



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

**Ανάπτυξη διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων
από φυτικές πρώτες ύλες χρησιμοποιώντας συνδυασμό
πράσινων διαλυτών και τεχνικών υψηλής ενέργειας**

Καλαφατέλη Στυλιανή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αναστασία Δέτση, Αναπλ. Καθηγήτρια

Αθήνα, Ιούλιος 2020

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Εργασίας. Επίσης, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τη Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη για την πολύτιμη βοήθειά της, τις συμβουλές της και την άψογη συνεργασία μας. Ακόμη, ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Νεφέλη Ποντίλλο για τη χρήσιμη βοήθειά της σχετικά με τη χρήση του λογισμικού Design Expert. Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου για την υπομονή και την καθημερινή στήριξη.

Περίληψη

Το τζίντζερ αποτελεί φυτική πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια για την αντιμετώπιση ενός ευρέος φάσματος ασθενειών. Υπεύθυνες για τη μεγάλη ποικιλία των βιολογικών του δράσεων είναι κατά κύριο λόγο οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτό.

Οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDESs) είναι μίγματα δύο ή περισσότερων στερεών ή υγρών συστατικών φυσικής προέλευσης, υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συστατικών τους. Είναι διαλύτες βιοσυμβατοί και βιοαποικοδομήσιμοι, μη εύφλεκτοι, φθινοί και αμελητέας τοξικότητας, ενώ παρασκευάζονται με μεθόδους οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον. Τα χαρακτηριστικά τους αυτά τους καθιστούν «πράσινους» διαλύτες. Έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν μια πληθώρα ενώσεων και χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες εφαρμογές. Στις διεργασίες εκχύλισης, φαίνεται πως τα NaDESs είναι ικανά να αντικαταστήσουν με επιτυχία τους παραδοσιακούς οργανικούς διαλύτες αυξάνοντας τη βιωσιμότητα των διεργασιών και σταθεροποιώντας ή προστατεύοντας τα παραλαμβανόμενα εκχυλίσματα.

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων ως πράσινη τεχνική υψηλής ενέργειας (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος παραλαβής ουσιών φυσικής προέλευσης, που χαρακτηρίζεται από υψηλή αποτελεσματικότητα, εκλεκτικότητα, αναπαραγωγιμότητα, μικρούς χρόνους εκχύλισης και ελάχιστο αντίκτυπο στο περιβάλλον. Η επικουρική δράση των υπερήχων στην εκχύλιση αποδίδεται στο φαινόμενο της σπηλαίωσης.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη σε εργαστηριακή κλίμακα και η βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων με πρώτη ύλη το τζίντζερ, παρουσία ενός φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ως εκχυλιστικού και αποθηκευτικού για τις βιοδραστικές αυτές ενώσεις μέσου, με τη χρήση υπερήχων. Συνετέθησαν επιτυχώς δύο NaDESs με τη μέθοδο θέρμανσης και μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν την κουρκουμίνη. Ο διαλύτης στον οποίο η ένωση αυτή είχε τη μεγαλύτερη διαλυτότητα επιλέχθηκε ως κατάλληλος για την εκχύλιση και υπέστη χαρακτηρισμό με θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H και ^{13}C NMR). Η εκχύλιση από το τζίντζερ έλαβε χώρα σε συσκευή probe υπερήχων, αφού προηγουμένως πραγματοποιήθηκαν ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα σε λουτρό υπερήχων. Επιπλέον, έγινε απομόνωση με συμβατική μέθοδο εκχύλισης και χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία ^1H NMR και LC-MS των ενώσεων 6-τζίντζερόλη και 6-σογκαόλη από το τζίντζερ.

