη και αιθανόλη οι αποδόσεις είναι μικρές. Αυτό συμβαίνει διότι οι ακραίες πολικότητας διαλύτες εκχυλίζουν συγκεκριμένες ομάδες φλαβονοειδών. Οι διαλύτες των αιθανολικών και ακετονικών μιγμάτων παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε φλαβονοειδή, καθώς έχουν την ικανότητα παραλαμβάνουν τα μέτριας πολικότητας φλαβονοειδή που βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο δεντρολίβανο. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O σημειώνει την μεγαλύτερη απόδοση σε φλαβονοειδή (16,8 mg QE/g_{DW}).

Τέλος όσον αφορά τα ολικά φαινολικά διτερπένια, ο διαλύτης 80% Acetone - 20% H₂O σημειώνει την μεγαλύτερη απόδοση (39,3 mg TPD/g_{DW}). Η καθαρή ακετόνη παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση από την καθαρή αιθανόλη, οπότε και συμπεραίνουμε ότι η ακετόνη βρίσκεται πολύ κοντά στην πολικότητα με τα φαινολικά διτερπένια και αλληλεπιδρά καλύτερα με αυτά. Ο 40% Acetone - 60% H₂O εμφανίζει την μικρότερη απόδοση (16,4 mg TPD/g_{DW}), όπως ήταν αναμενόμενο αφού η ακετόνη βρίσκεται σε μικρότερο ποσοστό στον διαλύτη.

5.1.3.3. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Πίνακας 5.1.38. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GA/L) για κάθε διαλύτη

Διαλύτης	GAEAC (mg GAE/L)
100% EtOH	619 ± 3
80% EtOH-20% H ₂ O	1088 ± 60
60% EtOH-40% H ₂ O	1196 ± 69
100% Acetone	568 ± 69
80% Acetone-20% H ₂ O	1153 ± 54
60% Acetone-40% H ₂ O	1394 ± 52
40% Acetone-60% H ₂ O	1337 ± 23
100% H ₂ O	1022 ± 11

Με βάση τον πίνακα 5.1.38, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζει ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O (1394 mg GAE/L), ακολουθεί με παραπλήσια τιμή ο διαλύτης 40% Acetone - 60% H₂O και στην συνέχεια ακολουθούν , με επίσης κοντινές τιμές, οι διαλύτες 60% EtOH - 40% H₂O, 80% Acetone - 20% H₂O, 80% EtOH - 20% H₂O, 100% H₂O και τέλος οι διαλύτες 100% EtOH και 100% Acetone. Αν συγκρίνουμε τα παραπάνω αποτελέσματα με τις αποδόσεις των φαινολικών συστατικών που μελετήσαμε στην παράγραφο 5.1.3.1, παρατηρούμε την ίδια τάση, συνεπώς μεγαλύτερη αποδόση φαινολικών ισοδυναμεί με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

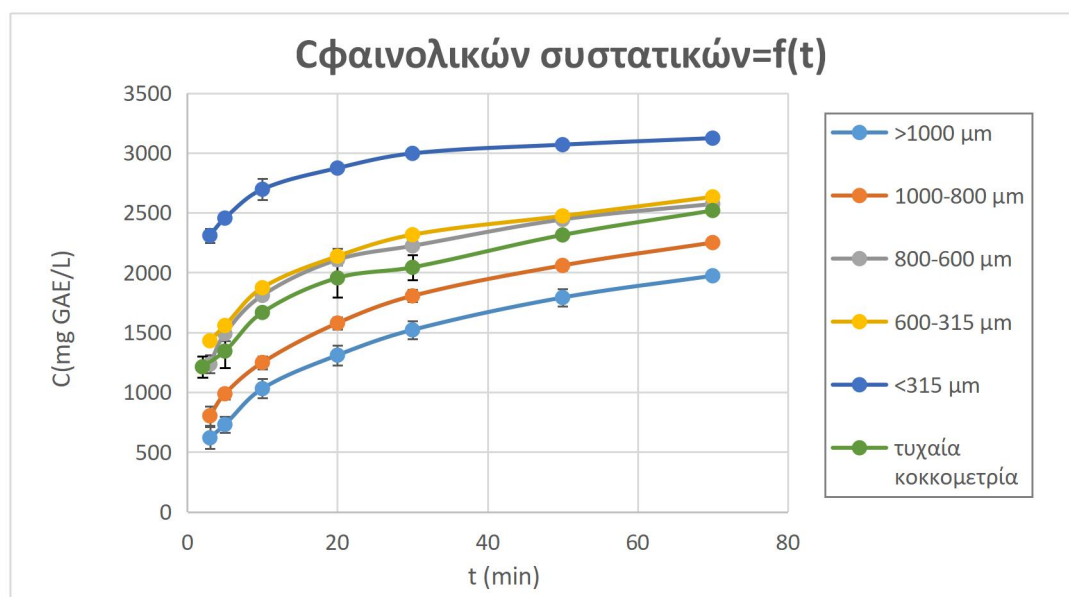
5.2. Επίδραση της κοκκομετρίας

Με διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O πραγματοποιήθηκε μια σειρά εκχυλίσεων διαλείποντος έργου του δεντρολίβανου σε διαφορετικές κοκκομετρίες. Αφού ζυγίστηκαν 200 g αλεσμένου δεντρολίβανου, με την χρήση ειδικών κοσκίνων επιτεύχθηκαν οι εξής κοκκομετρίες:

- ✓ > 1000 μm (23% της συνολικής μάζας)
- ✓ 1000-800 μm (21% της συνολικής μάζας)
- ✓ 800-600 μm (20% της συνολικής μάζας)
- ✓ 600-315 μm (24% της συνολικής μάζας)
- ✓ <315 μm (12% της συνολικής μάζας)

Εξετάζεται, λοιπόν η επίδραση της κοκκομετρίας στην απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικά, στην σύσταση του τελικού εκχυλίσματος στα διάφορα συστατικά του δεντρολίβανου, που ποσοτικοποιούνται μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC, και στην αντιοξειδωτική ικανότητα, που προσδιορίζεται μέσω της μεθόδου DPPH.

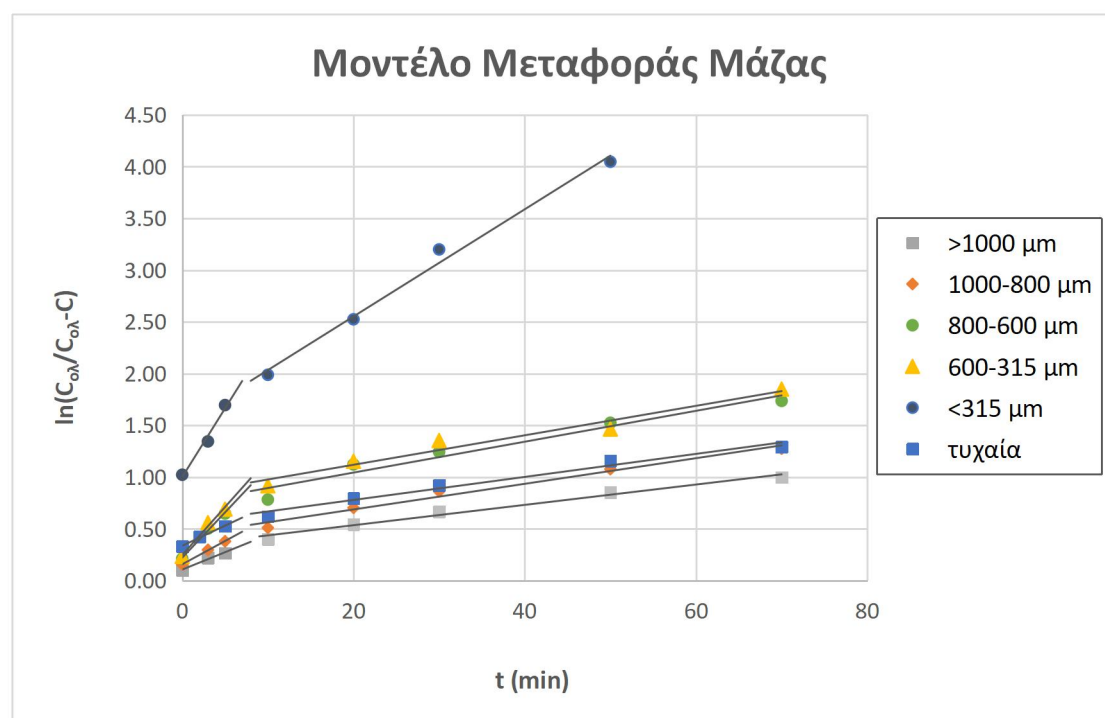
5.2.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη



Διάγραμμα 5.2.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε κοκκομετρία

Με βάση το διάγραμμα 5.2.1 παρατηρούμε ότι με μείωση της κοκκομετρίας του δεντρολίβανου επιτυγχάνονται υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών στο εκχύλισμα. Οι ρυθμοί αύξησης των συγκεντρώσεων των φαινολικών είναι παρόμοιες με εξαίρεση την μικρότερη κοκκομετρία <315 μm, όπου ο ρυθμός εμφανίζεται αισθητά μειωμένος μετά τα 5 min εκχύλισης, λόγω ταχύτατης διάλυσης των φαινολικών συστατικών στην αρχή της διεργασίας.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Ως C_{∞} ή $C_{ολ}$ έχει επιλεγθεί η συγκέντρωση που προέκυψε στην εκχύλιση με την μικρότερη κοκκομετρία (<315 μm) και ως ακτίνα του υλικού έχει θεωρηθεί η μέση τιμή κάθε κλάσματος για κάθε κοκκομετρία αντίστοιχα. Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν με την εφαρμογή του μοντέλου, δεν είναι ικανοποιητικοί, με εύρος τιμών μεταξύ 0,932-0,985 στο σύνολο των πειραμάτων. Από την μορφή των διαγραμμάτων, ήταν φανερή η ύπαρξη δύο ρυθμών εκχύλισης, ενός γρήγορου αρχικού ρυθμού μέχρι τα 5 min και ενός αργού ρυθμού από τα 10 min μέχρι το τέλος της εκχύλισης στα 70 min. Συνεπώς, στο διάγραμμα 5.2.2 παρουσιάζεται η προσαρμογή του μοντέλου με δύο ευθείες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το γρήγορο και αργό στάδιο της εκχύλισης αντίστοιχα για κάθε κοκκομετρία.



Διάγραμμα 5.2.2. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε κοκκομετρία

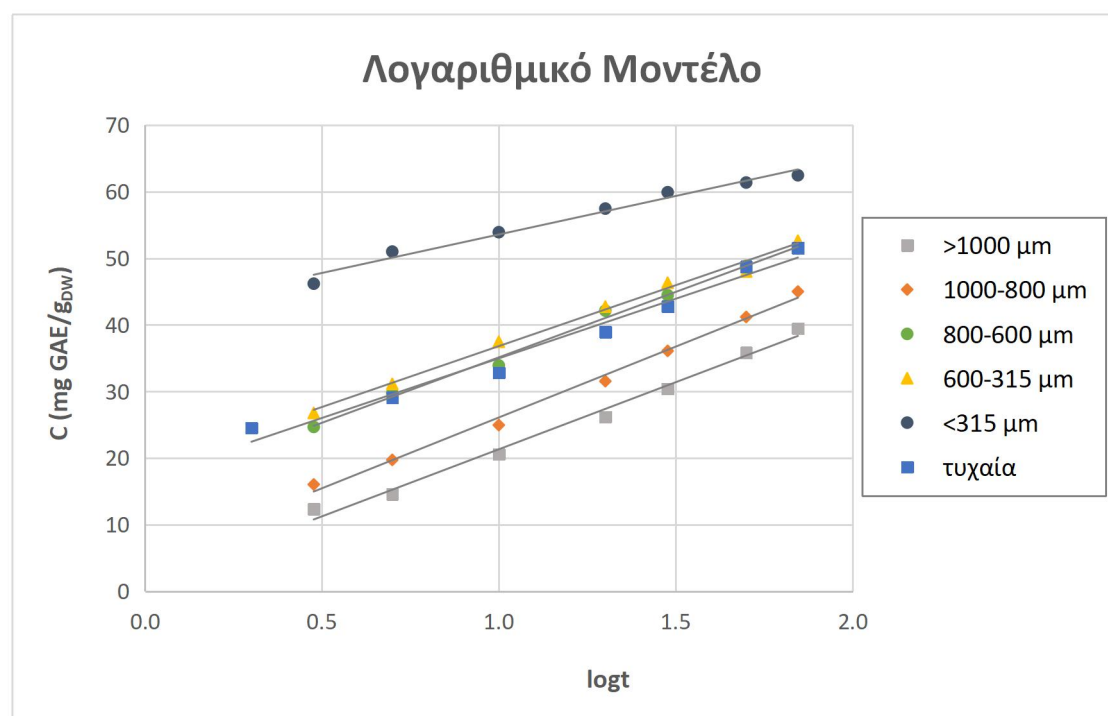
Οι συντελεστές συσχέτισης από την εφαρμογή των δύο ευθειών σε κάθε κοκκομετρία είναι αρκετά καλύτεροι με εύρος τιμών 0,953-0,999.

Πίνακας 5.2.1. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε κοκκομετρία

Κοκκομετρία	Παράμετροι του μοντέλου μεταφοράς μάζας	
	$D_{fast} \cdot 10^{-12} (m^2/s)$	$D_{slow} \cdot 10^{-12} (m^2/s)$
> 1000 μm	127,79	16,98
1000-800 μm	61,62	16,57
800-600 μm	72,56	12,34
600-315 μm	32,83	5,02
<315 μm	5,56	8,69
Τυχαία	40,52	11,59

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 5.2.1 δεν παρατηρείται η αναμενόμενη τάση αύξησης των συντελεστών διάχυσης και στα δύο στάδια της εκχύλισης, παρά την αύξηση των αντίστοιχων ρυθμών εκχύλισης με την μείωση της κοκκομετρίας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο σύνολο των αυθαίρετων παραδοχών που έχουν γίνει για την εφαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, όπως η θεώρηση του δεντρολίβανου ως σφαίρα σταθερής διαμέτρου, η επιλογή των αρχικών συγκεντρώσεων ($t=0$) και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Παρουσιάζεται παρακάτω το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου σε κάθε κοκκομετρία αντίστοιχα.



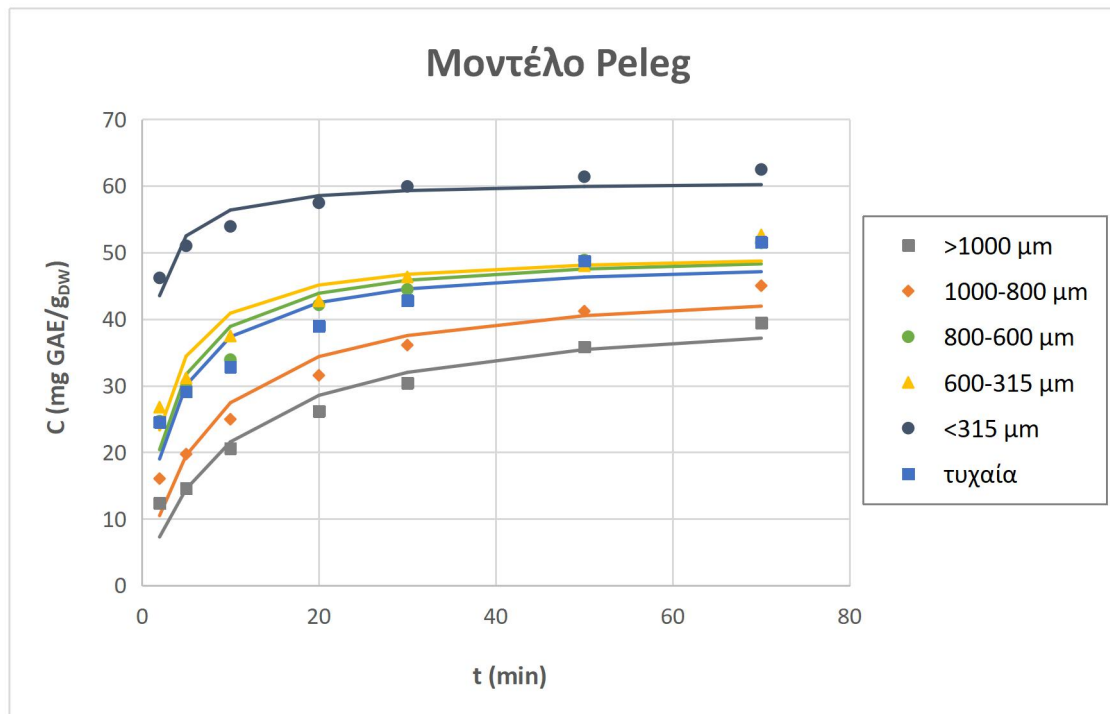
Διάγραμμα 5.2.3. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε κοκκομετρία

Πίνακας 5.2.2. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε κοκκομετρία

Κοκκομετρία	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
> 1000 μm	20,143	1,117	0,941
1000-800 μm	21,274	4,823	0,613
800-600 μm	19,342	16,168	0,269
600-315 μm	17,884	19,478	0,204
<315 μm	12,191	40,967	0,495
Τυχαία	17,905	17,065	2,199

Οι συντελεστές συσχέτισης είναι αρκετά υψηλοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,985-0,997. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,204-2,199, γεγονός που φανερώνει μια αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg : Η εφαρμογή του μοντέλου σε κάθε κοκκομετρία παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.2.4. Τα σημεία αντιστοιχούν στις πειραματικές τιμές των συγκεντρώσεων και οι καμπύλες αντιστοιχούν στις υπολογιζόμενες από το μοντέλο Peleg τιμές των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5.2.4. Εφαρμογή του μοντέλου Peleg για κάθε κοκκομετρία

Στον πίνακα 5.2.3 παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου και οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις.

Πίνακας 5.2.3. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε κοκκομετρία

Κοκκομετρία	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg		
	K_1 (min·g _{DW} / mg GAE)	K_2 (g _{DW} / mg GAE)	RMSD
> 1000 μm	0,227	0,024	5,762
1000-800 μm	0,147	0,022	8,121
800-600 μm	0,058	0,020	6,607
600-315 μm	0,046	0,020	10,433
<315 μm	0,013	0,016	4,797
Τυχαία	0,065	0,020	13,351

Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,923-0,975. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 4,797-13,351, συνεπώς δεν έχουμε τόσο καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων στο σύνολο των πειραμάτων όσο με το λογαριθμικό μοντέλο. Από τις σταθερές K_1 και K_2 υπολογίζουμε τις τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της σταθεράς ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών, αντίστοιχα, σε κάθε κοκκομετρία.

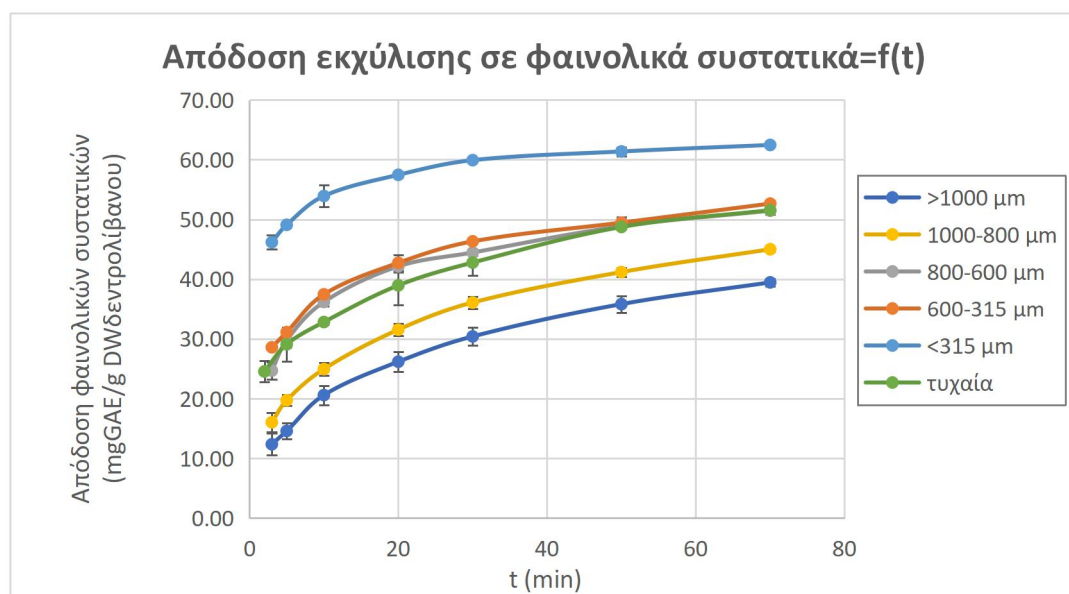
Πίνακας 5.2.4. Τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών για κάθε κοκκομετρία

Διαλύτης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg	
	B_0 (mg GAE/min _{g_{DW}})	C_e (mg GAE/g _{DW})
> 1000 μm	4	42
1000-800 μm	7	46
800-600 μm	17	50
600-315 μm	22	55
<315 μm	76	61
Τυχαία	15	49

Τα αποτελεσμάτα του πίνακα 5.2.4 συσχετίζονται ικανοποιητικά με τα πειραματικά δεδομένα, καθώς η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του στερεού ενισχύει τον μηχανισμό μεταφοράς μάζας στο στάδιο της διάχυσης μέσω της αύξησης της επιφάνειας επαφής του στερεού με τον διαλύτη και συνεπώς οδηγεί σε αύξηση του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών.

Από τη σύγκριση των μοντέλων συμπεραίνουμε ότι το μοντέλο μεταφοράς μάζας και το λογαριθμικό μοντέλο προσαρμόζονται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα.

5.2.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.2.12. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε κοκκομετρία του δεντρολίβανου

Σύμφωνα με το διάγραμμα 5.2.12, παρατηρούμε ότι οι καμπύλες απόδοσης για τις κοκκομετρίες 800-600 μm, 600-315 μm και της τυχαίας κοκκομετρίας είναι αρκετά κοντά μεταξύ τους και όσο προχωράει η εκχύλιση συμπίπτουν. Οι καμπύλες απόδοσης για τις κοκκομετρίες >1000 μm και 1000-800 μm ακολουθούν παρόμοιο ρυθμό αύξησης της. Η μικρότερη κοκκομετρία ενώ επιτυγχάνει την μεγαλύτερη τελική απόδοση φαινολικών συστατικών, παρουσιάζει τον μικρότερο ρυθμό αύξησης.

Πίνακας 5.2.5. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε κοκκομετρία

Κοκκομετρία	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
> 1000 μm	39,5 ± 0,6	214,2 ± 36,5	18,4
1000-800 μm	45,0 ± 0,4	227,6 ± 14,7	19,8
800-600 μm	51,5 ± 0,6	247,6 ± 13,6	18,2
600-315 μm	52,6 ± 0,5	278,0 ± 15,8	18,9
<315 μm	62,5 ± 0,3	220,8 ± 24,3	28,3
Τυχαία	51,5 ± 0,1	227,2 ± 7,0	22,7

Από τις τιμές του πίνακα 5.2.5 παρατηρούμε ότι η μείωση της κοκκομετρίας του δεντρολίβανου προκαλεί αύξηση της τελικής απόδοσης φαινολικών ουσιών, καθώς όσο πιο λεπτόκοκκο είναι το στερεό αυξάνεται η επιφάνεια επαφής του με τον διαλύτη, με αποτέλεσμα η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών να πραγματοποιείται αποδοτικότερα. Η απόδοση σε φαινολικά αυξάνεται από 39,5 mg

GAE/g_{DW} σε 62,5 mg GAE/g_{DW}. Η εκλεκτικότητα, ωστόσο, δεν εμφανίζει σαφή τάση, οπότε δεν μπορούμε να συμπεράνουμε πως επηρεάζεται από την αλλαγή της κοκκομετρίας. Στην μικρότερη κοκκομετρία των <315 μm έχει επιτευχθεί, ωστόσο, η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα (28,3%).