Τα εκχυλίσματα τόσο από το λουτρό όσο και από το probe υπερήχων αξιολογήθηκαν με βάση την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και το ολικό φαινολικό φορτίο τους (Total Phenolic Content, TPC), με τις μεθόδους DPPH και Folin-Ciocalteu αντιστοίχως. Διαπιστώθηκε ότι το χρησιμοποιούμενο NaDES (βεταΐνη-γαλακτικό οξύ) είναι ικανοποιητικός διαλύτης εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων του τζίντζερ. Μελετήθηκε η επίδραση τριών παραγόντων (χρόνος εκχύλισης, αναλογία NaDES/νερού στο διαλύτη εκχύλισης και αναλογία διαλύτη/στερεής πρώτης ύλης) στις δύο παραπάνω αποκρίσεις και η διεργασία βελτιστοποιήθηκε μέσω πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment, DoE) τύπου Box-Behnken και στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων. Ο πιο σημαντικός όρος στο μοντέλο είναι η αναλογία του όγκου του υγρού διαλύτη προς τη μάζα του στερεού τζίντζερ.

- Λέξεις-κλειδιά: Τζίντζερ, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDESs), Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE), Αντιοξειδωτική δράση, Φαινολικές ενώσεις, Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken (BBD)

Abstract

Ginger is a plant raw material which has been used for thousands of years for the treatment of a wide spectrum of diseases. Responsible for the large variety of its biological activities are mainly the phenolic compounds present in it.

Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) are mixtures of two or more solid or liquid ingredients of natural origin, that are liquid at ambient temperature, due to the intermolecular hydrogen bonds formed between their constituents. They are biocompatible and biodegradable, non flammable, cheap and they have negligible toxicity, while they are prepared by economical and environmentally-friendly methods. These characteristics of theirs make them “green” solvents. They have the ability to dissolve a plethora of compounds and they are used in numerous applications. In extraction processes, NaDESs seem to be able to replace successfully the traditional organic solvents increasing the sustainability of the processes and stabilizing or protecting the obtained extracts.

The extraction with the use of ultrasound as a green high-energy technique (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) is a promising method of obtaining substances of natural origin, that is characterized by high efficiency, selectivity, reproducibility, short extraction times and least environmental impact. The ancillary action of ultrasound in extraction is attributed to the phenomenon of cavitation.

The aim of the present diploma thesis is the development on a laboratory scale and the optimization of a green extraction process of bioactive compounds using ginger as feedstock, in the presence of a NaDES as an extraction and storage medium for these bioactive compounds, using ultrasound. Two NaDESs were synthesized successfully by the heating method and were studied in terms of their capability to dissolve curcumin. The solvent in which this compound had the highest solubility was chosen as suitable for the extraction and it underwent characterization by thermogravimetal analysis (TGA) and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR). The extraction from ginger took place in an ultrasound probe device, after some preliminary experiments had been conducted in an ultrasound bath. Furthermore, 6-gingerol and 6-shogaol were isolated from ginger by a conventional extraction method and characterized through ^1H NMR and LC-MS methods.

The extracts from both the ultrasound bath and the probe were assessed based on their antioxidant activity and their Total Phenolic Content (TPC), by the DPPH and Folin-Ciocalteu methods respectively. It was found that the used NaDES (betaine-lactic acid) is a satisfactory solvent for the extraction of phenolic compounds from ginger. The effect of three factors (extraction time, NaDES/water ratio in the extraction solvent and solvent/solid raw material ratio) on the two responses mentioned above was studied and the process was optimized by Box Behnken Design of Experiment and statistical analysis of the results. The most significant term in the model is the liquid solvent volume to solid ginger mass ratio.