5.2.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC

Τα τελικά εκχυλίσματα των διαφόρων κοκκομετριών αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με σκοπό την ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών τους και την επακόλουθη ποσοτικοποίησή τους με την βοήθεια γνωστών καμπυλών αναφοράς. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Carnosic για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων.

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο carnosic (διαγράμματα C.8-C.12 και C.5 του παραρτήματος) , παρατηρούμε στα 230 nm τόσο τις κορυφές της καρνοσόλης όσο και τις μεγαλύτερες κορυφές του καρνοσικού οξέος για κάθε ακετονικό εκχύλισμα της αντίστοιχης κοκκομετρίας του δεντρολίβανου. Οι κορυφές της καρνοσόλης και του καρνοσικού οξέος σε κάθε εκχύλισμα διαφορετικής κοκκομετρίας εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης. Στον πίνακα 5.2.6 παρουσιάζεται η σύσταση των εκχυλισμάτων σε φαινολικά διτερπένια.

Πίνακας 5.2.6. Σύσταση εκχυλίσματος σε φαινολικά διτερπένια για κάθε κοκκομετρία

Κοκκομετρία	Σύσταση εκχυλίσματος σε φαινολικά διτερπένια
> 1000 μm	85%
1000-800 μm	82%
800-600 μm	81%
600-315 μm	80%
<315 μm	78%

Με την μείωση της κοκκομετρίας παρατηρούμε μείωση της σύστασης των εκχυλισμάτων σε φαινολικά διτερπένια, χωρίς όμως να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές.

5.2.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

Πίνακας 5.2.7. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε κοκκομετρία

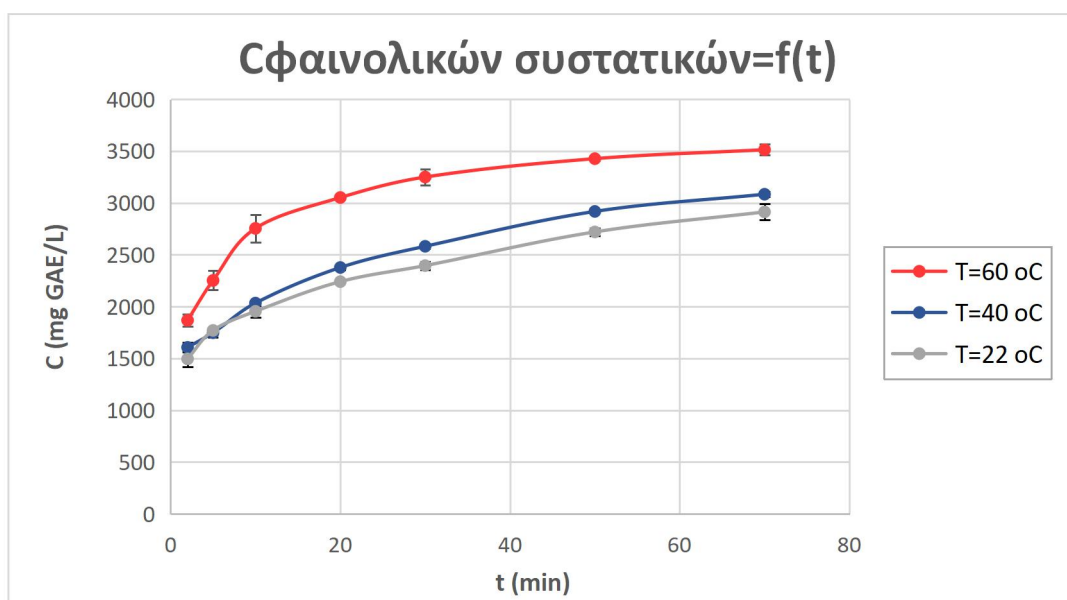
Κοκκομετρία	GAEAC (mg GAE/L)
> 1000 μm	953 \pm 0
1000-800 μm	1028 \pm 37
800-600 μm	1461 \pm 9
600-315 μm	1595 \pm 43
<315 μm	1678 \pm 57

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.2.7, παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σημειώνεται στην μικρότερη κοκκομετρία <315 μm (1678 mg GAE/L) και η μικρότερη στην μεγαλύτερη κοκκομετρία >1000 μm (953 mg GAE/L). Είναι φανερό, λοιπόν από τα αποτελέσματά μας, ότι η μείωση της κοκκομετρίας του υλικού οδηγεί σε αύξηση τόσο του ολικού φαινολικού περιεχομένου, όσο και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος.

5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας

Παρακάτω πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην κινητική και στην τελική απόδοση της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό, ως διαλύτης των εκχυλίσεων επιλέχθηκε ο διαλύτης 40% Acetone - 60% H₂O, λόγω της υψηλής του απόδοσης σε φαινολικά και της μικρότερης περιεκτικότητας σε ακετόνη και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε τρεις θερμοκρασίες (22°C, 40°C και 60°C). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH.

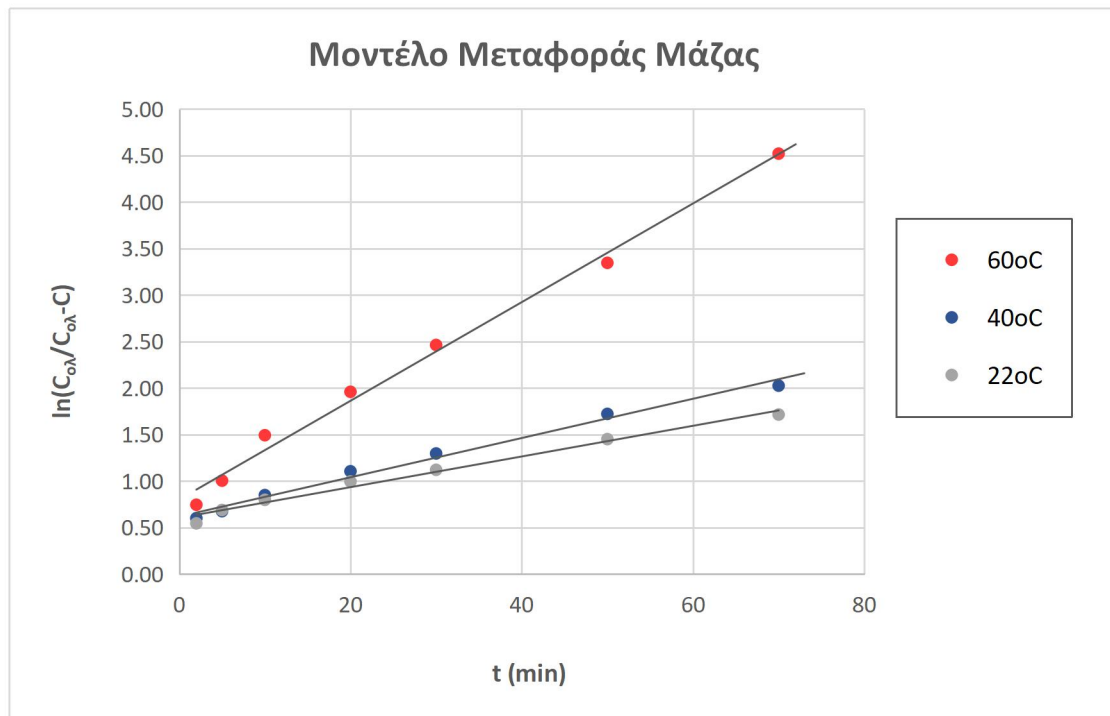
5.3.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη



Διάγραμμα 5.3.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε θερμοκρασία

Με βάση το διάγραμμα 5.3.1 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται τόσο ο ρυθμός της εκχύλισης όσο και η τελική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Ως C_{∞} ή $C_{ολ}$ έχει επιλεγθεί η συγκέντρωση που προέκυψε στο πείραμα υπερήχων με διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O. Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου.



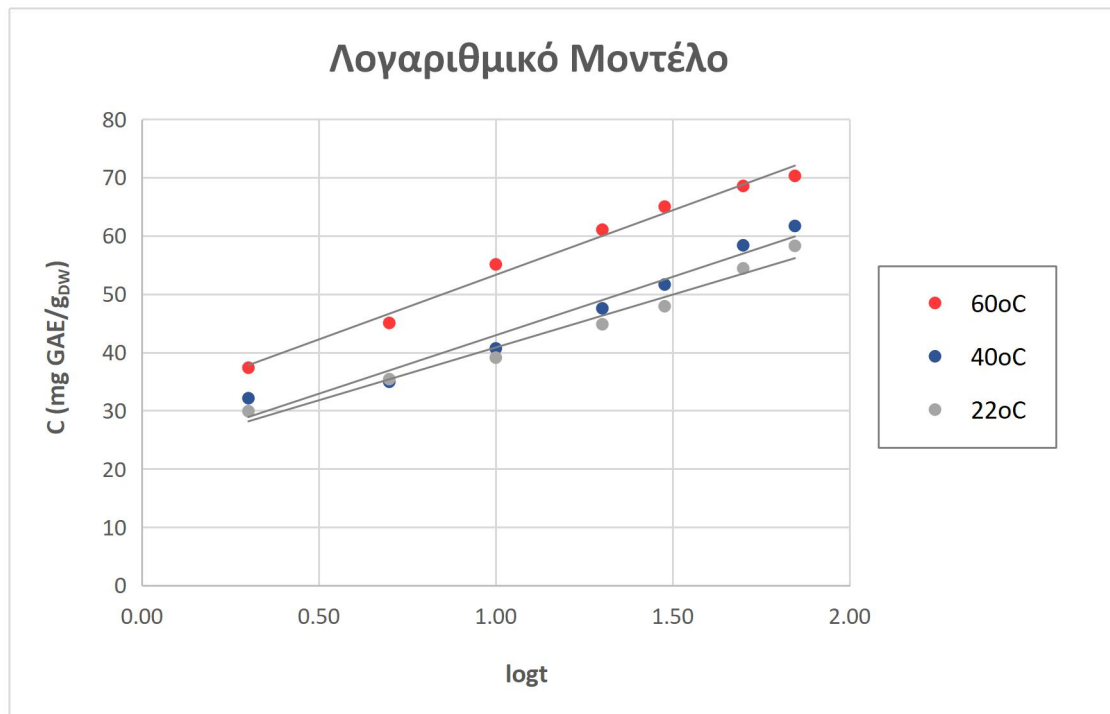
Διάγραμμα 5.3.2. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε θερμοκρασία

Πίνακας 5.3.1. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς για κάθε θερμοκρασία

T(°C)	Παράμετροι του μοντέλου μεταφοράς	
	α	$D \cdot 10^{-12} (m^2/s)$
60	0,80	55,35
40	0,62	22,04
22	0,61	17,23

Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 5.3.1, παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση του συντελεστή διάχυσης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,985-0,992 στο σύνολο των πειραμάτων.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου.



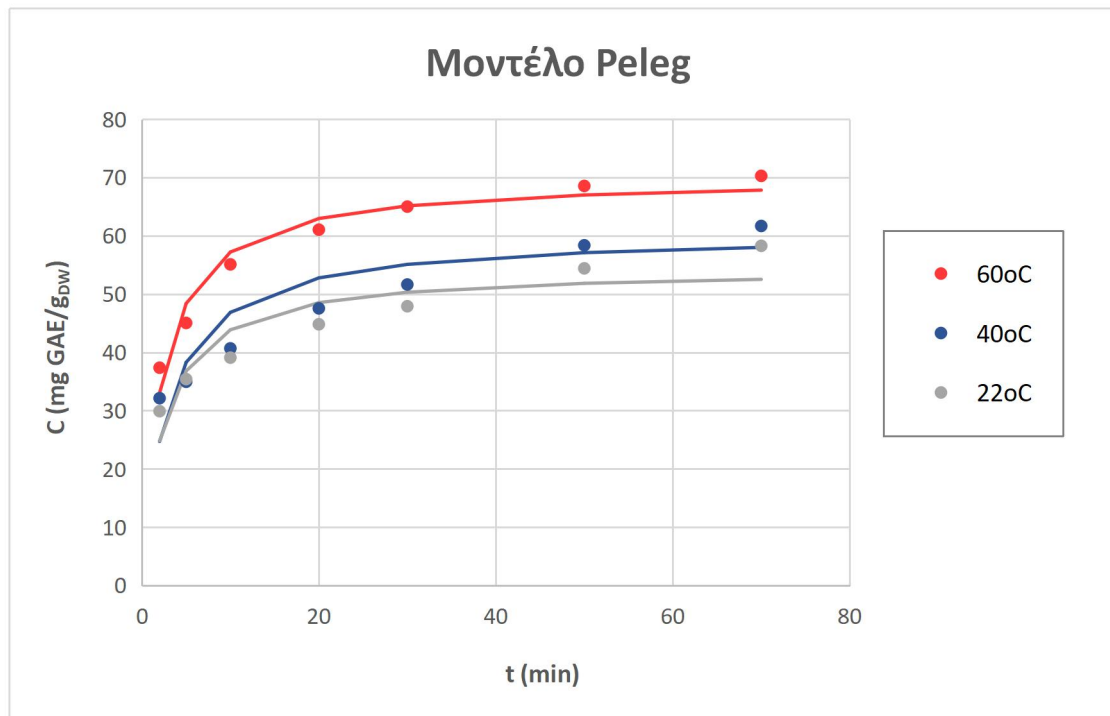
Διάγραμμα 5.3.3. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε θερμοκρασία

Πίνακας 5.3.2. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε θερμοκρασία

T(°C)	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
60	22,162	31,133	1,640
40	20,060	22,867	3,890
22	18,126	22,712	2,292

Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,965-0,988. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 1,640-3,890, γεγονός που φανερώνει συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg: Το διάγραμμα 5.3.4 παρουσιάζεται η εφαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα και οι υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των φαινολικών.



Διάγραμμα 5.3.4. Εφαρμογή του μοντέλου Peleg για κάθε θερμοκρασία

Στον πίνακα 5.3.4 παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου και οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις για κάθε θερμοκρασία.

Πίνακας 5.3.3. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε θερμοκρασία

T(°C)	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg		
	K ₁ (min·g _{dw} / mg GAE)	K ₂ (g _{dw} / mg GAE)	RMSD
60	0,032	0,014	6,594
40	0,043	0,017	9,017
22	0,044	0,018	15,731

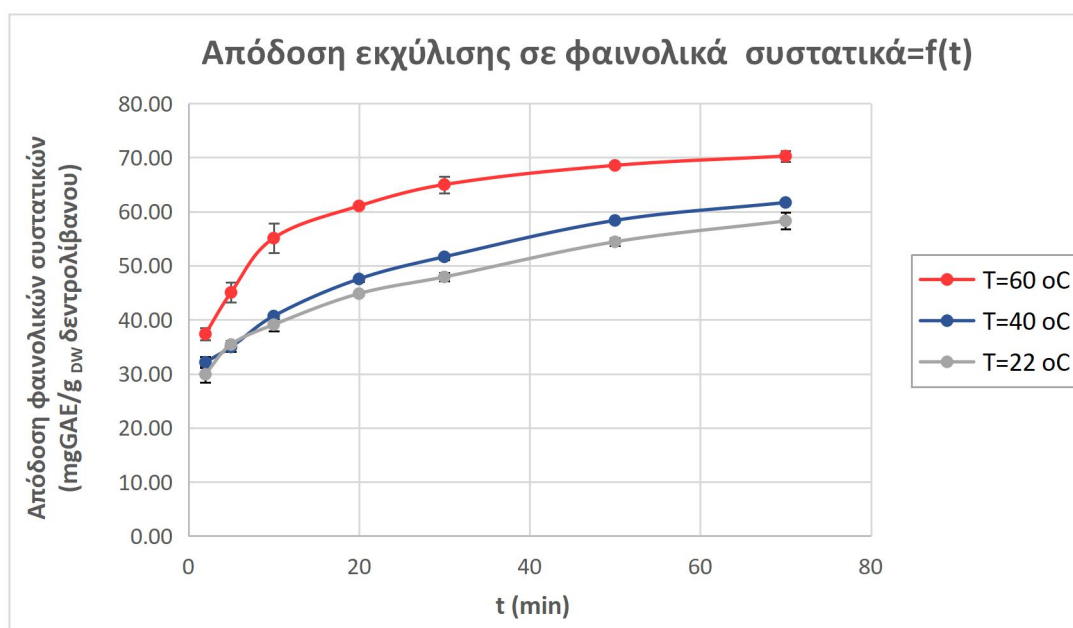
Σύμφωνα με τον πίνακα 5.3.3, παρατηρούμε μείωση των σταθερών ρυθμού και χωριτικότητας του μοντέλου του Peleg με την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι συντελεστές συσχέτισης δεν είναι τόσο ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων και κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,911-0,976. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 6,285-15,731, γεγονός που δεν φανερώνει τόσο καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων. Από τις τιμές των K₁ και K₂ υπολογίζονται ο αρχικός ρυθμός εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών για κάθε θερμοκρασία.

Πίνακας 5.3.4. Τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών για κάθε θερμοκρασία

T(°C)	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg	
	B ₀ (mg GAE/min·g _{DW})	C _e (mg GAE/g _{DW})
60	31,33	69,99
40	23,26	60,41
22	22,83	54,31

Από τις τιμές του πίνακα 5.3.4, παρατηρούμε ότι αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης προκαλεί αύξηση τόσο του αρχικού ρυθμού εκχύλισης όσο και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών. Στην θερμοκρασία, λοιπόν των 60°C σημειώνεται ο μεγαλύτερος αρχικός ρυθμός εκχύλισης (31,33 mg GAE/min·g_{DW}) και η μεγαλύτερη συγκέντρωση ισορροπίας (69,99 mg GAE/g_{DW}).

5.3.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.3.5. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε θερμοκρασία

Με βάση το διάγραμμα 5.3.5 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται ο ρυθμός αύξησης της απόδοσης των φαινολικών συστατικών.

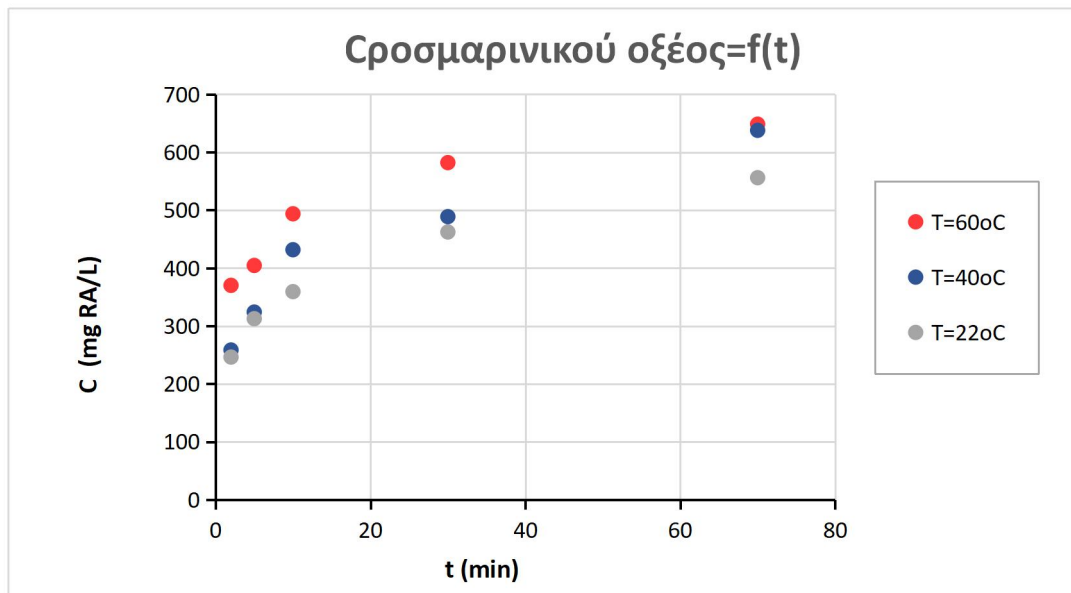
Πίνακας 5.3.5. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε θερμοκρασία

T(°C)	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
60	70,3 ± 1,0	338,9 ± 20,8	20,7
40	61,7 ± 0,4	268,9 ± 6,6	22,9
22	58,3 ± 1,5	234,5 ± 27,6	24,9

Από τις τιμές του πίνακα 5.3.5 παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται τόσο η απόδοση των φαινολικών όσο και των στερεών συστατικών, με επακόλουθη μείωση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της διαλυτότητας των στερεών ουσιών στον διαλύτη και κατ' επέκταση και των φαινολικών συστατικών. Στην θερμοκρασία των 60°C επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση φαινολικών ουσιών (70,3 mg GAE/g DW), η μέγιστη απόδοση στερεών συστατικών (338,9 mg στερεών/g DW) και η μικρότερη εκλεκτικότητα (20,7%). Αυτή η μείωση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης οφείλεται στο γεγονός ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, ο διαλύτης εκχυλίζει στερεά συστατικά που δεν ανήκουν στις πολυφαινόλες.

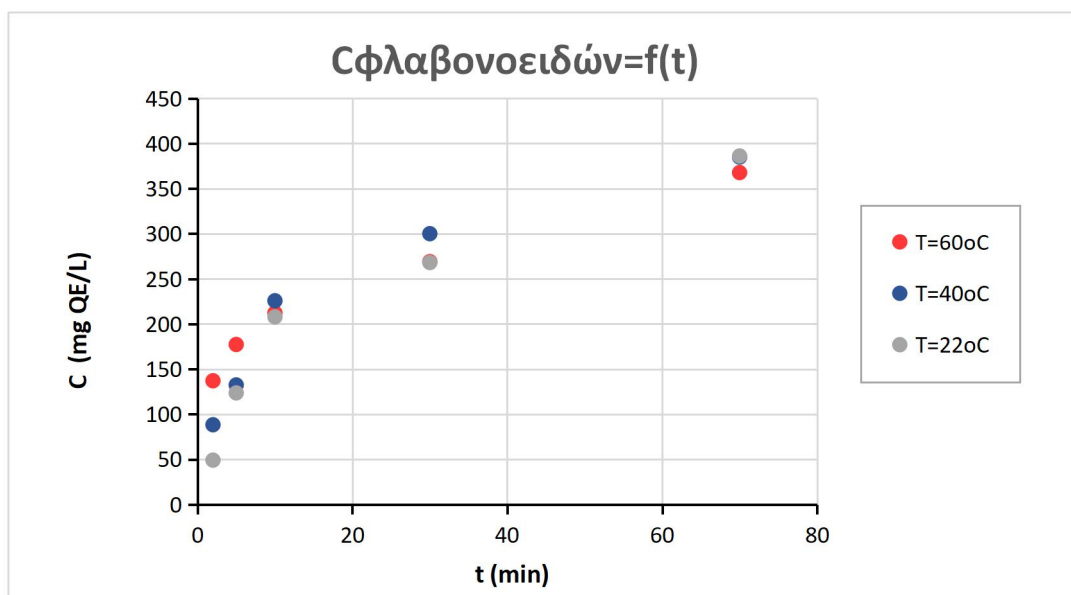
5.3.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο flav (διαγράμματα F.8-F.10 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 280 nm τις μεγάλες κορυφές του ροσμαρινικού οξέος για κάθε εκχύλισμα αντίστοιχα γύρω στα 37 min. Ωστόσο, στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο carnosic (διαγράμματα CC.7, C.13 και C.14 του παραρτήματος), είναι αδύνατο να γίνει αντιστοίχιση των κορυφών των φαινολικών διτερπενίων σε κορυφές καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες κορυφές τόσο των φλαβονοειδών όσο και των φαινολικών διτερπενίων σε κάθε εκχύλισμα διαφορετικής θερμοκρασίας εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης



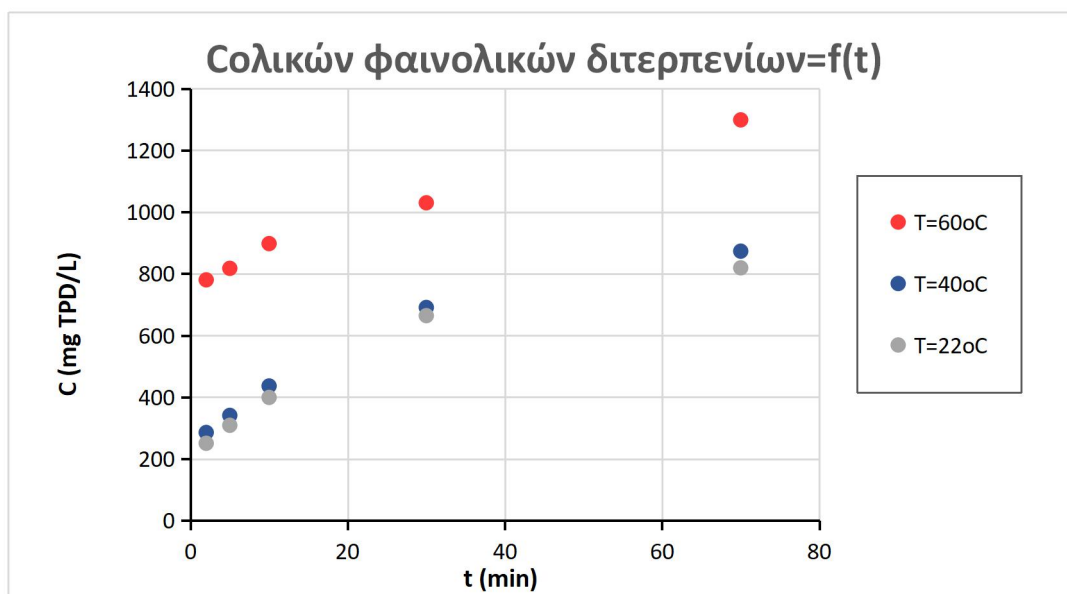
Διάγραμμα 5.3.6. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε θερμοκρασία

Όπως παρατηρούμε στο διάγραμμα 5.3.6, τα εκχυλίσματα των θερμοκρασιών 40°C και 60°C επιτυγχάνουν παραλαβή μεγαλύτερης συγκέντρωσης ροσμαρινικού οξέος με μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης από το εκχύλισμα των 22°C.