- Key-words: Ginger, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs), Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), Antioxidant activity, Phenolic Compounds, Box-Behnken Design (BBD)

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
Κατάλογος Γραφημάτων	8
Κατάλογος Εικόνων	11
Κατάλογος Πινάκων.....	12
Κατάλογος Σχημάτων.....	12
1. Θεωρητικό Μέρος.....	13
1.1. Εισαγωγή.....	13
1.1.1. Εκχύλιση από φυτικές πρώτες ύλες.....	13
1.1.2. Φυσικά αντιοξειδωτικά	13
1.2. Τζίντζερ.....	14
1.2.1. Χρήσεις του τζίντζερ στον κόσμο	14
1.2.2. Βιοδραστικές ενώσεις του τζίντζερ	15
1.2.2.1. Φαινολικές ενώσεις.....	16
1.2.2.1.1. Τζιντζερόλες	17
1.2.2.1.2. Σογκαόλες και άλλες ενώσεις-προϊόντα των τζιντζερολών.....	18
1.2.2.1.3. Φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες.....	20
1.2.2.1.4. Περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenol Content, TPC)	21
1.2.2.2. Πολυσακχαρίτες	21
1.2.2.3. Ασκορβικό οξύ.....	22
1.2.2.4. Αιθέρια έλαια	22
1.2.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα του τζίντζερ.....	23
1.2.3.1. Δοκιμή DPPH	24
1.2.3.2. Αύξηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του τζίντζερ με εξαγωγείς (elicitors).....	25
1.2.4. Άλλες βασικές φαρμακολογικές ιδιότητες του τζίντζερ.....	26
1.2.4.1. Αντιφλεγμονώδης, αναλγητική και νευροπροστατευτική δράση.....	26
1.2.4.2. Αντικαρκινική δράση.....	27
1.2.4.3. Καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική και αντιλιπιδαιμική δράση	28
1.2.4.4. Μείωση σωματικού βάρους	29
1.2.4.5. Πρόληψη γήρανσης του δέρματος	30
1.2.4.6. Αντι-αρθριτική δράση.....	30
1.2.5. Συμβατική εκχύλιση με πρώτη ύλη το τζίντζερ.....	30

1.3. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DESS).....	31
1.3.1. Ανάγκη σχεδιασμού και χρήσης πράσινων διαλυτών	31
1.3.2. Ορισμός Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών	32
1.3.3. Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου στα DESS	32
1.3.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESS.....	33
1.3.4.1. Πτητικότητα και σημείο τήξεως.....	33
1.3.4.2. Πολικότητα	34
1.3.4.3. Πυκνότητα	34
1.3.4.4. Ιξώδες και επιφανειακή τάση.....	34
1.3.4.5. Αγωγιμότητα.....	35
1.3.4.6. pH.....	35
1.3.4.7. Δείκτης διάθλασης.....	36
1.3.4.8. Θερμικές ιδιότητες.....	36
1.3.5. Μέθοδοι παρασκευής DESS	36
1.3.6. Εφαρμογές των DESS και ρόλος αυτών στους ζώντες οργανισμούς	37
1.3.7. Πλεονεκτήματα των DESS.....	39
1.3.8. Σύγκριση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών με ιοντικά υγρά	40
1.3.9. Διαχωρισμός βιοδραστικών ουσιών από DESS	41
1.3.10. Τοξικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα των DESS.....	42
1.4. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)	43
1.4.1. Εισαγωγικά στοιχεία για την ακουστική σπηλαίωση	43
1.4.2. Εκχύλιση βασιζόμενη στη σπηλαίωση (cavitation-based extraction, CE)	43
1.4.3. Ανάγκη χρήσης υπερήχων κατά την εκχύλιση σε τζίντζερ	45
1.4.4. Διατάξεις UAE.....	46
1.4.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης σε τζίντζερ παρουσία DES και υπερήχων	48
1.4.5.1. Τύπος χρησιμοποιούμενου DES.....	48
1.4.5.2. Τύπος και σχεδιασμός της μονάδας εκχύλισης με υπερήχους	49
1.4.5.3. Ιξώδες του DES.....	50
1.4.5.4. Αναλογία DES/νερού στο διαλύτη εκχύλισης	50
1.4.5.5. pH του χρησιμοποιούμενου DES	51
1.4.5.6. Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη	51
1.4.5.7. Θερμοκρασία κατά την εκχύλιση	52
1.4.5.8. Χρόνος εκχύλισης.....	53
1.4.5.9. Ισχύς και συχνότητα υπερήχων	53