Διάγραμμα 5.3.7. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε θερμοκρασία

Στο διάγραμμα 5.3.7 παρατηρούμε ότι και στις τρεις θερμοκρασίες οι τελικές συγκέντρωσεις των φλαβονοειδών είναι αρκετά κοντινές και ο ρυθμός αύξησης τους φαίνεται να έχει μειωθεί με την αύξηση της θερμοκρασίας.



Διάγραμμα 5.3.8. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε θερμοκρασία

Όπως παρατηρούμε στα διαγράμματα 5.3.8 στην θερμοκρασία των 60°C η τελική συγκέντρωση των ολικών φαινολικών διτερπενίων είναι αρκετά μεγαλύτερη από τις άλλες δύο θερμοκρασίες. Οι ρυθμοί αύξησης της συγκέντρωσης των φαινολικών διτερπενίων και στις τρεις θερμοκρασίες είναι παρόμοιοι.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Με ανάλογο τρόπο με την παράγραφο 5.3.1, βγαίνουν οι παράμετροι του μοντέλου και οι συντελεστές συσχέτισης, τα οποία και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3.6.

Πίνακας 5.3.6. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου μεταφοράς για κάθε συστατικό σε κάθε θερμοκρασία

Εκχύλισμα	60°C		40°C		22°C	
	$D \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	$D \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²	$D \cdot 10^{-12}$ (m ² /s)	R ²
Ροσμαρινικό οξύ	26,8	0,986	27,6	0,986	16,4	0,921
Φλαβονοειδή	56,4	0,990	71,0	0,984	7,52	0,985
Ολικά φαινολικά διτερπένια	6,47	0,995	5,43	0,994	8,56	0,998

Για τον συντελεστή διάχυσης των εκάστοτε συστατικών δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα, καθώς δεν εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση. Στο ροσμαρινικό οξύ, τον μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης σημειώνει το εκχύλισμα της θερμοκρασίας των 40°C ($27,6 \cdot 10^{-12}$ m²/s), στα φλαβονοειδή, επίσης, το εκχύλισμα

των 40°C ($71,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) και τέλος στα ολικά φαινολικά διτερπένια το εκχύλισμα των 22°C ($8,56 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$). Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας είναι αρκετά ικανοποιητικοί, με εύρος τιμών μεταξύ 0,921-0,998.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Όμοια με την παράγραφο 5.3.1, στον πίνακα 5.3.7 παρουσιάζονται οι παράμετροι του μοντέλου και οι συντελεστές συσχέτισης και οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις στον πίνακα 5.3.8.

Πίνακας 5.3.7. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε συστατικό σε κάθε θερμοκρασία

Εκχύλισμα	60°C		40°C		22°C	
	a	b	a	b	a	b
Ροσμαρινικό οξύ	3,789	5,961	4,747	3,508	3,992	3,495
Φλαβονοειδή	2,867	1,602	3,920	0,354	4,214	-0,346
Ολικά φαινολικά διτερπένια	6,788	12,27	7,940	2,057	7,777	1,492

Πίνακας 5.3.8. Προσαρμογή και μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε συστατικό σε κάθε θερμοκρασία

Εκχύλισμα	60°C		40°C		22°C	
	R ²	RMSD	R ²	RMSD	R ²	RMSD
Ροσμαρινικό οξύ	0,983	0,077	0,990	8,551	0,813	1,084
Φλαβονοειδή	0,989	0,416	0,985	0,069	0,983	0,091
Ολικά φαινολικά διτερπένια	0,845	2,181	0,956	0,088	0,958	0,797

Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου, δεν είναι και τόσο ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,845-0,990 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα σε σχέση με τους αντίστοιχους που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς μάζας. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις, ωστόσο, είναι αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,069-8,551 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα, γεγονός που φανερώνει συμφωνία των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών.

- ✓ Μοντέλο Peleg: Στον πίνακα 5.3.9 παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου.

Πίνακας 5.3.9. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε συστατικό σε κάθε θερμοκρασία

Εκχύλισμα	60°C		40°C		22°C	
K ₁ (min·g _{DW} / mg GAE) K ₂ (g _{DW} / mg GAE)	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
Ροσμαρινικό οξύ	0,154	0,080	0,683	0,107	0,311	0,093
Φλαβονοειδή	0,465	0,136	1,149	0,118	1,529	0,114
Ολικά φαινολικά διτερπένια	0,061	0,043	0,467	0,054	0,541	0,055

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 5.3.9, δεν μπορούμε να οδηγηθούμε σε κάποιο συμπέρασμα για το πως επηρεάζει η αύξηση της θερμοκρασίας τις σταθερές του Peleg, καθώς δεν εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση. Από τις τιμές των σταθερών K₁ και K₂ υπολογίζονται οι τιμές των B₀ και C_e αντίστοιχα στον πίνακα 5.3.9.

Πίνακας 5.3.10. Τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης (B₀) και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών (C_e) για κάθε θερμοκρασία

Εκχύλισμα	60°C		40°C		22°C	
B ₀ (mg GAE/min·g _{DW}) C _e (mg GAE/g _{DW})	B ₀	C _e	B ₀	C _e	B ₀	C _e
Ροσμαρινικό οξύ	6,49	12,51	1,47	9,34	3,21	10,75
Φλαβονοειδή	2,15	7,36	0,87	8,49	0,65	8,77
Ολικά φαινολικά διτερπένια	16,47	23,05	2,14	18,68	1,85	18,05

Με βάση τον πίνακα 5.3.10 παρατηρούμε ότι, στην θερμοκρασία των 60°C σημειώνεται ο μεγαλύτερος αρχικός ρυθμός εκχύλισης για το ροσμαρινικό οξύ, τα φλαβονοειδή και τα ολικά φαινολικά διτερπένια. Επίσης, στην θερμοκρασία των 60°C παρουσιάζεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση ισορροπίας του ροσμαρινικού οξέος και των ολικών φαινολικών διτερπενίων. Ωστόσο, στην περίπτωση των φλαβονοειδών, μεγαλύτερη συγκέντρωση ισορροπίας εμφανίζει το εκχύλισμα της θερμοκρασίας των 22°C, γεγονός που ενδέχεται να σημαίνει ότι τα φλαβονοειδή καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου του Peleg, είναι εξίσου ικανοποιητικοί με αυτούς που προέκυψαν από το μοντέλο μεταφοράς μάζας με εύρος τιμών μεταξύ 0,891-0,999 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις είναι

αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,006-5,334 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα, γεγονός που φανερώνει καλή συμφωνία των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών.

Στον πίνακα 5.3.12 παρουσιάζονται οι αποδόσεις για κάθε συστατικό σε κάθε θερμοκρασία.

Πίνακας 5.3.12. Αποδόσεις για κάθε συστατικό στο συνολικό εκχύλισμα για κάθε διαλύτη

Εκχύλισμα	60°C	40°C	22°C
Ροσμαρινικό οξύ (mg RA/g DW)	13,0	12,8	11,1
Φλαβονοειδή (mg QE/g DW)	7,36	7,70	7,72
Ολικά φαινολικά διτερπένια (mg TPD/g DW)	26,0	17,5	16,4

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 5.3.12, τα τελικά εκχυλίσματα εμφανίζουν μικρή αύξηση της απόδοσης σε ροσμαρινικό οξύ και μικρή μείωση της απόδοσης σε φλαβονοειδή λόγω πιθανής καταστροφής τους με την αύξηση της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση των ολικών φαινολικών συστατικών, η απόδοση δείχνει μικρή αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας από 22°C σε 40°C, η οποία μεγαλώνει αρκετά με την περαιτέρω αύξηση στους 60°C.

5.3.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

Πίνακας 5.3.13. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε θερμοκρασία

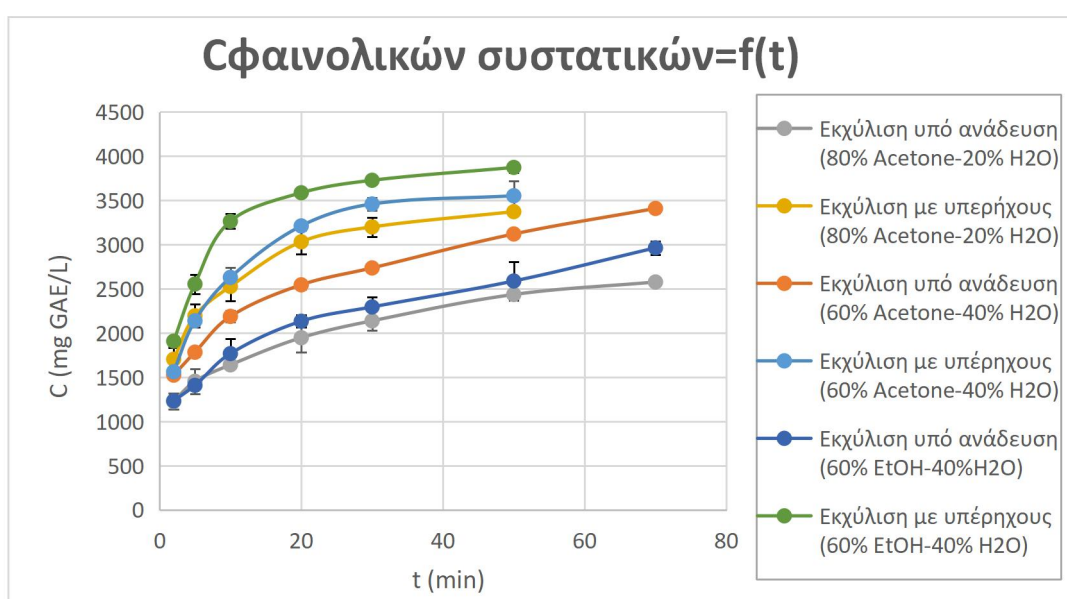
T (°C)	GAEAC (mg GAE/L)
60	1582 ± 37
40	1427 ± 29
22	1337 ± 23

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.3.13, παρατηρούμε ότι στην θερμοκρασία των 60°C σημειώνεται η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1582 mg GAE/L), η οποία μειώνεται με την μείωση της θερμοκρασίας στους 22°C. Η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την αύξηση της θερμοκρασίας οφείλεται κυρίως στα φαινολικά διτερπένια, που όπως είδαμε στον πίνακα 5.3.12 παρουσίασαν πιο αισθητή αύξηση στην απόδοσή τους σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ.

5.4. Επίδραση υπερήχων

Παρακάτω πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης των υπερήχων στην κινητική και στην τελική απόδοση της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με τους εξής διαλύτες: 80% Acetone-20% H₂O, 60% Acetone-40% H₂O και 60% EtOH-40% H₂O. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH.

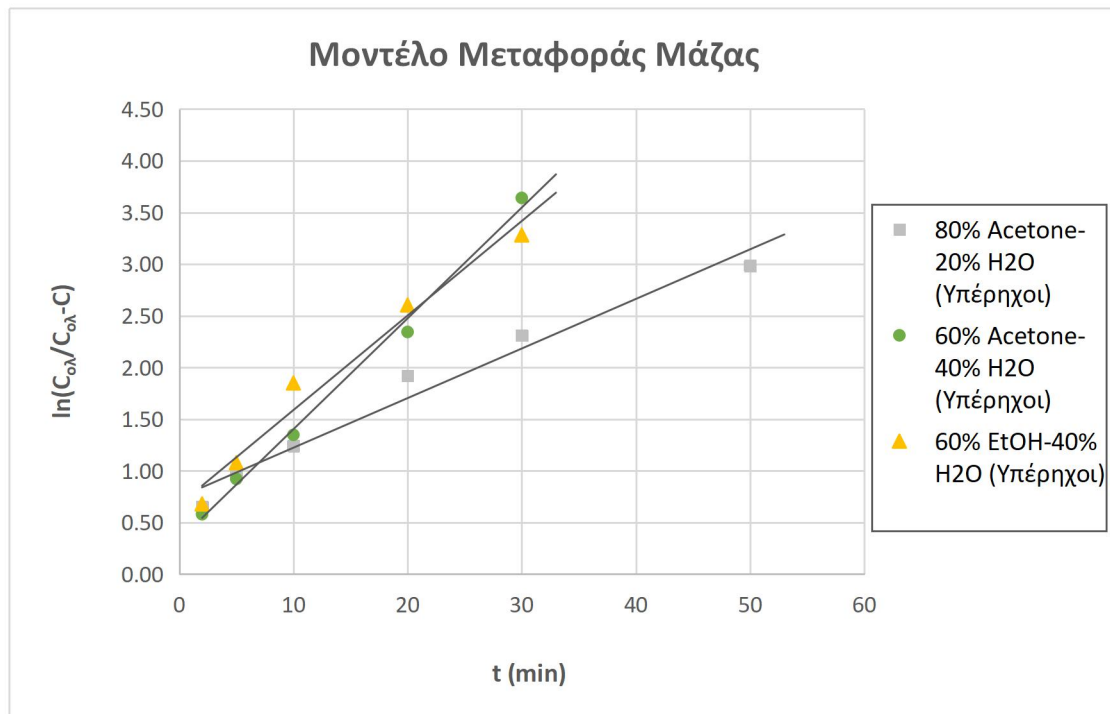
5.4.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη



Διάγραμμα 5.4.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο κάθε εκχλίματος με τις δύο μεθόδους εκχύλισης

Με βάση το διάγραμμα 5.4.1 παρατηρούμε ότι με την εκχύλιση με την χρήση υπερήχων σημειώθηκε αισθητή αύξηση των συγκεντρώσεων των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών για κάθε διαλύτη. Στην περίπτωση των διαλυτών 60% EtOH - 40% H₂O και 80% Acetone - 20% H₂O, παρατηρούμε ραγδαία αύξηση του ρυθμού εκχύλισης των φαινολικών συστατικών με την χρήση υπερήχων, σε αντίθεση με τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O, όπου οι ρυθμοί εκχύλισης υπό ανάδευση και με την χρήση υπερήχων φαίνονται παρόμοιοι.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Παρακάτω παρουσιάζεται το διαγράμμα εφαρμογής του μοντέλου για τα πειράματα των υπερήχων. Τα διαγράμματα για τα πειράματα των εκχυλίσεων υπό ανάδευση έχουν παρουσιαστεί στις ενότητες 5.1.1.1 και 5.1.2.1. Ως C_{∞} ή $C_{ολ}$ για τα ακετονικά μίγματα έχει επιλεγεί η συγκέντρωση που προέκυψε στο πείραμα υπερήχων με διαλύτη 60% Acetone-40% H₂O και στο μίγμα αιθανόλης-νερού στο πείραμα των υπερήχων με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O.



Διάγραμμα 5.4.2. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας για τα πειράματα των υπερήχων

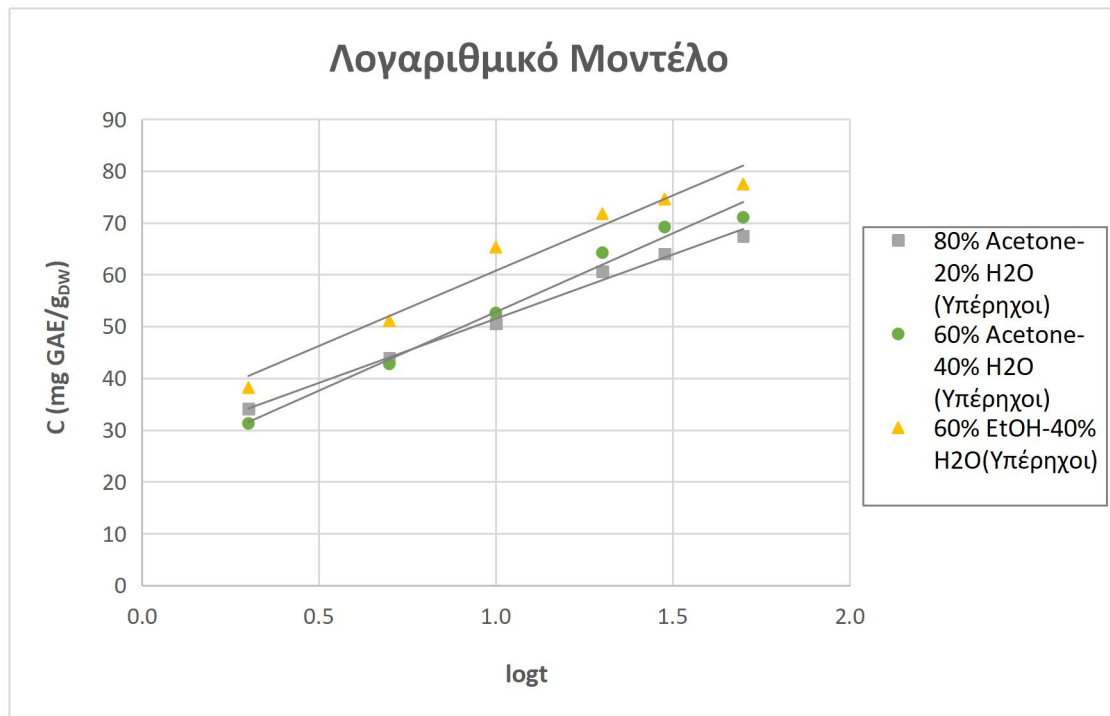
Οι συντελεστές συσχέτισης είναι ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,968-0,995 στο σύνολο των πειραμάτων.

Πίνακας 5.4.1. Συντελεστές διάχυσης του μοντέλου μεταφοράς μάζας για κάθε διαλύτη και για κάθε μέθοδο εκχύλισης

Διαλύτης/Μέθοδος εκχύλισης	$D \cdot 10^{-12} \text{ (m}^2/\text{s)}$
80% Acetone - 20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	50,13
80% Acetone - 20% H ₂ O (Ανάδευση)	13,16
60% Acetone - 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	111,95
60% Acetone - 40% H ₂ O (Ανάδευση)	38,01
60% EtOH - 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	95,56
60% EtOH - 40% H ₂ O (Ανάδευση)	15,35

Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 5.4.1, παρατηρούμε αύξηση των συντελεστών διάχυσης με την χρήση υπερήχων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των πειραμάτων με τα ακετονικά μίγματα οι συντελεστές διάχυσης αυξάνονται κατά 281% και 195% με την χρήση υπερήχων και στην περίπτωση των πειραμάτων με το αιθανολικό μίγμα παρατηρήθηκε αύξηση κατά 523%. Παρατηρούμε λοιπόν ότι, η χρήση υπερήχων σε αιθανολικούς διαλύτες είναι εξαιρετικά αποδοτική. Ο διαλύτης 60% Acetone - 40% H₂O παρουσιάζει τους μεγαλύτερους συντελεστές διάχυσης και με τις δύο μεθόδους εκχύλισης ($D=38,01 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ με ανάδευση και $D=112,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ με υπερήχους).

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου για τα πειράματα των υπερήχων.



Διάγραμμα 5.4.3. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για τα πειράματα των υπερήχων

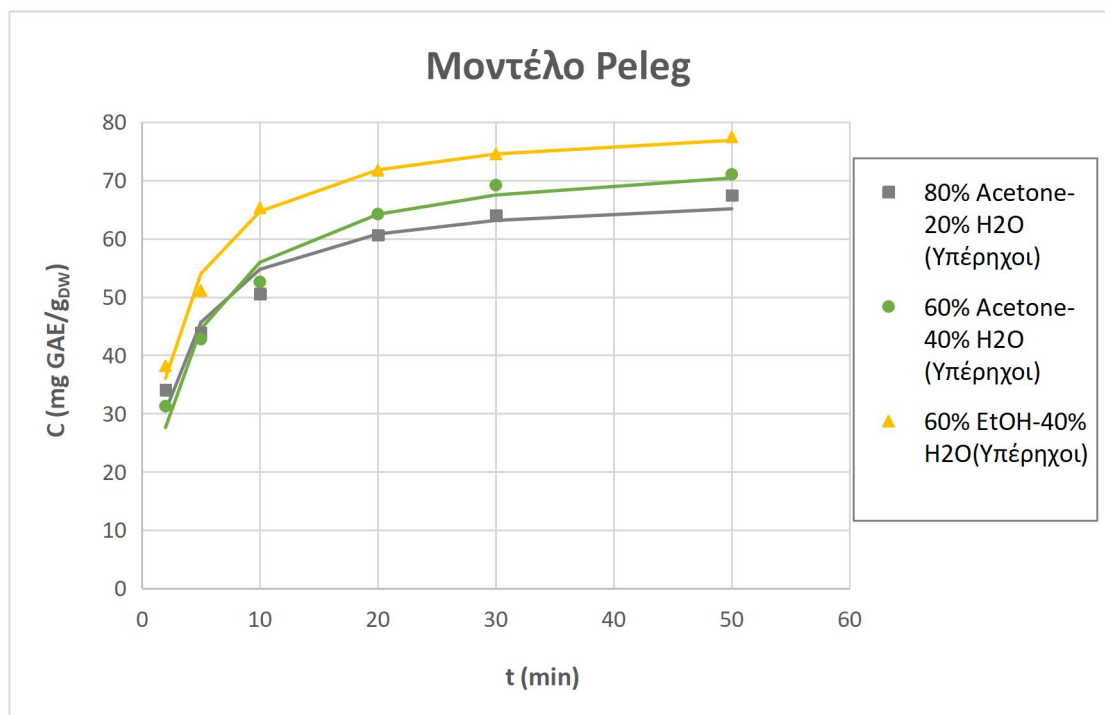
Η προσαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου είναι επίσης, αρκετά ικανοποιητική στο σύνολο των πειραμάτων με συντελεστές συσχέτισης που κυμαίνονται σε εύρος τιμών μεταξύ 0,962-0,993.

Πίνακας 5.4.2. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε διαλύτη και για κάθε μέθοδο εκχύλισης

Διαλύτης/Μέθοδος εκχύλισης	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
80% Acetone-20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	24,772	26,699	1,011
80% Acetone-20% H ₂ O (Ανάδευση)	17,905	17,065	2,199
60% Acetone-40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	30,144	22,415	3,163
60% Acetone-40% H ₂ O (Ανάδευση)	24,443	20,397	3,453
60% EtOH-40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	29,041	31,696	7,394
60% EtOH-40% H ₂ O (Ανάδευση)	22,115	14,833	4,878

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.4.2, παρατηρούμε αύξηση των σταθερών του λογαριθμικού μοντέλου με την χρήση των υπερήχων, ανεξαρτήτως του διαλύτη εκχύλισης. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 1,011-7,394, γεγονός που φανερώνει μια αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg: Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου για τα πειράματα των υπερήχων.



Διάγραμμα 5.4.4. Εφαρμογή του μοντέλου Peleg για τα πειράματα των υπερήχων

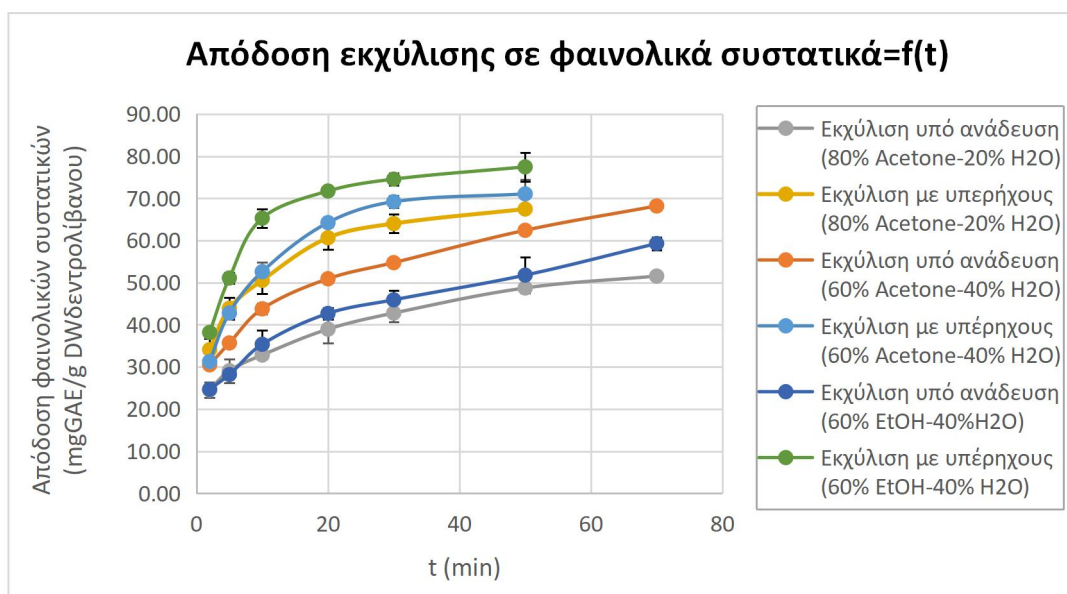
Στον πίνακα 5.4.3 παρουσιάζονται οι τιμές του αρχικού ρυθμού εκχύλισης, η συγκέντρωση ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών, καθώς και οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου.

Πίνακας 5.4.3. Τιμές των παραμέτρων του μοντέλου του Peleg για κάθε διαλύτη και για κάθε μέθοδο εκχύλισης

Διαλύτης/Μέθοδος εκχύλισης	Παράμετροι του μοντέλου του Peleg			
	B_0 (mg GAE/min·g _{dw})	C_e (mg GAE/g _{dw})	R^2	RMSD
80% Acetone-20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	27	68	0,977	6,670
80% Acetone-20% H ₂ O (Ανάδευση)	15	49	0,923	13,351
60% Acetone-40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	22	75	0,989	5,171
60% Acetone-40% H ₂ O (Ανάδευση)	18	65	0,939	20,810
60% EtOH-40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	33	81	0,995	2,247
60% EtOH-40% H ₂ O (Ανάδευση)	13	56	0,936	18,416

Από τις τιμές του πίνακα 5.4.3, παρατηρούμε την αναμενόμενη αύξηση των αρχικών ρυθμών εκχύλισης και των συγκεντρώσεων ισορροπίας των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών με την χρήση υπερήχων. Ανάμεσα στο σύνολο των πειραμάτων τις μεγαλύτερες τιμές αντίστοιχα σημειώνει ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O με εκχύλιση με χρήση υπερήχων ($B_0=33$ mg GAE/min·g_{dw} και $C_e=81$ mg GAE/g_{dw}). Οι συντελεστές συσχέτισης του μοντέλου του Peleg είναι επίσης ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων με ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,923-0,995. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 2,247-20,810, γεγονός που δεν φανερώνει τόσο καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων τιμών, όσο στο λογαριθμικό μοντέλο.

5.4.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.4.5. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

Με βάση το διάγραμμα 5.4.5 παρατηρούμε ότι με την εκχύλιση με την χρήση υπερήχων σημειώθηκε αισθητή αύξηση τόσο των αποδόσεων των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών όσο και του ρυθμού αύξησης, για κάθε διαλύτη αντίστοιχα.

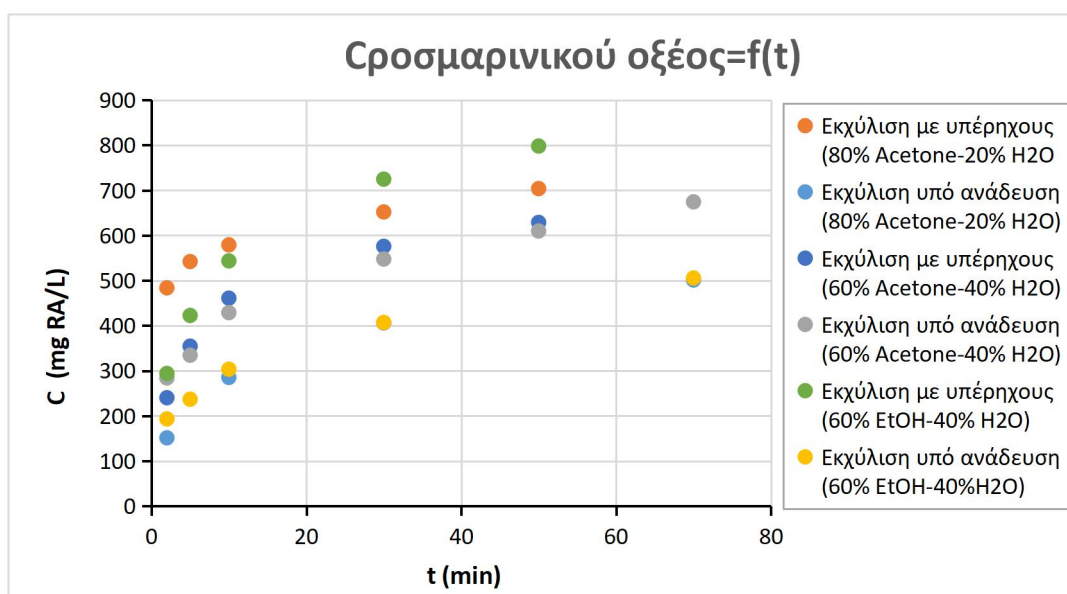
Πίνακας 5.4.4. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

Διαλύτης/ Μέθοδος εκχύλισης	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
80% Acetone- 20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	67,5 ± 0,4	250,2 ± 11,0	27,0
80% Acetone- 20% H ₂ O (Ανάδευση)	51,5 ± 0,1	227,2 ± 7,0	22,7
60% Acetone- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	71,0 ± 3,4	265,2 ± 0,0	26,8
60% Acetone- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	68,2 ± 1,0	248,8 ± 0,0	27,4
60% EtOH- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	77,5 ± 1,2	258,9 ± 20,8	29,9
60% EtOH- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	59,3 ± 1,5	257,8 ± 6,5	23,0

Από τις τιμές του πίνακα 5.4.4 παρατηρούμε ότι, όπως ήταν αναμενόμενο, με την χρήση υπερήχων αυξάνεται η απόδοση των φαινολικών συστατικών και των στερεών ουσιών με επακόλουθη αύξηση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης. Τις μεγαλύτερες αποδόσεις φαινολικών και στερεών ουσιών, επιτυγχάνει ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O με την χρήση υπερήχων (77,5 mg GAE/g DW και 258,9 mg στερεών/g DW), οπότε και σημειώνει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα (29,9%). Συνεπώς, ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O καθιστάται ως ο πιο αποδοτικός διαλύτης για την εκχύλιση του δεντρολίβανου με την χρήση υπερήχων.

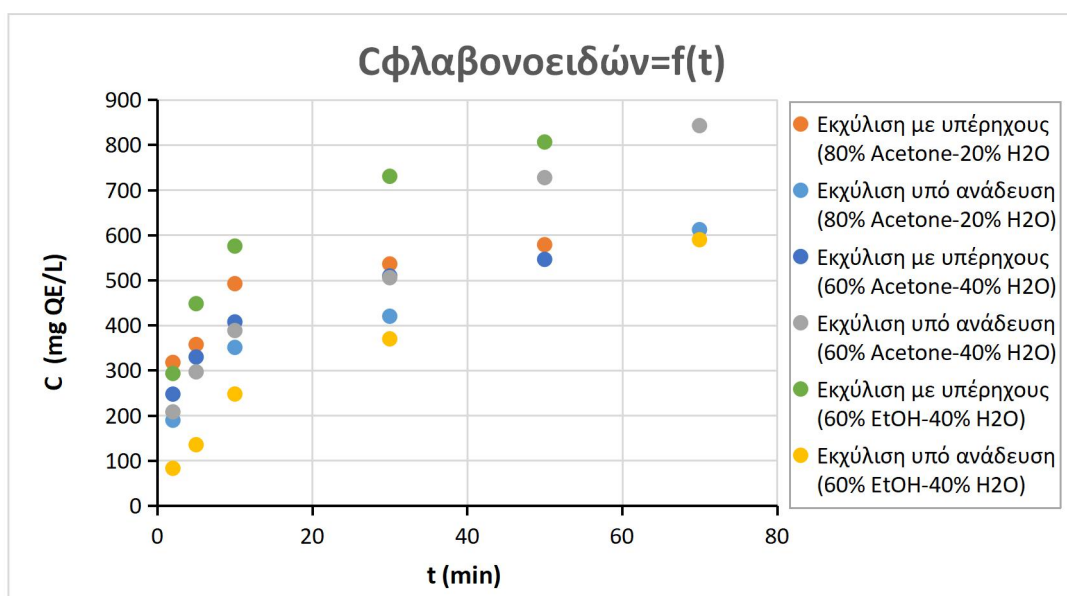
5.4.3. Χρωματογραφική ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν με την μέθοδο flav (διαγράμματα F.3, F.6, F.7 και F.11-F.13 του παραρτήματος), παρατηρούμε στα 280 nm τις μεγάλες κορυφές του ροσμαρινικού οξέος για κάθε εκχύλιση αντίστοιχα γύρω στα 37 min. Στα πειράματα των υπερήχων οι κορυφές των φλαβονοειδών παρουσιάζουν μικρές διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης. Σε σύγκριση με τα πειράματα των εκχυλίσεων υπό ανάδευση, παρατηρήθηκε στην περίπτωση των ακετονικών μιγμάτων μείωση των κορυφών των φλαβονοειδών, λόγω πιθανής καταστροφής τους. Με βάση τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις HPLC με την μέθοδο Carnosic (διαγράμματα C.3, C.5, C.6 και C.15-C.17 του παραρτήματος) δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση και αντιστοίχιση των κορυφών των φαινολικών διτερπενίων σε καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ. Στα πειράματα των υπερήχων οι κορυφές των φαινολικών διτερπενίων παρουσιάζουν μικρές διαφορές ως προς τον χρόνο έκλουσης. Σε σύγκριση με τα πειράματα των εκχυλίσεων υπό ανάδευση, δεν παρατηρήθηκε καταστροφή των φαινολικών διτερπενίων με την χρήση υπερήχων.



Διάγραμμα 5.4.6. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλιμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

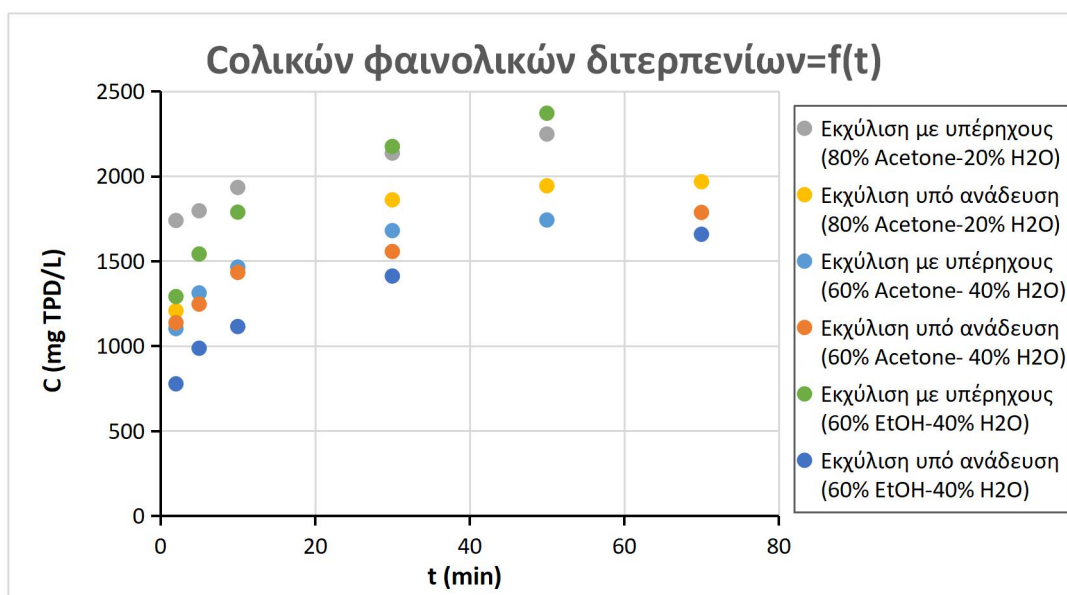
Στο διάγραμμα 5.4.6 παρατηρούμε ότι με την χρήση των υπερήχων αυξάνεται τόσο η συγκέντρωση του ροσμαρινικού όσο και ο ρυθμός εκχύλισής του. Το εκχύλισμα που προέκυψε με εκχύλιση με υπέρηχους με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O επιτυγχάνει την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση ροσμαρινικού με γοργό ρυθμό αύξησης και αισθητή διαφορά από το αντίστοιχο που προέκυψε από την εκχύλιση υπό ανάδευση με τον ίδιο διαλύτη. Για τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O οι συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού και ο ρυθμός αύξησής του και με τις δύο μεθόδους δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη διαφορά. Το εκχύλισμα που προέκυψε από την εκχύλιση με υπέρηχους με τον διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O παρουσιάζει αισθητά αυξημένες συγκεντρώσεις ροσμαρινικού σε σχέση με το αντίστοιχο που προέκυψε από την ανάδευση.



Διάγραμμα 5.4.7. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

Στο διάγραμμα 5.4.7 παρατηρούμε ότι με την χρήση των υπερήχων αυξάνεται τόσο η συγκέντρωση των φλαβονοειδών όσο και ο ρυθμός αύξησής τους. Το εκχύλισμα που προέκυψε με εκχύλιση με υπέρηχους με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O επιτυγχάνει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών μέχρι τα 50 min με γοργό ρυθμό αύξησης και αισθητή διαφορά από το αντίστοιχο που προέκυψε από την εκχύλιση υπό ανάδευση με τον ίδιο διαλύτη. Για τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών και ο ρυθμός αύξησής τους και με τις δύο μεθόδους δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη διαφορά μέχρι τα 30 min, όπου στην συνέχεια ο ρυθμός αύξησης των φλαβονοειδών του εκχυλίσματος που προέκυψε από εκχύλιση υπό ανάδευση αυξάνεται ραγδαία μέχρι τα 70 min φθάνοντας στην μέγιστη συγκέντρωση φλαβονοειδών ανάμεσα στο σύνολο των παραπάνω πειραμάτων. Το εκχύλισμα που προέκυψε από την εκχύλιση με υπέρηχους με τον διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O παρουσιάζει αυξημένο ρυθμό αύξησης των φλαβονοειδών τα πρώτα 10 min σε σχέση με το αντίστοιχο που προέκυψε από την ανάδευση, αλλά στην συνέχεια παρατηρείται αισθητή μείωσή του. Παρατηρούμε λοιπόν ότι και στα δύο πειράματα με υπέρηχους και διαλύτη ακετονικό μίγμα, οι ρυθμοί αύξησης των φλαβονοειδών μετά τα 10 min εμφανίζει μείωση, γεγονός που

ενδέχεται να οφείλεται σε αύξηση της θερμοκρασίας στο λουτρό υπερήχων και επακόλουθη εξάτμιση μιας ποσότητας της ακετόνης.



Διάγραμμα 5.4.8. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στο εκχύλισμα σε συνάρτηση με τον χρόνο εκχύλισης για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

Στο διάγραμμα 5.4.8 παρατηρούμε ότι με την χρήση των υπερήχων αυξάνεται τόσο η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών διτερπενίων όσο και ο ρυθμός αύξησής τους. Το εκχύλισμα που προέκυψε με εκχύλιση με υπέρηχους με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O επιτυγχάνει την μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων με γοργό ρυθμό αύξησης και αισθητή διαφορά από το αντίστοιχο που προέκυψε από την εκχύλιση υπό ανάδευση με τον ίδιο διαλύτη. Για τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O η διαφορά στις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών διτερπενίων και στον ρυθμό αύξησής τους μεταξύ των δύο μεθόδων δεν είναι μεγάλη. Το εκχύλισμα που προέκυψε από την εκχύλιση με υπέρηχους με τον διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O παρουσιάζει αισθητά αυξημένες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών διτερπενίων αλλά μικρότερο ρυθμό αύξησης σε σχέση με το αντίστοιχο που προέκυψε από την ανάδευση.

Κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης των συστατικών του δεντρολίβανου και τα τρία μοντέλα έδειξαν αρκετά ικανοποιητικές προσαρμογές:

- ✓ Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς μάζας κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,823-0,995. Από τον προσδιορισμό των τιμών των συντελεστών διάχυσης, παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση στην τιμή τους με την χρήση υπερήχων, με εξαίρεση τα φλαβονοειδή, όπου όπως παρατήρηθηκε άλλωστε και στο διάγραμμα 5.1.16, στα πειράματα των υπερήχων με διαλύτες τα ακετονικά μίγματα παρατηρήθηκε μείωση των αντίστοιχων συντελεστών διάχυσης.

- ✓ Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,921-0,999 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις είναι επίσης αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,016-1,616, γεγονός που φανερώνει συμφωνία των πειραματικών και των υπολογισμένων τιμών. Η χρήση υπερήχων κατά την εκχύλιση του δεντρολίβανου αύξησε τις σταθερές του λογαριθμικού μοντέλου στην πλειοψηφία των πειραμάτων.
- ✓ Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου του Peleg, κυμαίνονται σε εύρος τιμών μεταξύ 0,867-0,997 στο σύνολο των συστατικών του δεντρολίβανου σε κάθε εκχύλισμα. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις είναι επίσης αρκετά ικανοποιητικές με εύρος τιμών μεταξύ 0,081-5,641. Μέσω του προσδιορισμού του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της συγκέντρωσης ισορροπίας των εκχυλισμένων συστατικών του δεντρολίβανου από τις σταθερές του Peleg, παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση των αρχικών ρυθμών της εκχύλισης σε καθένα από τα επιμέρους συστατικά στο σύνολο των πειραμάτων και των συγκεντρώσεων ισορροπίας του ροσμαρινικού και των ολικών φαινολικών διτερπενίων με την χρήση υπερήχων. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, οι υπέρηχοι οδήγησαν σε καταστροφή ενός σημαντικού ποσοστού των φλαβονοειδών στην περίπτωση των αντίστοιχων εκχυλίσεων με διαλύτες τα ακετονικά μίγματα. Στην περίπτωση της εκχύλισης με υπέρηχους και διαλύτη το αιθανολικό μίγμα, τα φλαβονοειδή έδειξαν την αναμενόμενη τάση αύξησης.

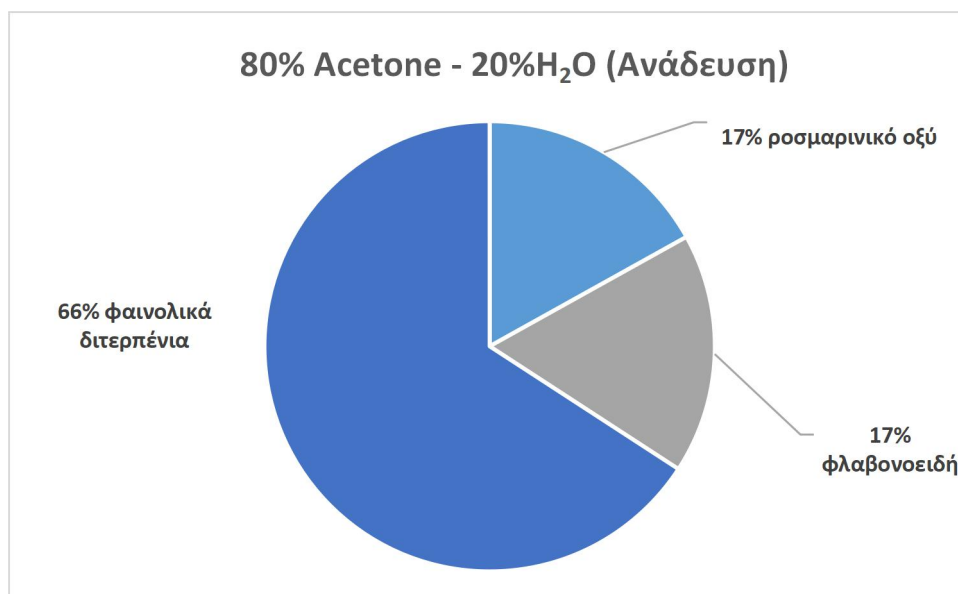
Στον πίνακα 5.4.5 παρουσιάζονται οι τελικές αποδόσεις στα επιμέρους συστατικά του δεντρολίβανου σε κάθε πείραμα.

Πίνακας 5.4.5. Αποδόσεις για κάθε συστατικό στο συνολικό εκχύλισμα για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

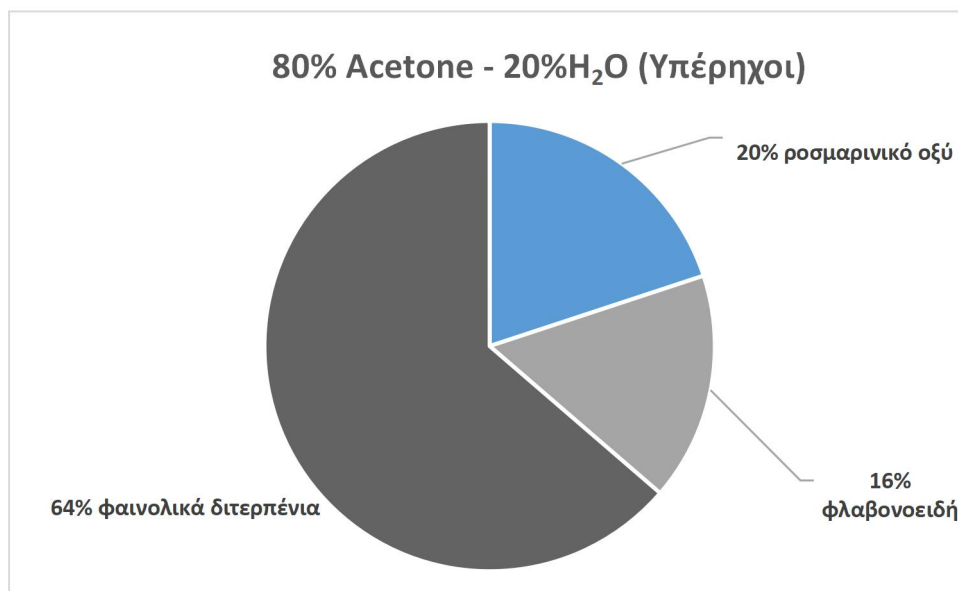
Διαλύτης/ Μέθοδος εκχύλισης	Ροσμαρινικό οξύ (mg RA/g DW)	Φλαβονοειδή (mg QE/g DW)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (mg TPD/g DW)
80% Acetone- 20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	14,1	11,6	45,0
80% Acetone- 20% H ₂ O (Ανάδευση)	10,0	10,2	38,9
60% Acetone- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	12,6	10,9	34,8
60% Acetone- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	12,2	14,5	32,4
60% EtOH- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	16,0	16,1	47,4
60% EtOH- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	10,1	10,8	38,2

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 5.4.5, παρατηρούμε ότι η εκχύλιση του δεντρολίβανου με την χρήση υπερήχων οδήγησε σε αύξηση των αποδόσεων των συστατικών του δεντρολίβανου με εξαίρεση τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O, όπου παρατηρείται μείωση της απόδοσης των φλαβονοειδών.