1.4.5.10. Λειτουργία των DESs ως πρόσθετων, ή πρόσθετα στα DESs.....	54
1.4.5.11. Εήραση πρώτης ύλης, βαθμός άλεσής της και άλλοι παράγοντες	54
1.4.6. Μειονεκτήματα της UAE.....	55
1.5. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE).....	55
1.5.1. Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM).....	55
1.5.2. Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken.....	56
2. Πειραματικό Μέρος	58
2.1. Σκοπός.....	58
2.2. Όργανα και Αντιδραστήρια.....	58
2.3. Σύνθεση των NaDESs Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ (1:2) και Βεταΐνη-Γλυκερόλη (1:3).....	59
2.4. Επιλογή βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.....	60
2.5. Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με τη χρήση DES ως διαλύτη	61
2.6. Καθορισμός πειραματικών συνθηκών με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό (Design of Experiment, DoE)	62
2.7. Εκχύλιση σε probe υπερήχων με τη χρήση DES ως διαλύτη	63
2.8. Συμβατική εκχύλιση με χρήση οργανικών διαλυτών	64
2.9. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	65
2.9.1. Μέτρηση Ολικών Φαινολικών (TPC) των εκχυλισμάτων	65
2.9.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH.....	66
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	68
3.1. Χαρακτηρισμός του NaDES Bet-La.....	68
3.1.1. Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA)	69
3.1.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	70
3.1.2.1. ¹ H NMR	70
3.1.2.2. ¹³ C NMR.....	72
3.1.2.3. 2D NMR (COSY).....	73
3.2. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων.....	74
3.2.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων.....	74
3.2.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων	76
3.2.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης.....	78
3.2.4. Οπτική παρατήρηση της σάρωσης τως ριζών DPPH από αντιοξειδωτικές ενώσεις .	78
3.2.5. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC).....	79
3.2.6. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC).....	79

3.2.7. Παρατηρήσεις από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων.....	80
3.2.8. Διαπιστώσεις από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων.....	82
3.2.9. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (FTIR-ATR) για το χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος STK18a.....	84
3.3. Δομικός χαρακτηρισμός συμβατικά εκχυλισμένων ενώσεων	86
3.3.1. Φάσμα ¹ H NMR της 6-τζιντζερόλης.....	86
3.3.2. Φάσμα ¹ H NMR της 6-σογκαόλης.....	87
3.3.3. Φάσμα LC-MS της 6-σογκαόλης.....	88
3.4. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE).....	90
3.4.1. Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων.....	90
3.4.1.1. 1 ^η απόκριση: IC ₅₀ εκχυλισμάτων για χρόνο επώασης 30 min (IC ₅₀ (30 min incubation)).....	90
3.4.1.2. 2 ^η απόκριση: IC ₅₀ εκχυλισμάτων για χρόνο επώασης 60 min (IC ₅₀ (60 min incubation)).....	92
3.4.1.3. 3 ^η απόκριση: Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινολικά (TPC).....	94
3.4.2. Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης.....	96
4. Συμπεράσματα.....	104
5. Προτάσεις για το μέλλον	106
6. Βιβλιογραφία.....	107
Παράρτημα Ι.....	112
Παράρτημα ΙΙ.....	117
Παράρτημα ΙΙΙ.....	128