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται η σύσταση κάθε εκχυλίσματος:

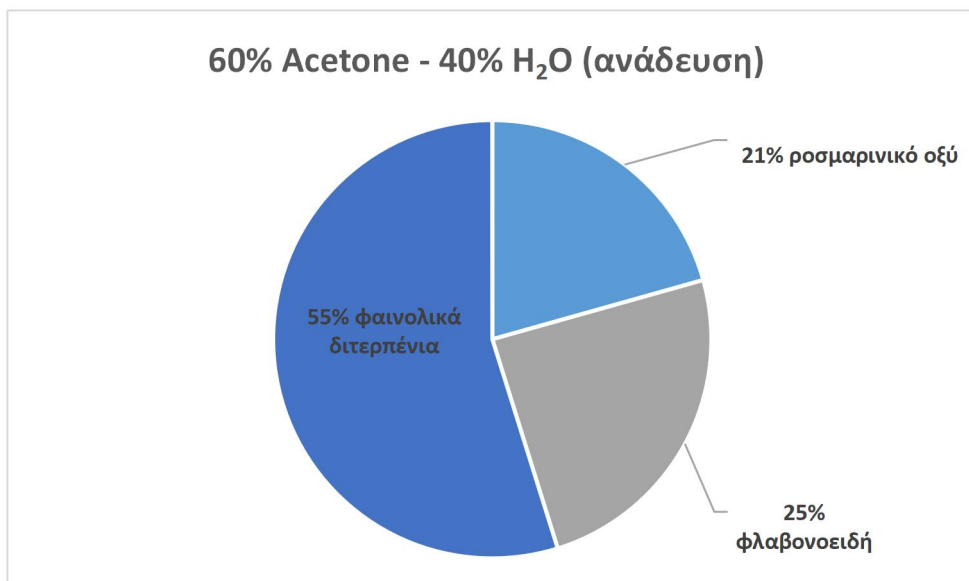


Διάγραμμα 5.4.9. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O (ανάδευση)

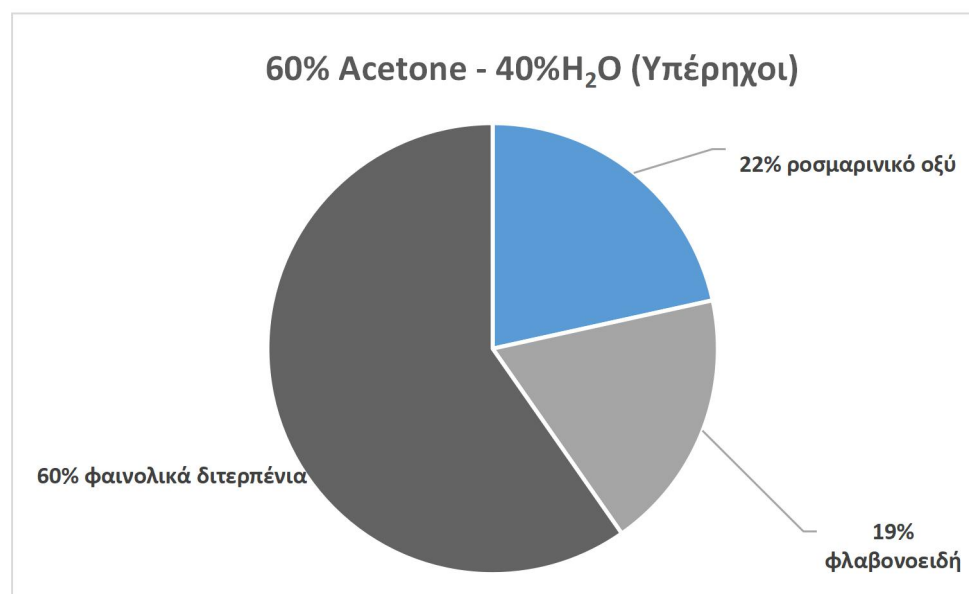


Διάγραμμα 5.4.10. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O (υπέρηχοι)

Με την χρήση υπερήχων στην περίπτωση του διαλύτη 80% Acetone - 20% H₂O παρατηρήθηκε ότι δεν μεταβλήθηκε η σύσταση του εκχυλίσματος, συγκρινόμενη με εκείνη του εκχυλίσματος με απλή ανάδευση.

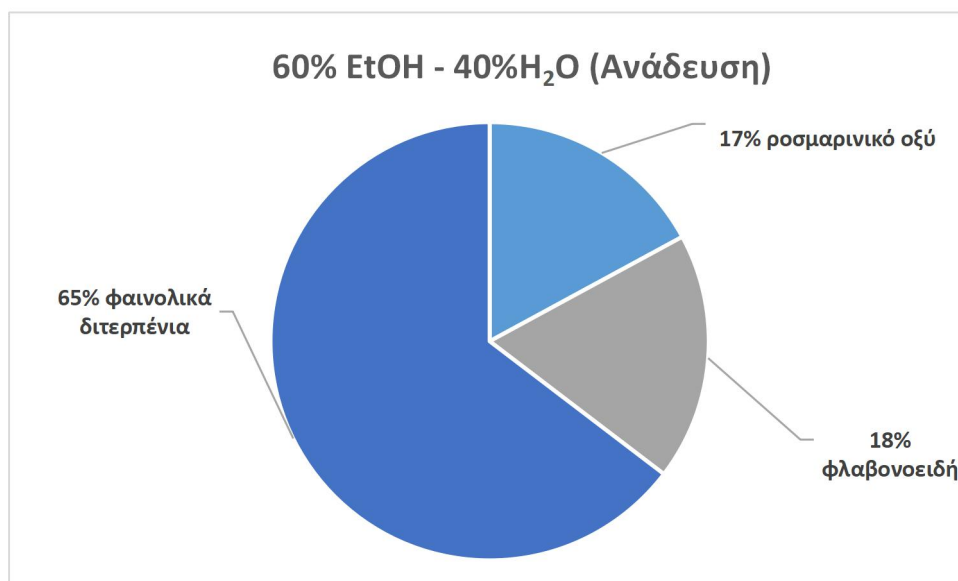


Διάγραμμα 5.4.11. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% Acetone-40% H₂O (ανάδευση)

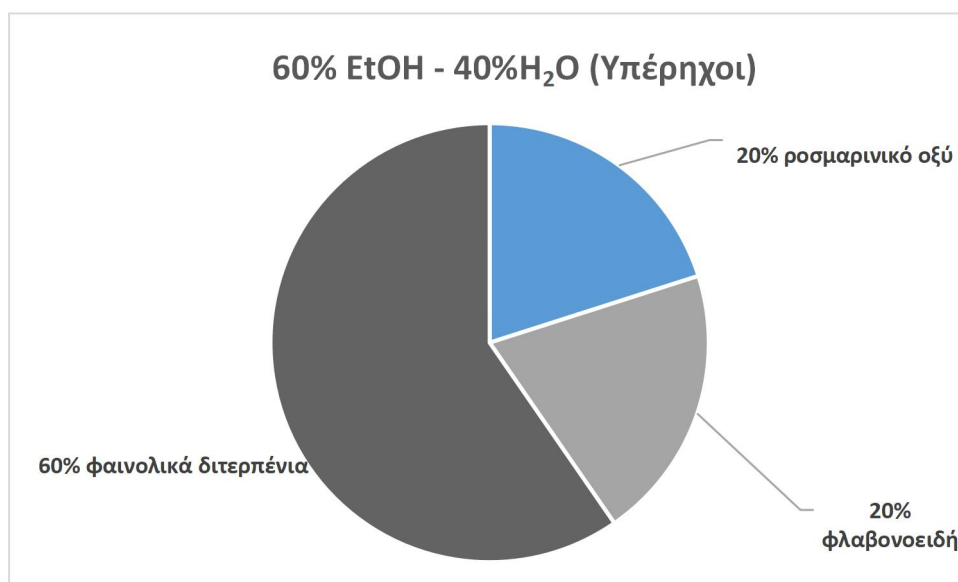


Διάγραμμα 5.4.12. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% Acetone-40% H₂O (υπέρηχοι)

Με την χρήση υπερήχων στην περίπτωση του διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O παρατηρήθηκε αισθητή μείωση των φλαβονοειδών με την χρήση υπερήχων από 25% σε 19%, ενώ στην περίπτωση του ροσμαρινικού και των φαινολικών διτερπενίων οι διαφορές είναι πολύ μικρές. Οπότε, αλλάζει η σύσταση του εκχυλίσματος με την χρήση υπερήχων και διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O, λόγω πιθανής καταστροφής των φλαβονοειδών.



Διάγραμμα 5.4.13. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% EtOH-40% H₂O (ανάδευση)



Διάγραμμα 5.4.14. Σύσταση του εκχυλίσματος με διαλύτη 60% EtOH-40% H₂O (υπέρηχοι)

Με την χρήση υπερήχων και στην περίπτωση του διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O παρατηρήθηκε ότι δεν μεταβλήθηκε η σύσταση του εκχυλίσματος, συγκρινόμενη με εκείνη του εκχυλίσματος με απλή ανάδευση.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι, με την χρήση υπερήχων δεν μεταβάλλεται η σύνθεση των τελικών εκχυλισμάτων, με εξαίρεση τον διαλύτη 60% Acetone - 40% H₂O.

5.4.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

Πίνακας 5.4.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης

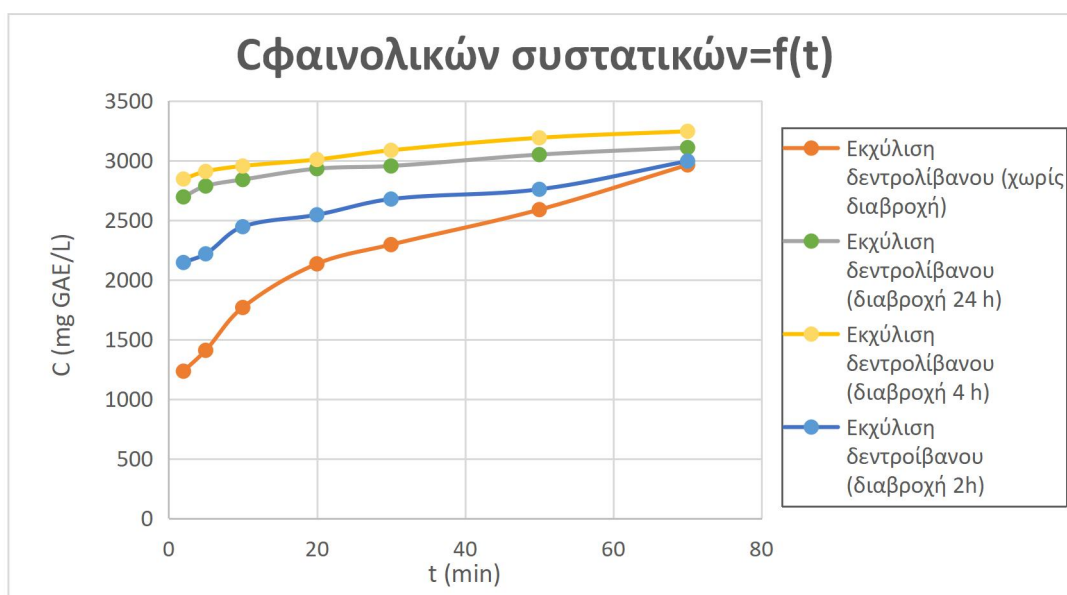
Διαλύτης/ Μέθοδος εκχύλισης	GAEAC (mg GAE/L)
80% Acetone- 20% H ₂ O (Υπέρηχοι)	1435 ± 52
80% Acetone- 20% H ₂ O (Ανάδευση)	1153 ± 54
60% Acetone- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	1720 ± 43
60% Acetone- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	1394 ± 52
60% EtOH- 40% H ₂ O (Υπέρηχοι)	1890 ± 54
60% EtOH- 40% H ₂ O (Ανάδευση)	1196 ± 69

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 5.4.16, παρατηρούμε ότι η χρήση υπερήχων κατά την εκχύλιση του δεντρολίβανου οδηγεί σε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ανάμεσα στο σύνολο των πειραμάτων, τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα επιτυγχάνει ο διαλύτης 60% EtOH - 40% H₂O κατά την εκχύλιση του δεντρολίβανου με χρήση υπερήχων (1890 mg GAE/L). Συνεπώς, τόσο από τα αποτελέσματα αυτά, όσο και από τα αποτελέσματα των αναλύσεων HPLC, συμπεραίνουμε ότι η χρήση υπερήχων κατά την εκχύλιση του δεντρολίβανου με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O κρίνεται η πιο αποδοτική.

5.5. Επίδραση της διαβροχής

Παρακάτω πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης της διαβροχής του δεντρολίβανου στην κινητική και στην τελική απόδοση της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε διαβροχή του δεντρολίβανου με απιονισμένο νερό και παραμονή σε κλειστό δοχείο στο ψυγείο για 2 h, 4 h και 24 h αντίστοιχα και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O και επακόλουθος προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH.

5.5.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο - κινητική μελέτη

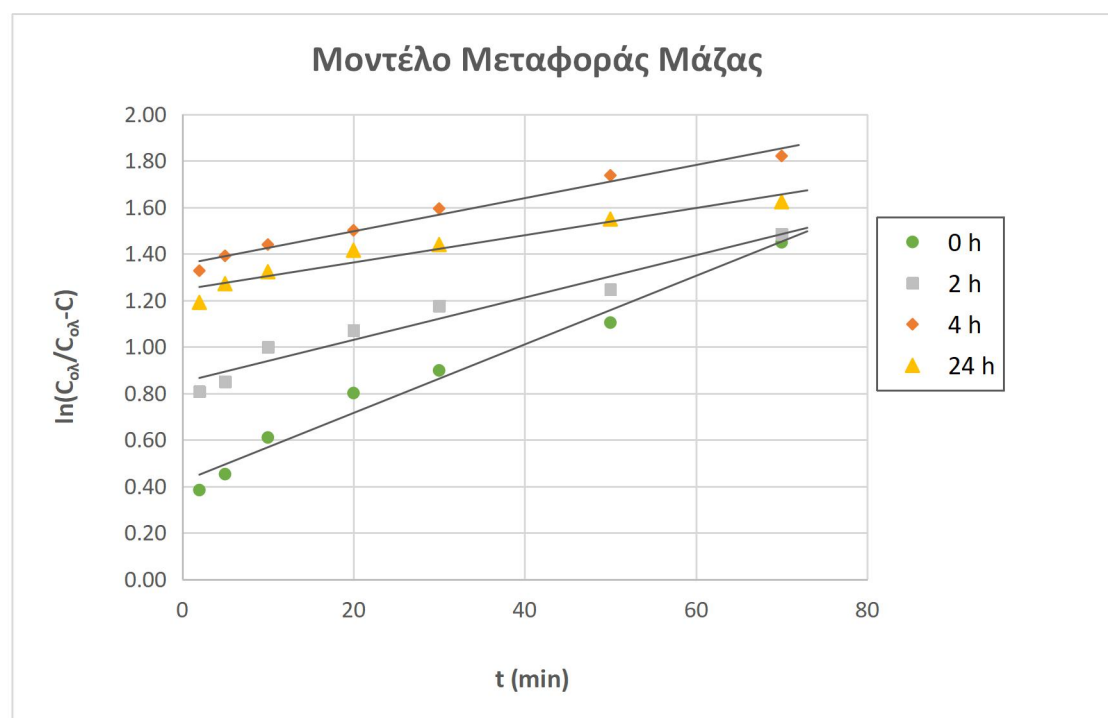


Διάγραμμα 5.5.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο κάθε εκχυλίσματος για τους διάφορους χρόνους διαβροχής

Με βάση το διάγραμμα 5.5.1 παρατηρούμε ότι η διαβροχή του δεντρολίβανου πριν την εκχύλιση του συμβάλλει σε αισθητή αύξηση των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών, ειδικά στους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Στο χρονικό διάστημα, όπου το δεντρολίβανο παραμένει σε κλειστό δοχείο με ένα μέρος του διαλύτη, πραγματοποιείται εκχύλιση των συστατικών του από το νερό. Συνεπώς, όταν εκχύλιζεται υπό ανάδευση, στη συνέχεια, εμφανίζει στους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης ήδη αρκετά αυξημένες τιμές των φαινολικών συστατικών, όπου το μη διαβρεγμένο δεντρολίβανο απαιτεί αρκετό χρόνο ώστε να τις φτάσει ή ενδέχεται και να μην τις φτάσει καθόλου. Οι καμπύλες των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών με τον χρόνο μας δείχνουν ότι οι ρυθμοί αύξησής τους είναι παρόμοιοι σε καθένα από τα πειράματα, όπου έχει πραγματοποιηθεί διαβροχή του δεντρολίβανου και μικρότεροι από τον αντίστοιχο ρυθμό αύξησης τους όταν το δεντρολίβανο δεν έχει διαβραχεί. Με την διαβροχή του δεντρολίβανου για 4 h επιτυγχάνεται η μέγιστη τελική συγκέντρωση φαινολικών.

Κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης του δεντρολίβανου στους διάφορους χρόνους διαβροχής, παρατηρήσαμε ότι το μοντέλο μεταφοράς μάζας και το λογαριθμικό μοντέλο παρουσίασαν καλύτερες προσαρμογές στα πειραματικά δεδομένα σε σχέση με το μοντέλο Peleg, όπως φαίνεται και παρακάτω.

- ✓ Μοντέλο μεταφοράς μάζας: Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου σε κάθε περίπτωση, καθώς και οι τιμές των συντελεστών διάχυσης.



Διάγραμμα 5.5.2. Εφαρμογή του μοντέλου μεταφοράς για κάθε χρόνο διαβροχής

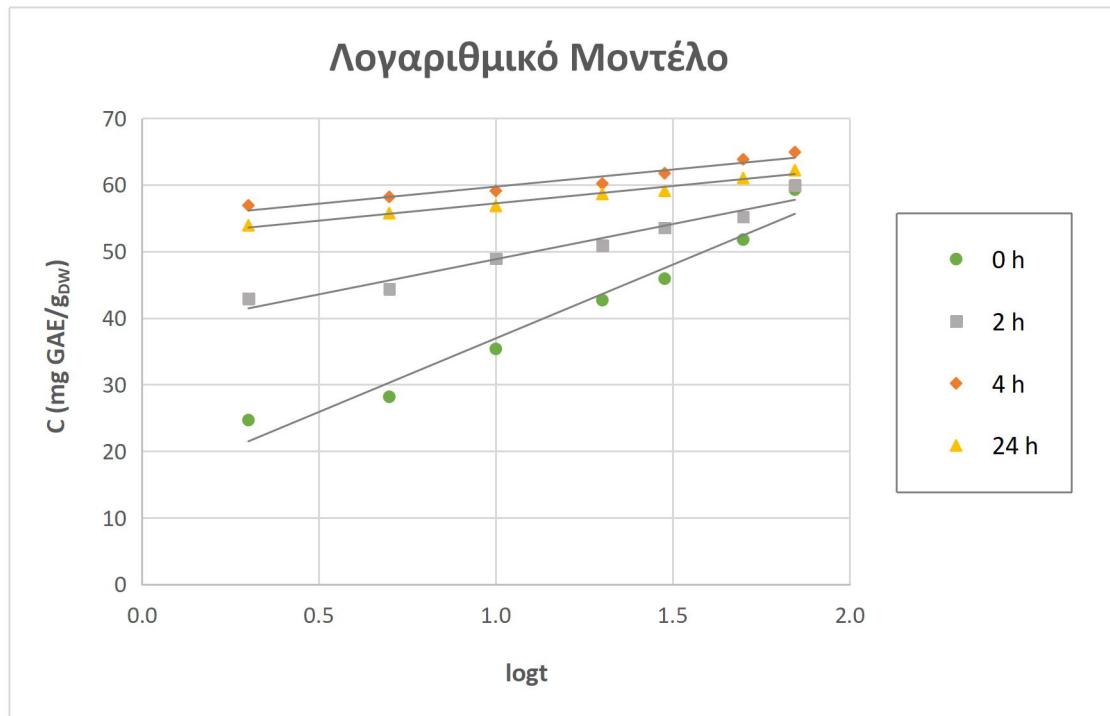
Οι συντελεστές συσχέτισης είναι αρκετά ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,936-0,978 στο σύνολο των πειραμάτων.

Πίνακας 5.5.1. Συντελεστές διάχυσης για κάθε χρόνο διαβροχής

Χρόνος διαβροχής (h)	$D \cdot 10^{-12} (m^2/s)$
0	15,35
2	9,50
4	7,41
24	6,16

Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 5.5.1, παρατηρούμε αύξηση του συντελεστή διάχυσης με την μείωση του χρόνου διαβροχής, με το μη διαβρεγμένο δεντρολίβανο να επιτυγχάνει τον μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης $15,35 \cdot 10^{-12} m^2/s$. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς με τη διαβροχή έχει ήδη εκχυλισθεί ένα μεγάλο ποσοστό φαινολικών συστατικών.

- ✓ Λογαριθμικό μοντέλο: Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα εφαρμογής του μοντέλου σε κάθε περίπτωση, καθώς και οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου και οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις.



Διάγραμμα 5.5.3. Εφαρμογή του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε χρόνο διαβροχής

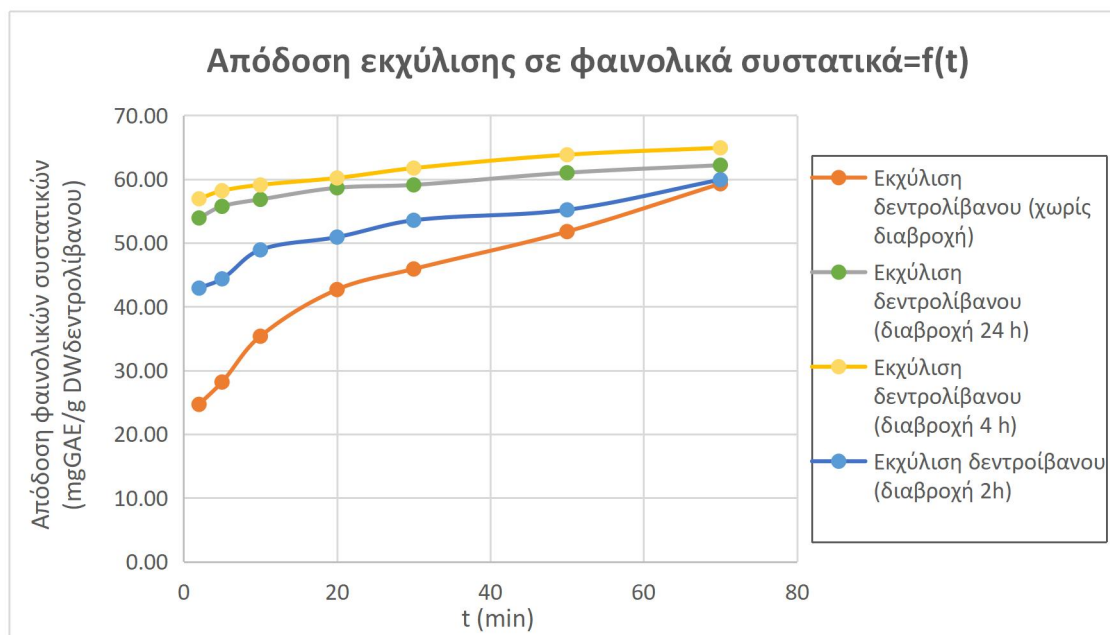
Πίνακας 5.5.2. Τιμές των παραμέτρων του λογαριθμικού μοντέλου για κάθε χρόνο διαβροχής

Χρόνος διαβροχής (h)	Παράμετροι του λογαριθμικού μοντέλου		
	a	b	RMSD
0	22,115	14,833	4,878
2	10,556	38,270	1,545
4	5,131	54,590	0,479
24	5,204	55,010	0,144

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.5.2, παρατηρούμε αύξηση της σταθεράς a και μείωση της σταθεράς b του λογαριθμικού μοντέλου με μείωση του χρόνου διαβροχής, με το μη διαβρεγμένο δεντρολίβανο να παρουσιάζει την μέγιστη τιμή του $a=22,115$ και το το δεντρολίβανο που έχει διαβραχεί για 24 h την μέγιστη τιμή του $b=55,010$. Οι συντελεστές συσχέτισης είναι εξίσου ικανοποιητικοί στο σύνολο των πειραμάτων με εύρος τιμών μεταξύ 0,936-0,980. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,479-4,878, γεγονός που φανερώνει μια αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων.

- ✓ Μοντέλο Peleg: Οι συντελεστές συσχέτισης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα των εκχυλίσεων του διαβρεγμένου δεντρολίβανου και για τους τρεις χρόνους διαβροχής (2, 4 και 24 h), δεν είναι ικανοποιητικοί με εύρος τιμών μεταξύ 0,795-0,885. Η μέση τετραγωνική απόκλιση κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 2,738-18,416. Συνεπώς, το μοντέλο Peleg δεν έχει καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα των εκχυλίσεων του διαβρεγμένου δεντρολίβανου.

5.5.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης



Διάγραμμα 5.5.4. Απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά σε συνάρτηση με τον χρόνο για κάθε χρόνο διαβροχής

Με βάση το διάγραμμα 5.5.4 παρατηρούμε ότι με την διαβροχή του δεντρολίβανου πριν την εκχύλισή του συμβάλλει σε αισθητή αύξηση των αποδόσεων των εκχυλισμένων φαινολικών συστατικών, ειδικά στους αρχικούς χρόνους της εκχύλισης. Οι καμπύλες των αποδόσεων των φαινολικών συστατικών με τον χρόνο, μας δείχνουν ότι οι ρυθμοί αύξησής τους είναι παρόμοιοι σε καθένα από τα πειράματα, όπου έχει πραγματοποιηθεί διαβροχή του δεντρολίβανου και μικρότεροι από τον αντίστοιχο ρυθμό αύξησής τους όταν το δεντρολίβανο δεν έχει διαβραχεί. Με την διαβροχή του δεντρολίβανου για 4 h επιτυγχάνεται η μέγιστη τελική απόδοση φαινολικών.

Πίνακας 5.5.3. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε χρόνο διαβροχής

Χρόνος διαβροχής (h)	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
0	59,3	257,8	23,0
2	59,9	235,6	25,4
4	64,9	208,8	31,1
24	62,2	238,8	26,0

Από τις τιμές του πίνακα 5.5.3 παρατηρούμε ότι οι τελικές αποδόσεις της εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά είναι παρόμοιες στους διάφορους χρόνους διαβροχής με μία μικρή αύξηση στις 4 h. Οι μεγάλες διαφορές στις αποδόσεις σε στερεές ουσίες ενδέχεται να οφείλονται σε πειραματικά σφάλματα. Συνεπώς, δεν μπορούμε να αποφανθούμε με σιγουρία πως επηρεάζει η διαβροχή την εκλεκτικότητα της εκχύλισης.

5.5.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Πίνακας 5.5.4. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε χρόνο διαβροχής

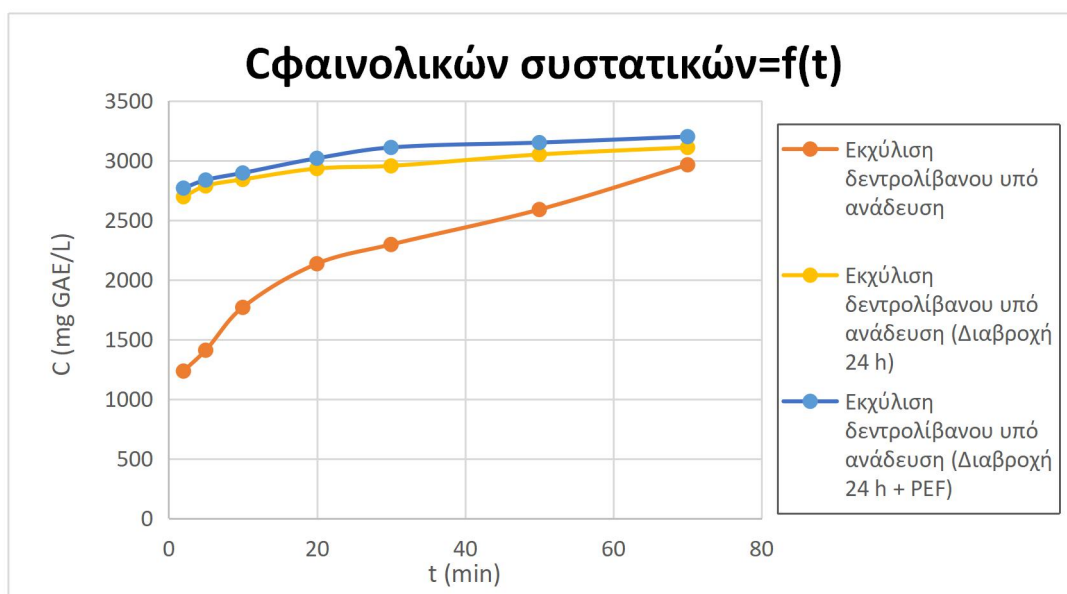
Χρόνος διαβροχής (h)	GAEAC (mg GAE/L)
0	1196
2	1560
4	1742
24	1613

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 5.5.4, παρατηρούμε ότι η εκχύλιση του δεντρολίβανου το οποίο είχε διαβραχτεί για 4 h, σημειώνει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1742 mg GAE/L). Συνεπώς, η διαβροχή του δεντρολίβανου για 4 h επιτυγχάνει την μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά, την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ακολουθεί η διαβροχή για 24 h και τέλος η διαβροχή για 2 h, η οποία δεν εμφανίζει ιδιαίτερα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το μη διαβρεγμένο δεντρολίβανο.

5.6. Επίδραση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF)

Παρακάτω πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης της χρήσης παλμικών πεδίων πριν την εκχύλιση του δεντρολίβανου στην τελική απόδοση της εκχύλισης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε διαβροχή του δεντρολίβανου με απιονισμένο νερό και παραμονή σε κλειστό δοχείο στο ψυγείο για 24 h, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με χρήση παλμικών πεδίων στο περιεχόμενο του δοχείου και στην συνέχεια εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη 60% EtOH - 40% H₂O και επακόλουθος προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της μεθόδου DPPH.

5.6.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο



Διάγραμμα 5.6.1. Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε συνάρτηση με τον χρόνο κάθε εκχυλίσματος με και χωρίς να έχει προηγηθεί εκχύλιση με χρήση παλμικών πεδίων

Με βάση το διάγραμμα 5.6.1 παρατηρούμε μια μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων, καθώς και του ρυθμού αύξησης των φαινολικών συστατικών του διαβρεγμένου για 24 h, όταν σε αυτό στην συνέχεια πραγματοποιηθεί εκχύλιση με PEF. Συνεπώς, δεν έχει νόημα περαιτέρω κινητική μελέτη της εκχύλισης με χρήση PEF.

5.6.2. Απόδοση εκχύλισης σε ολικά φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά - εκλεκτικότητα εκχύλισης

Στον πίνακα 5.6.1 παρουσιάζονται οι τελικές αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά, σε στερεές ουσίες και οι εκλεκτικότητες των εκχυλίσεων σε κάθε πείραμα αντίστοιχα.

Πίνακας 5.6.1. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για πείραμα

Πείραμα	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
Εκχύλιση υπό ανάδευση	59,3	257,8	23,0
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση υπό ανάδευση	62,2	238,8	26,0
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση με χρήση PEF + Εκχύλιση υπό ανάδευση	64,0	240,0	26,7

Από τις τιμές του πίνακα 5.6.5 παρατηρούμε ότι, η εκχύλιση του δεντρολίβανου με χρήση παλμικού ηλεκτρικού πεδίου πριν την εκχύλιση υπό ανάδευση συμβάλλει σε μικρή αύξηση της απόδοσης φαινολικών συστατικών και επακόλουθη αύξηση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης. Συγκεκριμένα, με την χρήση PEF πριν την εκχύλιση υπό ανάδευση επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση σε φαινολικά (64,0 mg GAE/g_{DW}) και η μέγιστη εκλεκτικότητα εκχύλισης (26,7%).

5.6.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Πίνακας 5.6.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GAE/L) του τελικού εκχυλίσματος για κάθε πείραμα

Πείραμα	GAEAC (mg GAE/L)
Εκχύλιση υπό ανάδευση	1196
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση υπό ανάδευση	1613
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση με χρήση PEF + Εκχύλιση υπό ανάδευση	1746

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 5.6.2, παρατηρούμε ότι η εκχύλιση με χρήση PEF πριν την εκχύλιση υπό ανάδευση σημειώνει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1746 mg GAE/L). Επομένως, η εκχύλιση του δεντρολίβανου με χρήση PEF βελτιώνει ελάχιστα την τελική απόδοση σε ολικά φαινολικά συστατικά και την αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την απλή διαβροχή.

5.7. Σύγκριση μεθόδων

Παρακάτω πραγματοποιείται σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης του δεντρολίβανου που πραγματοποιήθηκαν με διαλύτη περιεκτικότητας 60% EtOH - 40% H₂O: εκχύλιση υπό ανάδευση, διαβροχή για 24 h και στην συνέχεια εκχύλιση υπό ανάδευση, χρήση PEF σε ήδη διαβρεγμένο δεντρολίβανο για 24 h και στη συνέχεια εκχύλιση υπό ανάδευση και τέλος εκχύλιση με υπερήχους.

5.7.1. Σύγκριση αποδόσεων σε ολικά φαινολικά, στερεά συστατικά και εκλεκτικότητα

Πίνακας 5.7.1. Αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά και ολικά στερεά και εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων για κάθε πείραμα

Πείραμα	Απόδοση φαινολικών ουσιών (mg GAE/g DW δεντρολίβανου)	Απόδοση στερεών ουσιών (mg στερεών/g DW δεντρολίβανου)	Εκλεκτικότητα %
Εκχύλιση υπό ανάδευση	59,3	257,8	23,0
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση υπό ανάδευση	62,2	238,8	26,0
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση με χρήση PEF + Εκχύλιση υπό ανάδευση	64,0	240,0	26,7
Εκχύλιση με υπερήχους	77,5	258,9	29,9

Από τις τιμές του πίνακα 5.7.1, παρατηρούμε ότι με την εκχύλιση του δεντρολίβανου σε λουτρό υπερήχων επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη απόδοση φαινολικών ουσιών (77,5 mg GAE/g_{DW}) και η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης (29,9%). Ακολουθεί η εκχύλιση του διαβρεγμένου δεντρολίβανου με χρήση PEF πριν την εκχύλισή του υπό ανάδευση (64,0 mg GAE/g_{DW} και 26,7% αντίστοιχα). Τρίτο στην σειρά έρχεται το πείραμα της εκχύλισης του διαβρεγμένου δεντρολίβανου (62,2 mg GAE/g_{DW} και 26,0% αντίστοιχα) και τελευταίο το πείραμα της εκχύλισης υπό ανάδευση (59,3 mg GAE/g_{DW} και 23,0% αντίστοιχα). Συνεπώς, η εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων κρίνεται ως η πιο αποδοτική.

5.7.2. Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Πίνακας 5.7.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος GAEAC (mg GA/L) για κάθε πείραμα

Πείραμα	GAEAC (mg GAE/L)
Εκχύλιση υπό ανάδευση	1196
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση υπό ανάδευση	1613
Διαβροχή για 24 h + Εκχύλιση με χρήση PEF + Εκχύλιση υπό ανάδευση	1746
Εκχύλιση με υπερήχους	1890

Με βάση τον πίνακα 5.7.2, παρατηρούμε ότι με την εκχύλιση του δεντρολίβανου σε λουτρό υπερήχων επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (1890 mg GAE/L). Ακολουθεί η εκχύλιση του διαβρεγμένου δεντρολίβανου με χρήση PEF πριν την εκχύλιση του υπό ανάδευση (1746 mg GAE/L). Τρίτο στην σειρά έρχεται το πείραμα της εκχύλισης του διαβρεγμένου δεντρολίβανου (1613 mg GAE/L) και τελευταίο το πείραμα της εκχύλισης υπό ανάδευση (1196 mg GAE/L). Άρα, η εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων επιτυγχάνει τα βέλτιστα αποτελέσματα και όσον αφορά την απόδοση σε ολικά φαινολικά και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης αλλά και την αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος.

6. Συμπεράσματα

Τα αρωματικά φυτά και γενικότερα τα φυτά της οικογένεια *Lamiaceae* είναι πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι παράμετροι επίδρασης στην εκχύλιση του δεντρολίβανου, ενός φυτού πλούσιου σε βιοδραστικά συστατικά, ροσμαρινικό οξύ, φλαβονοειδή και φαινολικά διτερπένια, συστατικά που είναι ευρέως γνωστά για την ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση.

Αρχικά, για την μελέτη της επίδρασης του διαλύτη, πραγματοποιήθηκε μια σειρά εκχυλίσεων αλεσμένου δεντρολίβανου μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας με μίγματα αιθανόλης-νερού και καθαρής αιθανόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μίγματα αιθανόλης-νερού έδωσαν τις μεγαλύτερες αποδόσεις των συστατικών του δεντρολίβανου. Συγκεκριμένα, το μίγμα με περιεκτικότητα 60% αιθανόλη-40% νερό σημείωσε τη μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά, τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, τη μεγαλύτερη απόδοση σε ροσμαρινικό οξύ και σε φλαβονοειδή. Αν όμως, οι ανάγκες της εκχύλισης στοχεύουν σε μέγιστη απόδοση φαινολικών διτερπενίων, τότε ο διαλύτης με περιεκτικότητα 80% αιθανόλη-20% νερό είναι ο πλέον κατάλληλος. Σε μια δεύτερη σειρά πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υπό ανάδευση με τις ίδιες συνθήκες αλλά με διαλύτες μίγματα ακετόνης-νερού και καθαρή ακετόνη. Όμοια με τα αιθανολικά μίγματα, ο μέτριας πολικότητας διαλύτης 60% ακετόνη-40% νερό εμφάνισε τη μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά, τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, τη μεγαλύτερη απόδοση σε ροσμαρινικό οξύ και σε φλαβονοειδή, με τον διαλύτη 80% ακετόνη-20% νερό να σημειώνει και σε αυτή την περίπτωση τη μεγαλύτερη απόδοση σε ολικά φαινολικά διτερπένια. Στην μετέπειτα σύγκριση όλων των διαλυτών, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το μίγμα 60% ακετόνη-40% νερό είναι ο πιο αποδοτικός διαλύτης της απλής εκχύλισης υπό ανάδευσης του δεντρολίβανου, καθώς παρουσιάζει τις μέγιστες αποδόσεις στα επιμέρους συστατικά του δεντρολίβανου, τη μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αν όμως, οι ανάγκες της εκχύλισης στοχεύουν σε μέγιστη απόδοση φαινολικών διτερπενίων, τότε ο διαλύτης με περιεκτικότητα 80% ακετόνη-20% νερό είναι ο καταλληλότερος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κοκκομετρίας του αλεσμένου δεντρολίβανου, όπου με τη βοήθεια ειδικών κοσκίνων χωρίστηκε σε 5 επιμέρους κλάσματα και ακολούθησαν εκχυλίσεις τους υπό ανάδευση και διαλύτη 80% ακετόνη-20% νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη μείωση της κοκκομετρίας του υλικού, αυξάνονται οι αποδόσεις της εκχύλισης και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, η μικρότερη κοκκομετρία <315 μm παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικά συστατικά και σε ολικά φαινολικά διτερπένια, καθώς και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απλή εκχύλιση υπό ανάδευση αλεσμένου δεντρολίβανου μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με διαλύτη 40% ακετόνη-60% νερό σε θερμοκρασίες 22°C, 40°C και 60°C. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης σε φαινολικά συστατικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά σε μείωση της εκλεκτικότητας της εκχύλισης λόγω του γεγονότος ότι εκχυλίζονται όλο και περισσότερα στερεά που είναι αδιάλυτα στην θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επίσης, έδειξε αύξηση της απόδοσης σε ροσμαρινικό οξύ και σε ολικά φαινολικά διτερπένια. Στην περίπτωση των φλαβονοειδών, ωστόσο, παρατηρήσαμε την αντίστροφη πορεία, δηλαδή μείωση της απόδοσης της εκχύλισης στα συστατικά αυτά, με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Κατά την εκχύλιση του αλεσμένου δεντρολίβανου μη συγκεκριμένης κοκκομετρίας σε λουτρό υπερήχων, συχνότητας 37 kHz, με διαλύτες περιεκτικότητας 80% ακετόνη-20% νερό, 60% ακετόνη-40% νερό και 60% αιθανόλη-40% νερό, διαπιστώθηκε ότι η χρήση υπερήχων αύξησε τις αντίστοιχες αποδόσεις στα φαινολικά συστατικά, την εκλεκτικότητα της εκχύλισης και την αντιοξειδωτική ικανότητα σε κάθε διαλύτη αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ο διαλύτης 60% αιθανόλη-40% νερό αποδείχθηκε το πιο αποδοτικό μέσο εκχύλισης με χρήση υπερήχων, καθώς παρουσίασε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά, ροσμαρινικό οξύ, φλαβονοειδή και φαινολικά διτερπένια, καθώς και την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα εκχύλισης και αντιοξειδωτική δράση. Η απόδοση σε φλαβονοειδή μειώθηκε λίγο με τη χρήση υπερήχων με διαλύτη το μίγμα 60% ακετόνη-40% νερό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανάπτυξη υψηλής θερμοκρασίας στο λουτρό, με αποτέλεσμα την καταστροφή μιας ποσότητας τους.

Για την εκτίμηση της επίδρασης της διαβροχής του δεντρολίβανου στην εκχύλιση, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υπό ανάδευση, με διαλύτη 60% αιθανόλη-40% νερό, διαβρεγμένου δεντρολίβανου με απιονισμένο νερό, το οποίο είχε παραμείνει στο ψυγείο σε κλειστό δοχείο για 2 h, 4 h και 24 h αντίστοιχα. Η αύξηση του χρόνου διαβροχής από 0-4 h έδειξε αύξηση των αποδόσεων της εκχύλισης σε φαινολικά και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στον αμέσως επόμενο χρόνο διαβροχής των 24 h, τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή μείωση των αποδόσεων σε φαινολικά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με το διαβρεγμένο κατά 4 h δεντρολίβανο. Συμπερασματικά, με τις 4 h διαβροχή του υλικού μας έχουμε τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Σε ήδη διαβρεγμένο για 24 h δεντρολίβανο, πραγματοποιήθηκε προεπεξεργασία του με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, ισχύος 5,2 kV σε χρόνο 15 μs, πριν την απλή εκχύλιση υπό ανάδευση με διαλύτη 60% αιθανόλη-40% νερό. Με την χρήση PEF, αύξηθηκαν πολύ λίγο οι αποδόσεις σε φαινολικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα, σε σύγκριση με την απλή διαβροχή, γεγονός που δεν δικαιολογεί τη χρήση ήπιας προκατεργασίας με PEF για αύξηση της απόδοσης.

Με σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης για τον διαλύτη 60% αιθανόλη-40% νερό, δηλαδή της απλής εκχύλισης υπό ανάδευση, της διαβροχής του δεντρολίβανου για 24 h με μετέπειτα εκχύλιση του υπό ανάδευση, της χρήσης PEF ως στάδιο μετά την

διαβροχή του για 24 h και πριν την εκχύλιση υπό ανάδευση και τέλος την εκχύλιση με χρήση υπερήχων, η εκχύλιση με υπέρηχους αποδείχθηκε ως η πιο αποδοτική ως προς την ολική απόδοση σε φαινολικά, την εκλεκτικότητα της εκχύλισης και την αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού εκχυλίσματος.

Σε όλα τα πειράματα, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη με την χρήση τριών μοντέλων, του μοντέλου μεταφοράς μάζας, του λογαριθμικού μοντέλου και του μοντέλου Peleg. Στο σύνολο των πειραμάτων το μοντέλο μεταφοράς μάζας και το λογαριθμικό μοντέλο έδωσαν τις πιο ικανοποιητικές προσαρμογές στα πειραματικά μας δεδομένα.

7. Βιβλιογραφία

Simona Birtic', Pierre Dussort, François-Xavier Pierre, Antoine C. Bily, Marc Roller, 2015. *Carnosic acid*, Phytochemistry

Jeremy J. Johnson, 2011. *Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent*, Cancer Letters 305, pages 1-7

Senanayake, S.P.J.N. (2018). *Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds*, J. Food Bioact. 2, pages 51–57.