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1: Καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης σε οξικό αιθυλεστέρα.....	61
Γράφημα 2: Καμπύλη TGA του NaDES Bet-La	69
Γράφημα 3: Φάσμα ¹ H NMR (600MHz, DMSO-d ₆) του NaDES Bet-La (1:2).....	70
Γράφημα 4: Φάσμα ¹ H NMR (600MHz, DMSO-d ₆) του NaDES Bet-La (1:2) σε αναλογία 50% στο δευτεριωμένο διαλύτη.....	71
Γράφημα 5: Φάσμα ¹³ C (600MHz, DMSO-d ₆) του NaDES Bet-La (1:2).....	72
Γράφημα 6: Φάσμα COSY NMR (600MHz, DMSO-d ₆) του NaDES Bet-La (1:2).....	73
Γράφημα 7: Φάσμα FTIR-ATR του NaDES Bet-La (1:2).....	84
Γράφημα 8: Φάσμα FTIR-ATR του εκχυλίσματος STK18a.....	85
Γράφημα 9: Επικαλυπτόμενα φάσματα FTIR-ATR του NaDES Bet-La (1:2) και του εκχυλίσματος STK18a	85
Γράφημα 10: Φάσμα ¹ H NMR (600MHz, CDCl ₃) της 6-τζιντζερόλης.....	86
Γράφημα 11: Φάσμα ¹ H NMR (600MHz, CDCl ₃) της 6-σογκαόλης.....	87
Γράφημα 12: Χρωματογράφημα της συμβατικά απομονωμένης 6-σογκαόλης.....	88
Γράφημα 13: Φάσμα MS της 6-σογκαόλης.....	89
Γράφημα 14: Φάσμα MS της 6-υδροξυ-6-σογκαόλης/6-τζιντζερδιόνης.....	90
Γράφημα 15: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1 ^{ης} απόκρισης (τιμής IC ₅₀ για χρόνο επώασης 30 min).....	92
Γράφημα 16: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2 ^{ης} απόκρισης (τιμής IC ₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).....	94
Γράφημα 17: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 3 ^{ης} απόκρισης (περιεκτικότητας σε φαινολικά).....	96
Γράφημα 18: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.....	97
Γράφημα 19: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.....	97
Γράφημα 20: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.....	98
Γράφημα 21: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.....	98
Γράφημα 22: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.....	99
Γράφημα 23: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.....	99
Γράφημα 24: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.....	100
Γράφημα 25: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.....	101
Γράφημα 26: 3D επιφάνεια του IC ₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.....	101
Γράφημα 27: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.....	102
Γράφημα 28: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.....	102
Γράφημα 29: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.....	103
Γράφημα 30: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 30 min.	112
Γράφημα 31: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 60 min.	112
Γράφημα 32: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	113

Γράφημα 66: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK22, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	124
Γράφημα 67: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK22, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	125
Γράφημα 68: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK23, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	125
Γράφημα 69: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK23, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	125
Γράφημα 70: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK24, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	126
Γράφημα 71: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK24, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	126
Γράφημα 72: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK25, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	126
Γράφημα 73: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK25, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	127
Γράφημα 74: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μg/μl και χρόνο επώασης 30 min.	128
Γράφημα 75: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μg/μl και χρόνο επώασης 60 min.	128
Γράφημα 76: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος κουρκουμίνης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,01mg/ml.	129

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ρίζωμα του <i>Zingiber officinale</i>	15
Εικόνα 2: Πειραματική διάταξη για έμμεση εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους με τη χρήση υδατόλουτρου.....	46
Εικόνα 3: Πειραματική διάταξη για άμεση εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους.....	47
Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους μέσω συστήματος probe.....	47
Εικόνα 5: Σύστημα probe υπερήχων εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.....	64
Εικόνα 6: Δείγματα του εκχυλίσματος STK18a σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν, μετά από χρόνο επώασης 60 min.	79
Εικόνα 7: Δείγματα της συμβατικά εκχυλισμένης τζιντζερόλης σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν, μετά από χρόνο επώασης 60 min.	79