Giedrė Kasparavičienė, Kristina Ramanauskienė, Arūnas Savickas, Saulė Velžienė, Zenona Kalvėnienė, Daiva Kazlauskienė, Ona Ragažinskienė, Kostas Ivanauskas, 2013. *Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different Rosmarinus officinalis L. ethanolic extracts*, BIOLOGIJA Vol. 59, No. 1, Pages 39–44

S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M. J. Cocero, 2012. *Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents*, Journal of Food Engineering Volume 109, Issue 1, Pages 98-103

Raul N. Carvalho Jr., Lucinewton S. Moura, Paulo T.V. Rosa, M. Angela A. Meireles, 2005. *Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity*, The Journal of Supercritical Fluids 35, Pages 197–204

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

C. Boutekedjiret, F. Bentahar, R. Belabbes and J. M. Bessiere, 2003. *Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation*, Flavour and Fragrance Journal 18, pages 481–484

N. Mulinacci, M. Innocenti, M. Bellumori, C. Giaccherini, V. Martini, M. Michelozzi, 2011. *Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study*, Talanta 85, Pages 167–176

Eleni Bozinou, Ioanna Karageorgou, Georgia Batra, Vassilis G. Dourtoglou and Stavros I. Lalas, 2019. *Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of Moringa oleifera Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques*, Beverages

M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibáñez, 2010. *Green processes for extraction of bioactives from Rosemary. Chemical and functional characterization via*

UPLC-MS/MS and in-vitro assays, Journal of Chromatography A, Volume 1217, Issue 16, Pages 2512-2520

Vanielie Terrence Justine, Muskhazli Mustafa, Sulaiman S. Kankara and Rusea Go, 2019. *Effect of Drying Methods and Extraction Solvents on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of Scurrula ferruginea (Jack) Danser (Loranthaceae) Leaf Extracts*, Sains Malaysiana 48, Pages 1383–1393

Saeedeh Arabshahi-Delouee, Asna Urooj, 2007. *Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves*, Food Chemistry 102, Pages 1233–1240

Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Brunton, N. P., (2011). *Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (Rosmarinus officinalis L.), marjoram (Origanum majorana L.) and oregano (Origanum vulgare L.) using response surface methodology*, Food Chemistry, 126(1),

M. Sanchez Guerrero, J. Sineiro Torres, Maria Jose Nunez, 2008. *Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling*. Bioresource Technology 99, pages 1311–1318

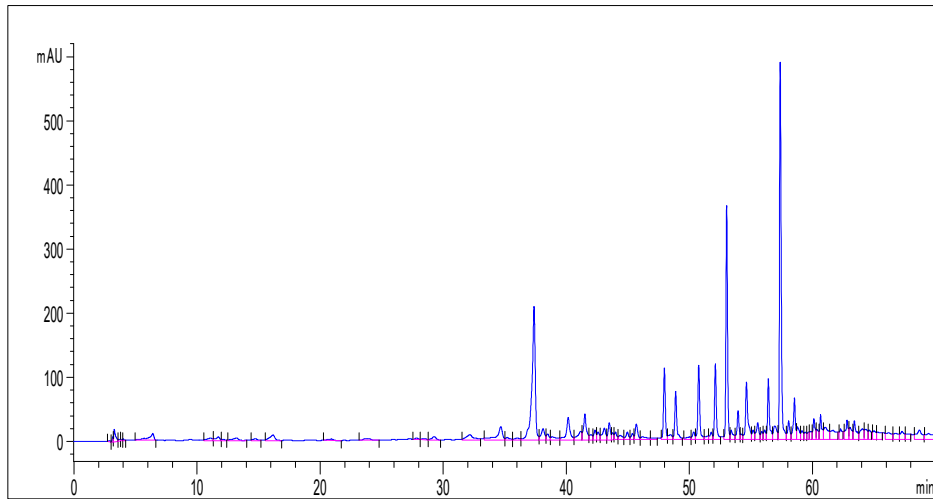
Celia M. Librán, Luis Mayor, Esperanza M. Garcia-Castello, Daniel Vidal-Brotons, 2013. *Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect*, Agricultural Sciences 4, Pages 56-62

Chung-Hung Chan, Rozita Yusoff, Gek-Cheng Ngoh, 2014. *Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction*. Chemical Engineering Research and Design 92, pages 1169–1186

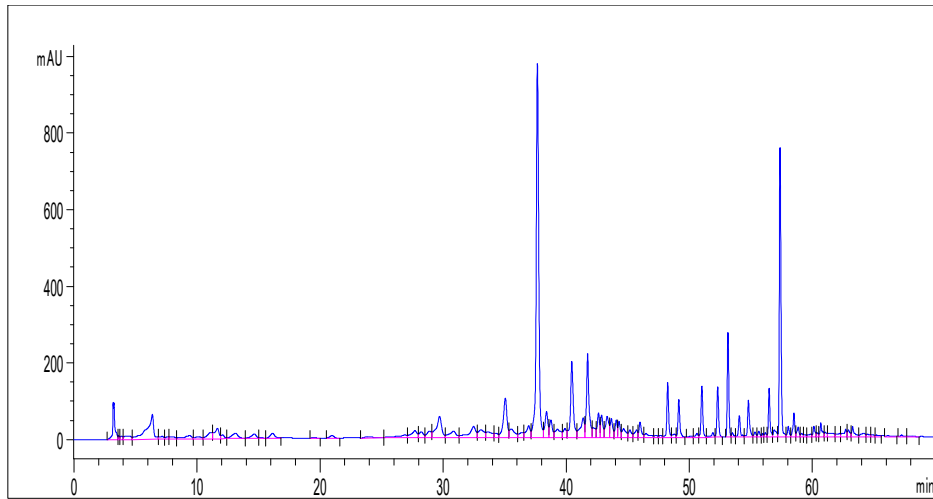
Ana Jurinjak Tusek, Maja Benkovic, Ana Belscak Cvitanovic, Davor Valinger, Tamara Jurina, Jasenka Gajdos Kljusuric, 2016. *Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants*. Industrial Crops and Products 91, pages 205–214

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

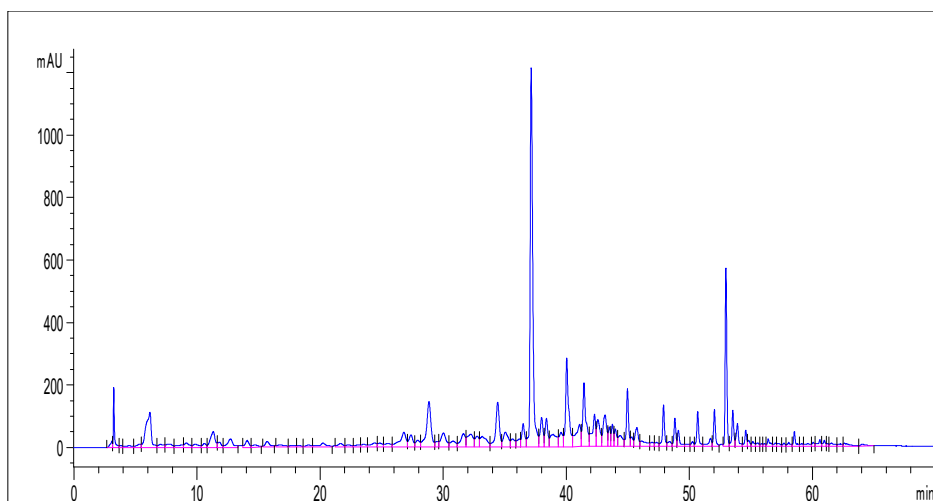
✓ Χρωματογραφήματα από τη μέθοδο Flan:



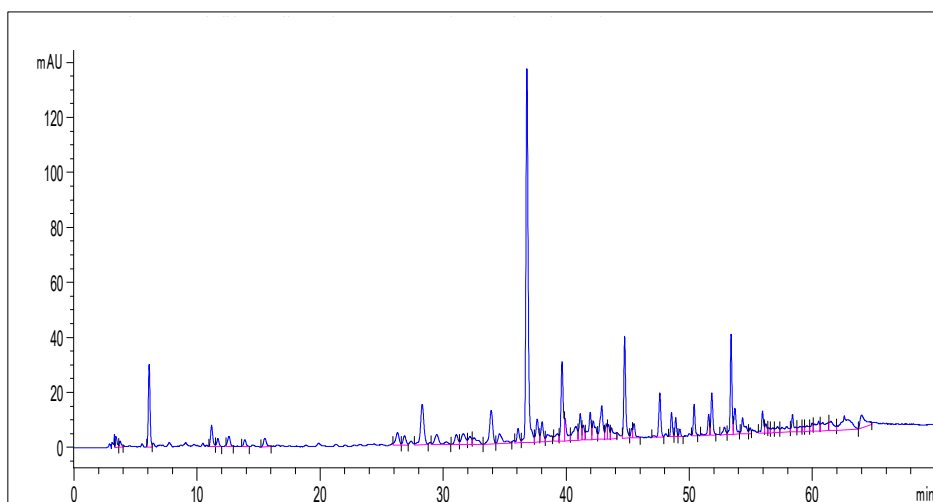
Διάγραμμα F.1. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 100% EtOH



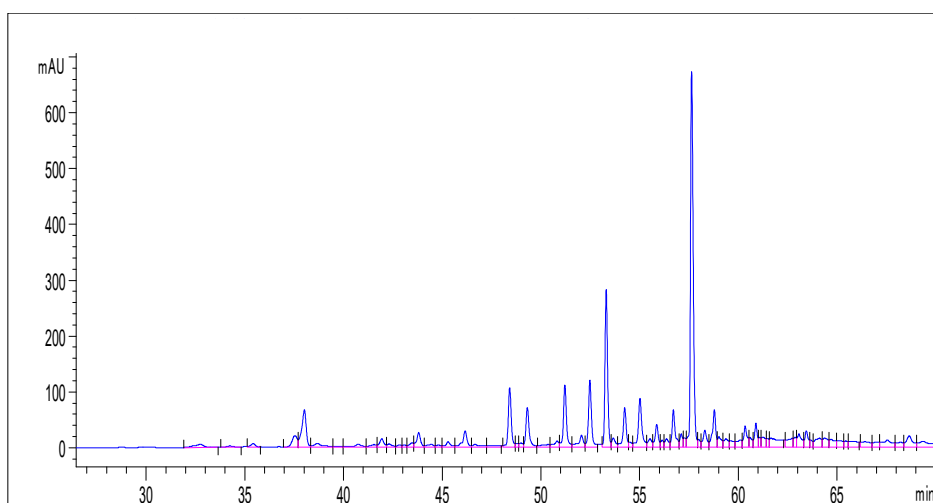
Διάγραμμα F.2. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% EtOH-20% H₂O



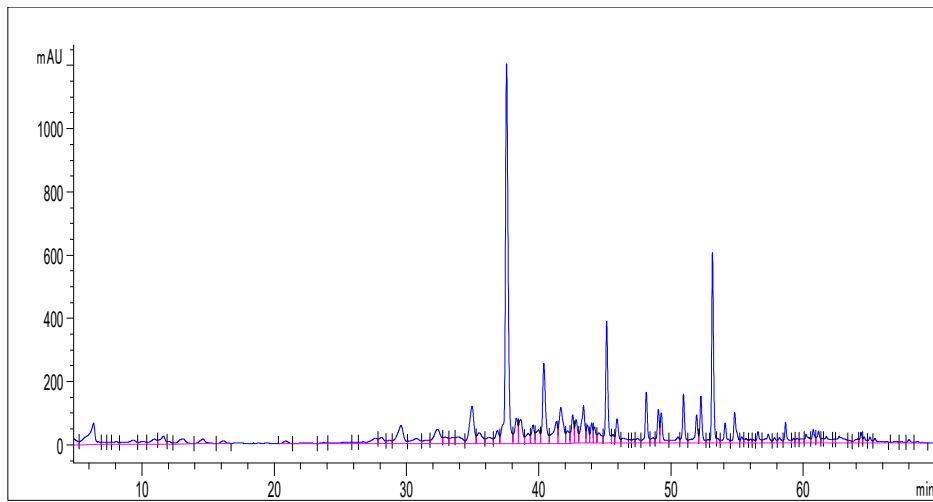
Διάγραμμα F.3. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% EtOH-40% H₂O



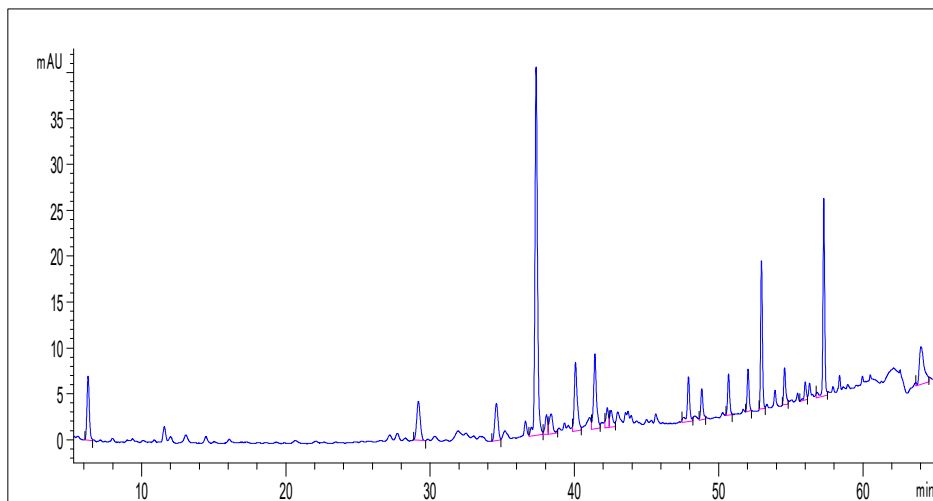
Διάγραμμα F.4. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 100% H₂O



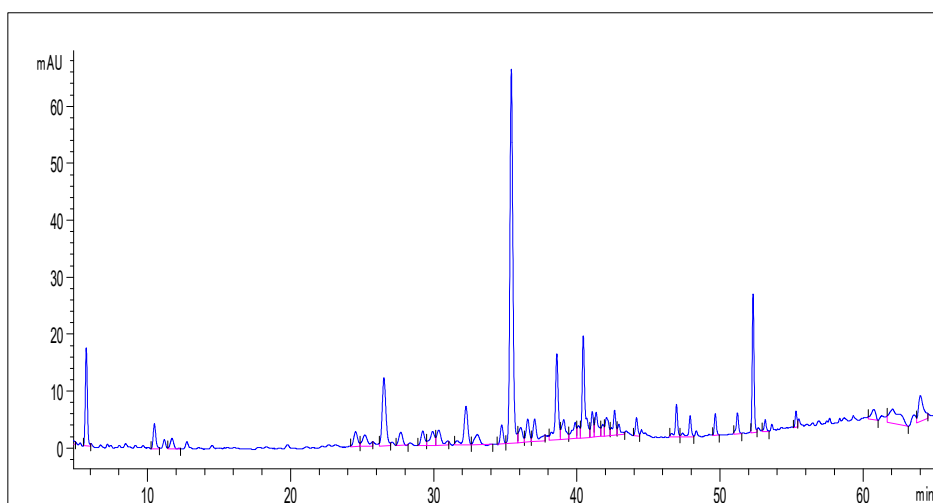
Διάγραμμα F.5. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 100% Acetone



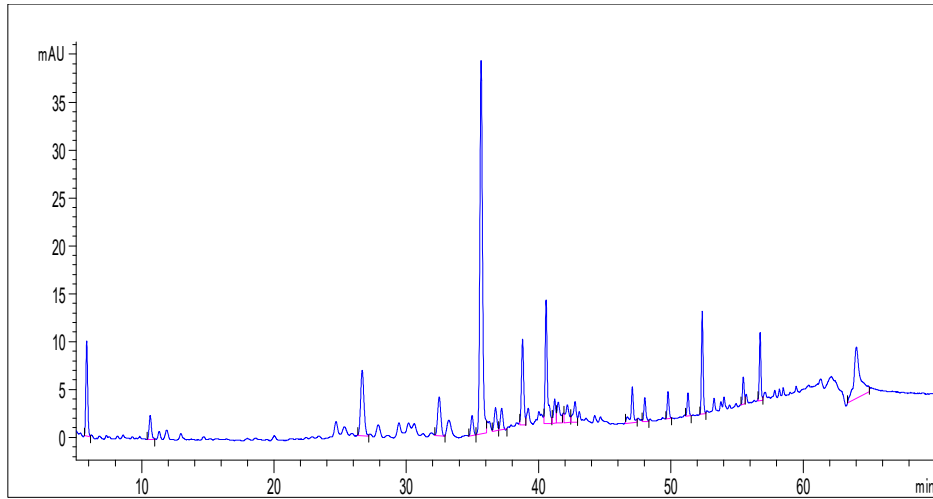
Διάγραμμα F.6. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% Acetone-20% H₂O



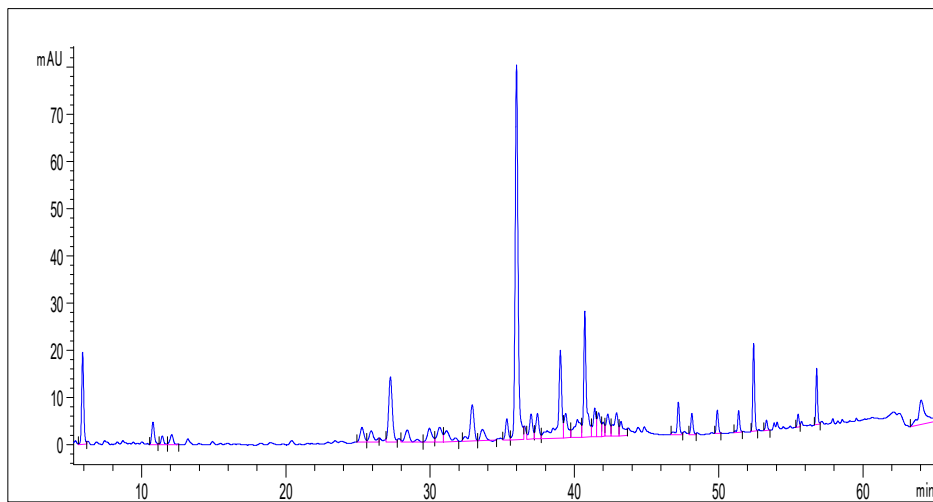
Διάγραμμα F.7. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% Acetone-40% H₂O



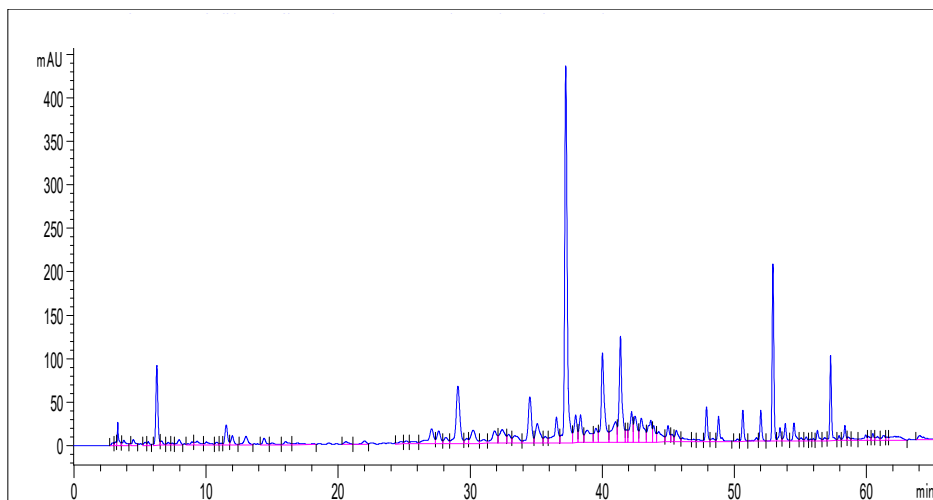
Διάγραμμα F.8. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 40% Acetone-60% H₂O



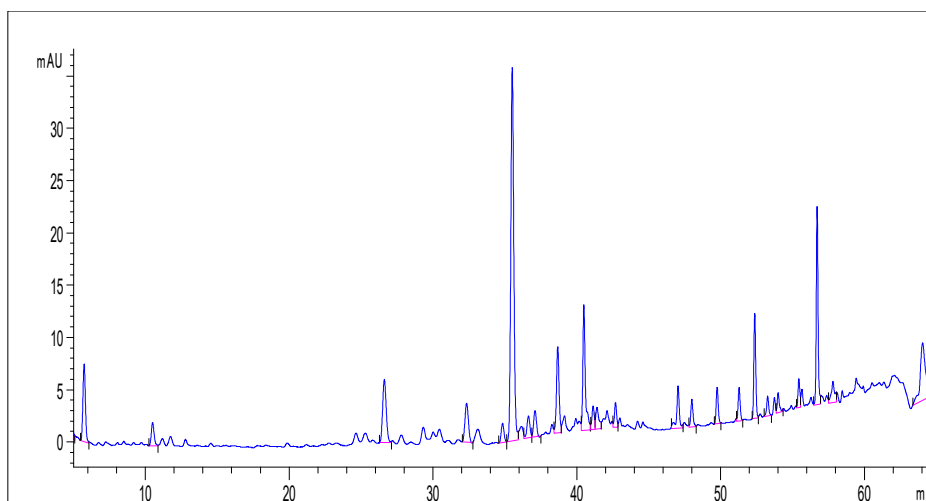
Διάγραμμα F.9. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O στην θερμοκρασία των 60°C



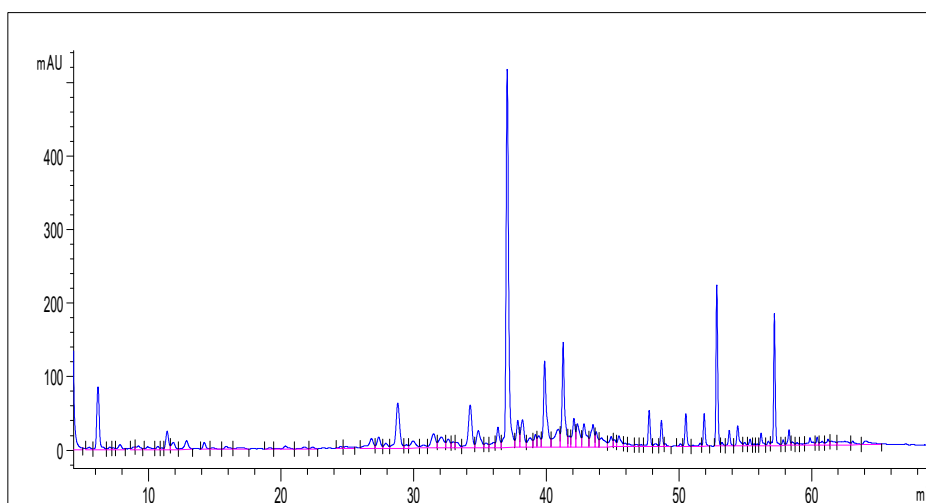
Διάγραμμα F.10. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O στην θερμοκρασία των 40°C



Διάγραμμα F.11. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% Acetone-20% H₂O (υπέρηχοι)

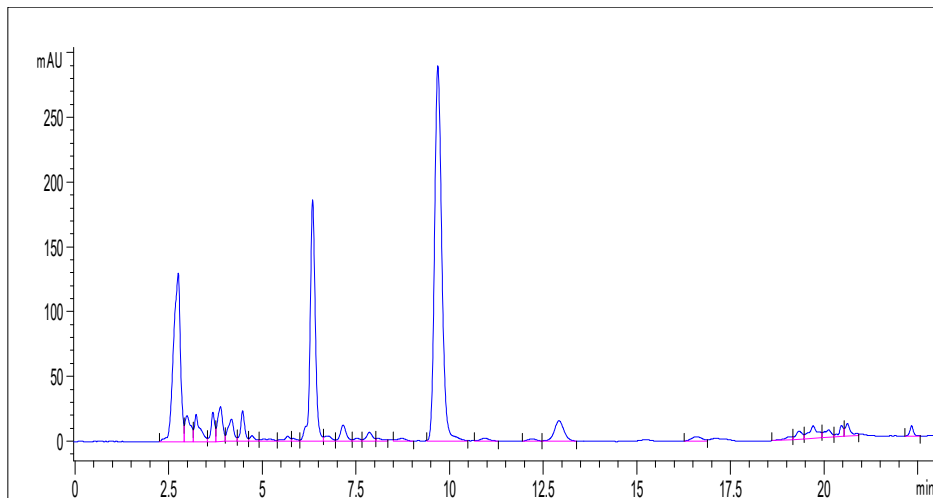


Διάγραμμα F.12. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% Acetone-40% H₂O (υπέρηχοι)

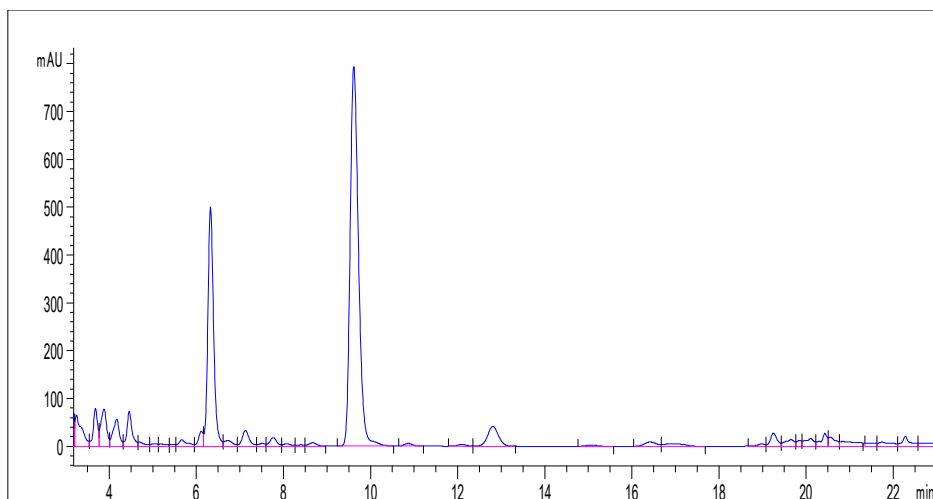


Διάγραμμα F.13. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% EtOH-40% H₂O (υπέρηχοι)

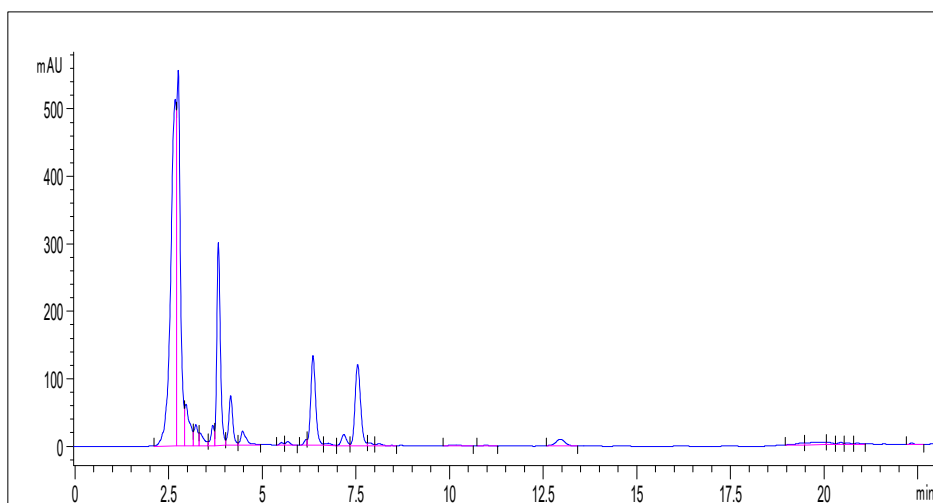
✓ Χρωματογραφήματα από τη μέθοδο Carnosic:



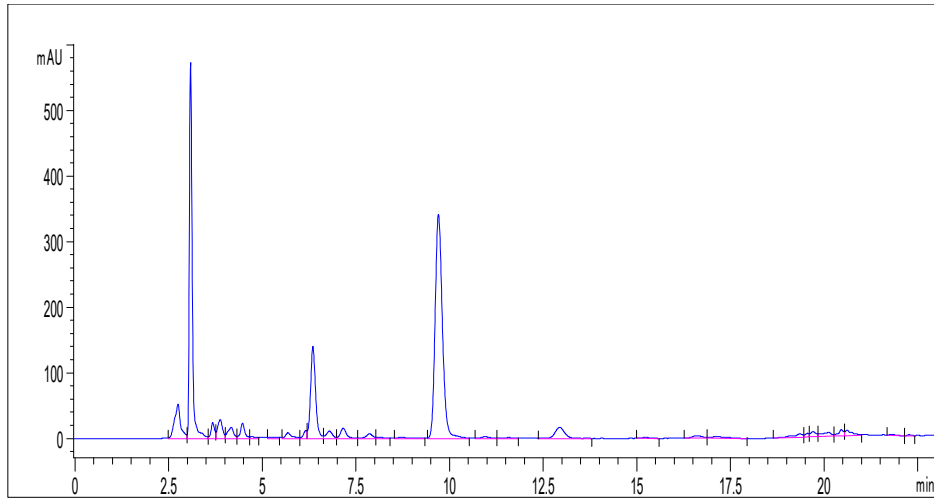
Διάγραμμα C.1. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 100% EtOH



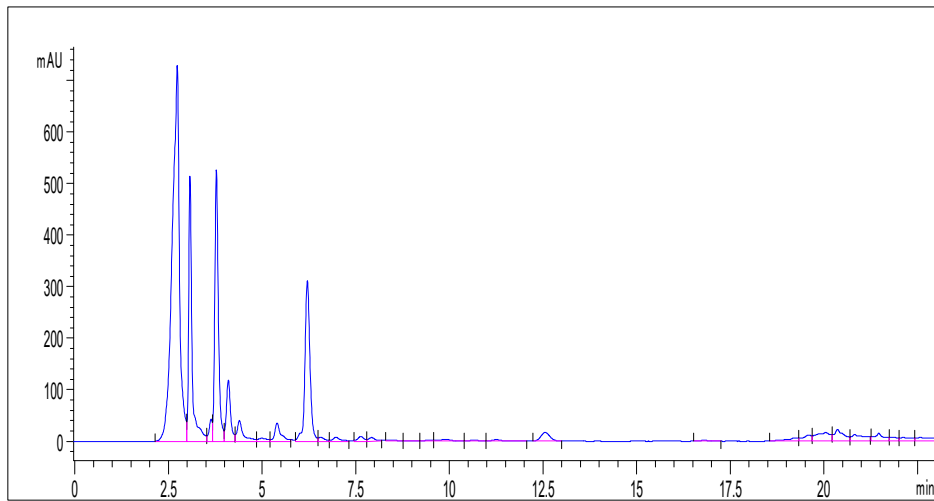
Διάγραμμα C.2. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% EtOH-20% H₂O



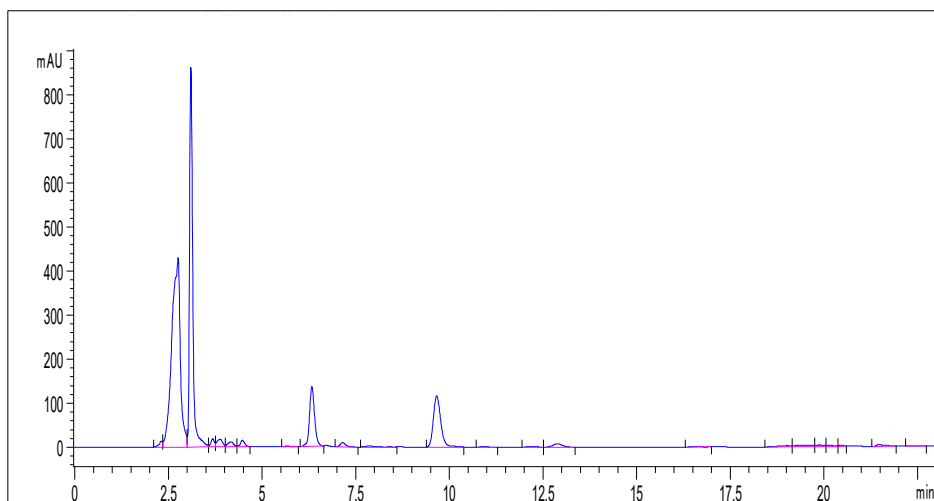
Διάγραμμα C.3. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% EtOH-40% H₂O



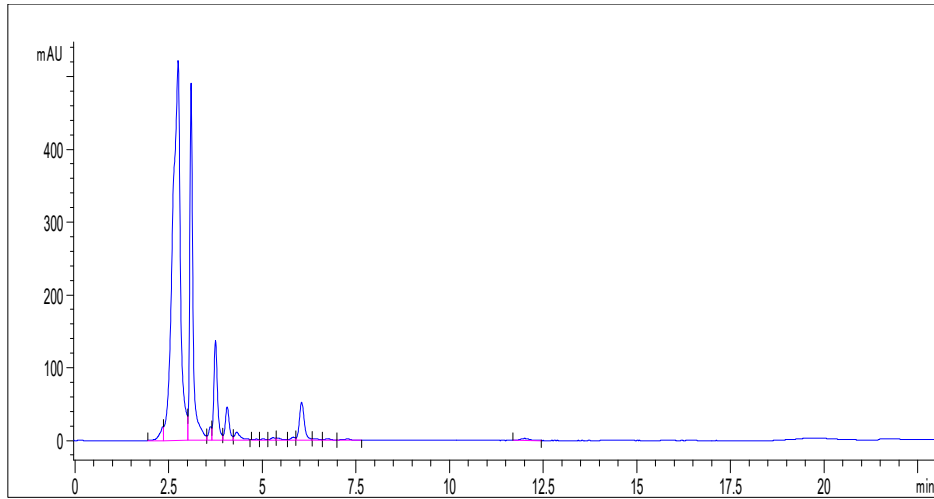
Διάγραμμα C.4. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 100% Acetone



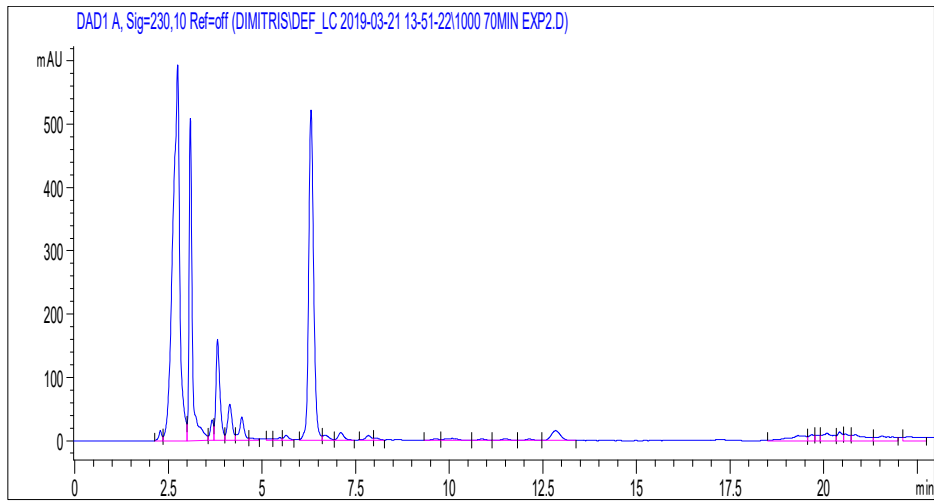
Διάγραμμα C.5. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% Acetone-20% H₂O



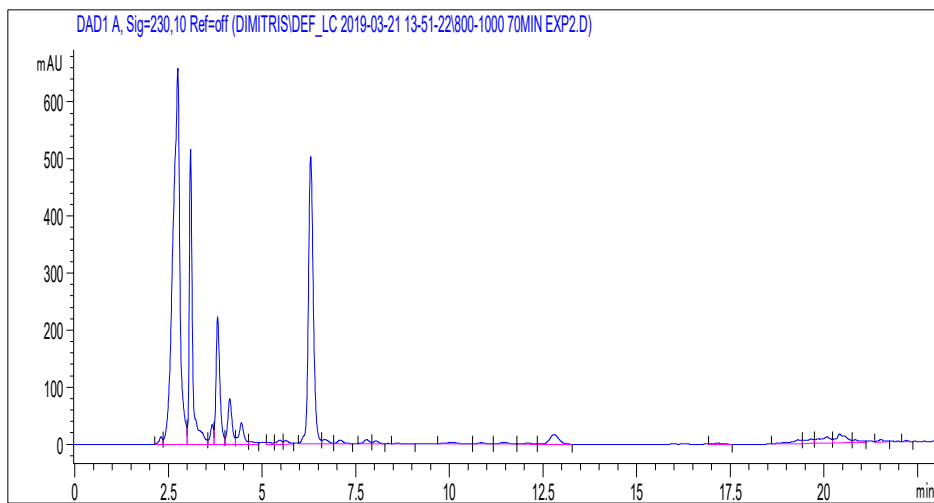
Διάγραμμα C.6. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% Acetone-40% H₂O



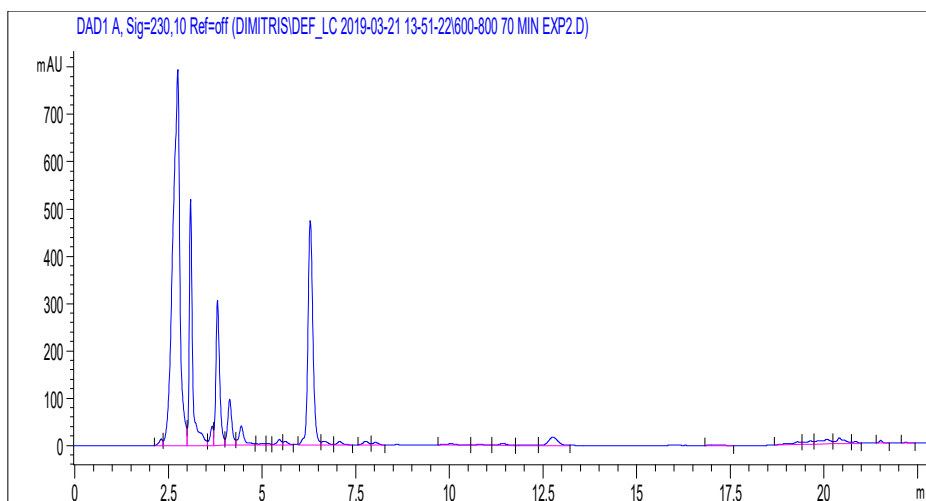
Διάγραμμα C.7. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 40% Acetone-60% H₂O



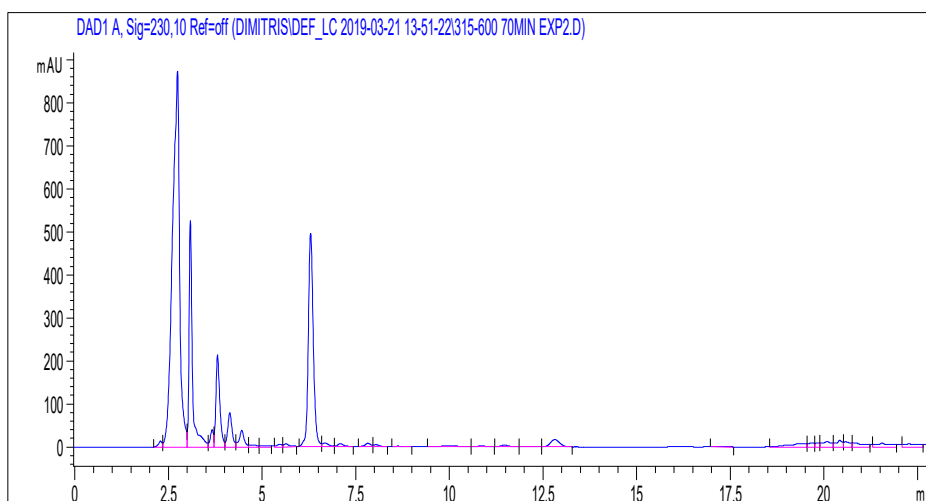
Διάγραμμα C.8. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O για την κοκκομετρία >1000 μm



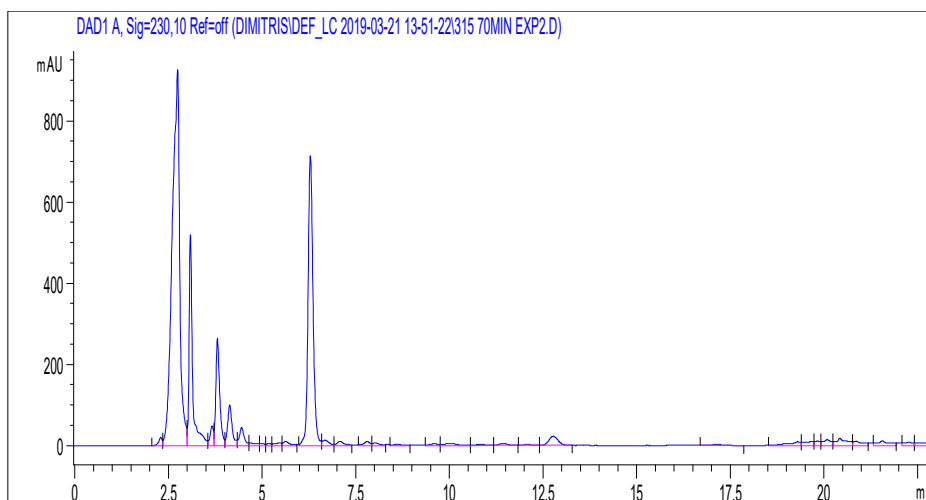
Διάγραμμα C.9. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O για την κοκκομετρία 1000-800 μm



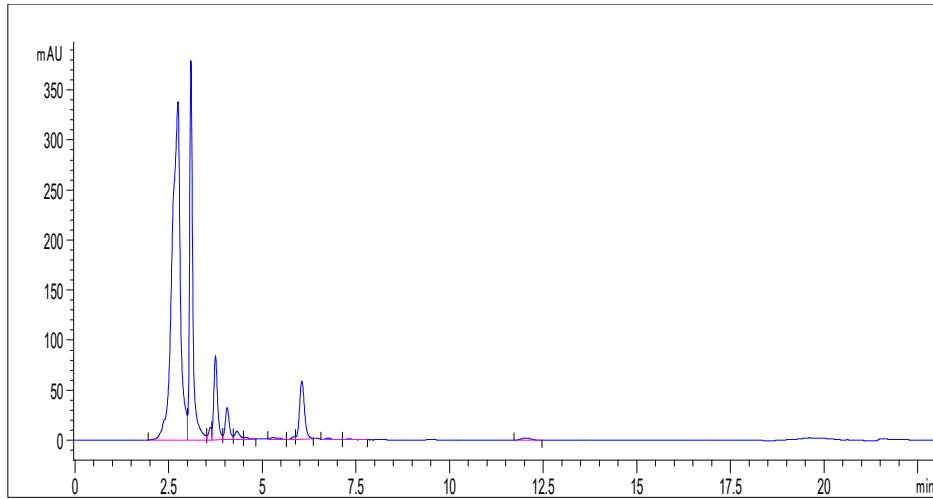
Διάγραμμα C.10. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O για την κοκκομετρία 800-600 μm



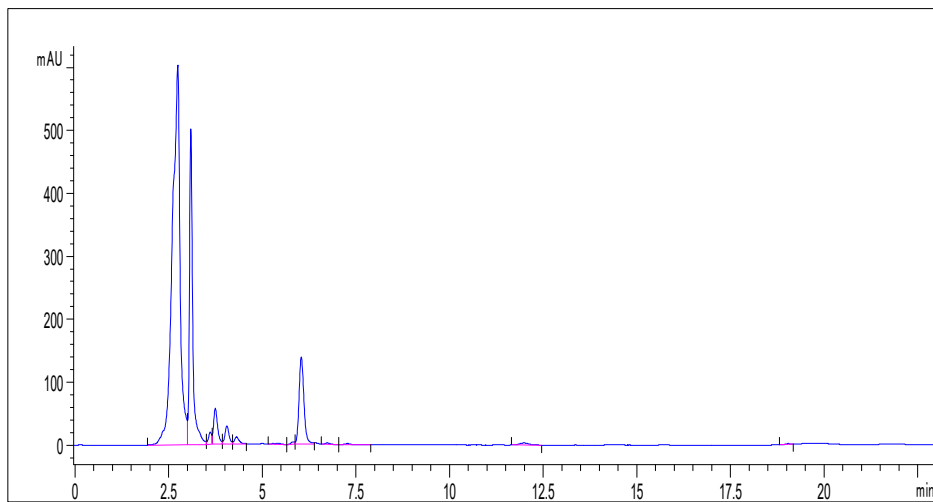
Διάγραμμα C.11. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O για την κοκκομετρία 600-315 μm



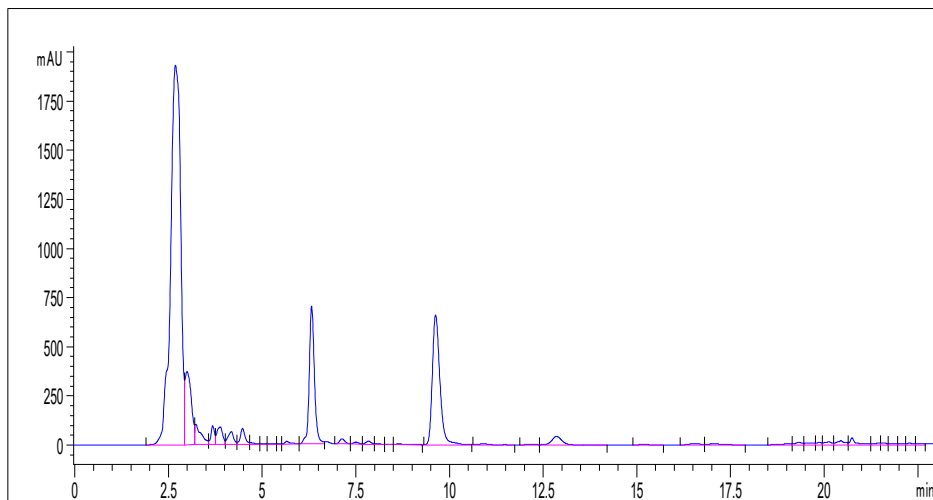
Διάγραμμα C.12. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 80% Acetone-20% H₂O για την κοκκομετρία <315 μm



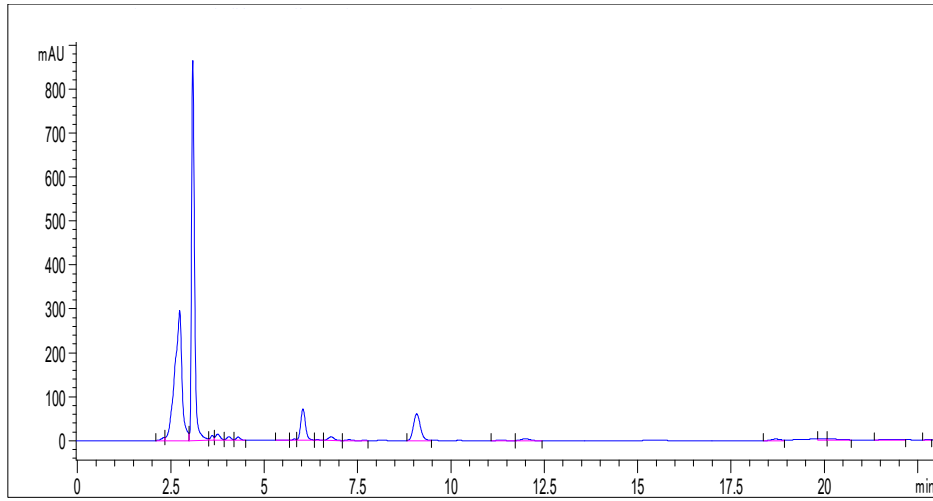
Διάγραμμα C.13. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O στην θερμοκρασία των 60°C



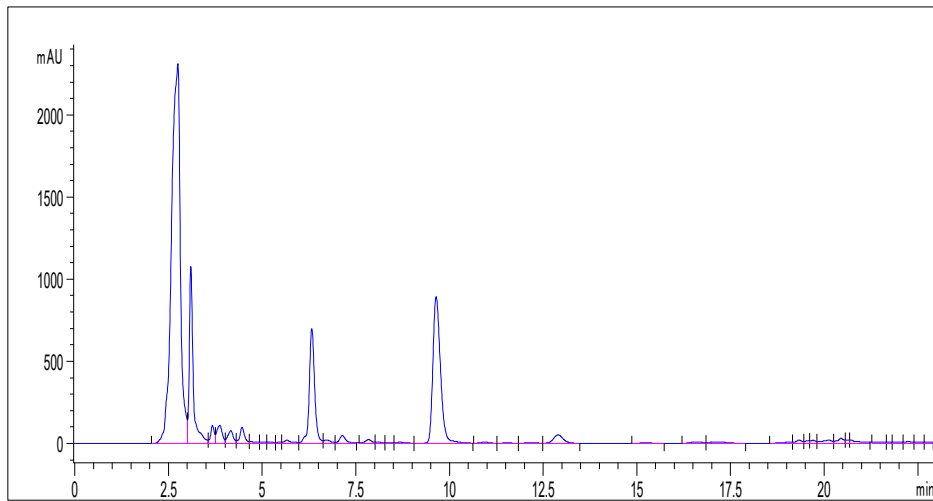
Διάγραμμα C.14. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με διαλύτη 40% Acetone-60% H₂O στην θερμοκρασία των 40°C



Διάγραμμα C.15. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 80% Acetone-20% H₂O (υπέρχοι)



Διάγραμμα C.16. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος με 60% Acetone-40% H₂O (υπέρηχοι)



Διάγραμμα C.17. Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος 60% EtOH-40% H₂O (υπέρηχοι)