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.....	58
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.....	58
Πίνακας 3: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ.....	59
Πίνακας 4: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη.....	59
Πίνακας 5: Κωδικοποίηση και συνθήκες εκχυλίσεων στο λουτρό υπερήχων.....	61
Πίνακας 6: Κωδικοποίηση, συμβολισμός κατά Box-Behnken και τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών των εκχυλίσεων στο probe υπερήχων.....	63
Πίνακας 7: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα εκχυλίσματα από το λουτρό υπερήχων.....	75
Πίνακας 8: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα εκχυλίσματα από το probe υπερήχων.....	77
Πίνακας 9: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH σε 6-τζιντζερόλη απομονωμένη με συμβατική μέθοδο εκχύλισης.....	78
Πίνακας 10: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών στα εκχυλίσματα από το λουτρό υπερήχων.....	79
Πίνακας 11: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών στα εκχυλίσματα από το probe υπερήχων.....	80
Πίνακας 12: Αποτελέσματα αξιολόγησης εκχυλισμάτων πρώτης σειράς πειραμάτων.....	80
Πίνακας 13: Αποτελέσματα αξιολόγησης εκχυλισμάτων από τη δεύτερη σειρά πειραμάτων.....	83
Πίνακας 14: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1 ^η απόκριση (τιμή IC ₅₀ για χρόνο επώασης 30 min).....	91
Πίνακας 15: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 1 ^η απόκριση (τιμή IC ₅₀ για χρόνο επώασης 30 min).....	91
Πίνακας 16: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει τη 2 ^η απόκριση (τιμή IC ₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).....	93
Πίνακας 17: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει τη 2 ^η απόκριση (τιμή IC ₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).....	93
Πίνακας 18: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει τη 3 ^η απόκριση (περιεκτικότητα σε φαινολικά).....	95
Πίνακας 19: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει τη 3 ^η απόκριση (περιεκτικότητα σε φαινολικά).....	95
Πίνακας 20: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας εκχύλισης για χρόνο επώασης 30min.....	96
Πίνακας 21: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας εκχύλισης για χρόνο επώασης 60min.....	100

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Συντακτικός τύπος της (α) 6-τζιντζερόλης, (β) 6-σογκαόλης, (γ) ζινγκερόνης, (δ) 6-τζιντζερδιόνης, (ε) 1-αφυδρο-6-τζιντζερδιόνης, (στ) 6-παραδόλης και (ζ) 6-τζιντζερδιόλης.....	19
Σχήμα 2: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία.....	24
Σχήμα 3: Συνήθεις δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου στα NaDESs.....	33
Σχήμα 4: Συντακτικός τύπος της χλωριούχου χολίνης, της αλανίνης και της γλυκίνης (από αριστερά προς τα δεξιά).....	35
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.....	57
Σχήμα 6: Συντακτικός τύπος της κουρκουμίνης.....	60
Σχήμα 7: Συντακτικός τύπος της ρίζας DPPH.....	66
Σχήμα 8: Συντακτικός τύπος της ανηγμένης μορφής του DPPH.....	66
Σχήμα 9: Σχάση του μορίου της 6-σογκαόλης.....	89

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. Εκχύλιση από φυτικές πρώτες ύλες

Η ανάκτηση συστατικών από διάφορα φυτά, όπως αρωματικών ενώσεων, χρωστικών και αντιοξειδωτικών (ανθοκυανινών, φλαβονοειδών ή φαινολικών οξέων), αποτελεί ένα ζωτικής σημασίας τμήμα της γραμμής παραγωγής στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων και, για αυτό, η εξέλιξη των τεχνολογιών εκχύλισης επιφέρει σημαντικά κέρδη σε όρους ενεργειακής κατανάλωσης, περιορισμού μόλυνσης και παραγωγής εκχυλισμάτων καλύτερης ποιότητας. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να διασφαλίζεται η μη καταστροφή ή απώλεια των βιοδραστικών ενώσεων κατά την εκχύλισή τους. Η εκχύλιση μπορεί να εστιάζει, εκτός από την παραλαβή προϊόντων υψηλής αξίας (π. χ. πολυφαινόλων, φυσικών προσθέτων), στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών από τρόφιμα.^{1,2}

1.1.2. Φυσικά αντιοξειδωτικά

Εδώ και πολλά χρόνια, για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών χρησιμοποιούνται φυσικά προϊόντα. Η χρήση φυτών με θεραπευτικές ιδιότητες για την αντιμετώπιση ποικίλων ασθενειών είναι τόσο παλιά όσο το ανθρώπινο είδος. Μέχρι σήμερα, ο άνθρωπος έχει επιδείξει αξιοσημείωτο ενθουσιασμό απέναντι στην παραδοσιακή και συμπληρωματική ιατρική, με αποτέλεσμα πολλές χώρες να τη συμπεριλαμβάνουν στα προγράμματα υγείας τους. Πράγματι, η παραδοσιακή και συμπληρωματική ιατρική αποτελεί μερικές φορές τη μόνη και την πιο αξιόπιστη πηγή περίθαλψης για εκατομμύρια ανθρώπους, καθώς είναι εύκολα προσβάσιμη, οικονομική και πολιτιστικά αποδεκτή. Τα θεραπευτικά φυτά σημειώνουν όλο και μεγαλύτερη επιτυχία, γιατί οι ενώσεις που περιέχουν είναι γενικά συμβατές με τον ανθρώπινο οργανισμό και εμφανίζουν λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με τα μη φυσικά ή συνθετικά φάρμακα. Σήμερα, το 25% των συνταγογραφούμενων φαρμάκων παρασκευάζονται από φυτά, και πολυάριθμα φαρμακευτικά είδη έχουν φυσική προέλευση, ή συντίθενται από φυσικά προϊόντα.^{3,4}

Ελεύθερες ρίζες με κέντρο το οξυγόνο και άλλα δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) είναι πιθανό να σχηματίζονται ως παραπροϊόντα πολυάριθμων φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών στον ανθρώπινο οργανισμό και μπορούν να «παρέμβουν» θετικά ή αρνητικά στο σώμα. Μερικές από τις ευεργετικές τους δράσεις περιλαμβάνουν την παραγωγή ενέργειας, τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της φαγοκυττάρωσης. Από την άλλη, αυξημένη παραγωγή τέτοιων ελευθέρων ριζών μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική καταστροφή σημαντικών βιομορίων (π. χ. λιπιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, κυτταρικών μεμβρανών), οδηγώντας τελικά σε χρόνιες παθήσεις, όπως αθηροσκλήρωση, καρκίνο, διαβήτη, γήρανση, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και άλλες ασθένειες στον άνθρωπο. Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών περιορίζονται με ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν προλαμβάνοντας το οξειδωτικό στρες, που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ασθενειών αυτών. Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση στην οποία ο σχηματισμός ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και τα συστήματα μακροχρόνιας αντιοξειδωτικής άμυνας δεν είναι ισορροπημένα. Μία από τις συνέπειες της αντίδρασης ανάμεσα σε ελεύθερες ρίζες και στις μεμβράνες φωσφολιπιδίων των επιθηλιακών κυττάρων είναι ο σχηματισμός

μαλονδιαλδεΰδης (MDA), ο οποίος μπορεί να αποτραπεί με αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως τα ένζυμα δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase, CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx). Η SOD είναι η κυριότερη ένωση που βρίσκεται σε αποθέματα στο σώμα για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, καθώς «σαρώνει» τις ελεύθερες ρίζες.^{4 5 6}

Φυτά (φρούτα, λαχανικά, θεραπευτικά βότανα κλπ.), καθώς και προϊόντα που παράγονται από αυτά, είναι πιθανό να περιέχουν μια ευρεία γκάμα μορίων που «σαρώνουν» τις ελεύθερες ρίζες, όπως φαινολικές ενώσεις, πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, αζωτούχες ενώσεις, βιταμίνες, τερπενοειδή και άλλους ενδογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Με άλλα λόγια, τα φυσικά αντιοξειδωτικά που είναι παρόντα σε τρόφιμα όπως βότανα και καρυκεύματα είναι υπεύθυνα για την αναστολή ή αποτροπή των επιβλαβών συνεπειών του οξειδωτικού στρες και παίζουν σημαντικό ρόλο ως παράγοντες προστατευτικοί της υγείας. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές από αυτές τις αντιοξειδωτικές ουσίες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη, αντιαθηροσκληρωτική, αντινεοπλασματική, αντιμεταλλαξιογόνο, αντικαρκινογόνο, αντιβακτηριακή ή αντιική δράση, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό. Η πρόσληψη φυσικών αντιοξειδωτικών έχει συνδεθεί με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, καρδιαγγειακών νοσημάτων, διαβήτη και άλλων ασθενειών που ενδεχομένως σχετίζονται με τη γήρανση.⁶

Τα αντιοξειδωτικά, επιπλέον, συντελούν στην αποτροπή του ταγγισμού των λιπών σε διάφορα τρόφιμα και, συνεπώς, μπορούν να συμβάλουν στην επέκταση της διάρκειας ζωής αυτών. Συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως η βουτυλο-υδροξυ-ανισόλη (BHA) και το βουτυλο-υδροξυ-τολουόλιο (BHT) χρησιμοποιούνται λόγω της αποτελεσματικότητάς τους και του χαμηλότερου κόστους τους σε σχέση με τα φυσικά. Ωστόσο, η ασφάλεια και η τοξικότητα των συνθετικών αντιοξειδωτικών έχουν προκαλέσει σημαντικές ανησυχίες (υπάρχουν υποψίες ότι προκαλούν καρκινογένεση). Για το λόγο αυτό, η χρήση τους είναι περιορισμένη τα τελευταία χρόνια και το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εκχύλιση και χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών, τα οποία μπορεί επίσης να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες, όπως οι πολυφαινολικές ενώσεις που παράγονται από φυτικές πρώτες ύλες.^{1 4 6 7}

1.2. Τζίντζερ

1.2.1. Χρήσεις του τζίντζερ στον κόσμο

Το *Zingiber officinale* Roscoe (ευρέως γνωστό ως τζίντζερ ή πιπερόριζα στα ελληνικά) είναι ένα ριζωματώδες μονοκοτυλήδονο βρώσιμο βότανο που ανήκει στην οικογένεια Zingiberaceae και στο γένος *Zingiber*, το οποίο περιλαμβάνει περισσότερα από 85 είδη. Συγκαταλέγεται στην ποικιλία του λευκού τζίντζερ, ενώ άλλα μέλη της οικογένειάς του είναι το κόκκινο (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) και το πικρό τζίντζερ (*Zingiber zerumbet*). Πιστεύεται ότι έχει προέλευση από την Ινδία ή τη νοτιοανατολική Ασία και υπάρχουν αναφορές αυτού σε βεδικά κείμενα που χρονολογούνται γύρω στο 4000 π. Χ. Σήμερα το ριζώμα (η ρίζα) του φυτού χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε όλον τον κόσμο, αφού μπορεί να υποστεί κατεργασία και το προϊόν να κυκλοφορήσει στην αγορά με τη μορφή λεπτόκοκκης σκόνης, σιροπιού, πηκτικού ελαίου ή ελαιορητίνης. Η εξάπλωσή του ανά τους αιώνες σε ολόκληρο τον πλανήτη μπορεί να αιτιολογηθεί από τη χρήση του στο φαγητό, αλλά και από τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Η Ινδία αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους παραγωγούς φρέσκου αλλά και ξηρού τζίντζερ, ενώ άλλοι σημαντικοί παραγωγοί τζίντζερ στον κόσμο είναι οι Δυτικές Ινδίες, η Βραζιλία, η Κίνα, η Ιαπωνία και η Ινδονησία.^{3 8 9 10 11 12 13}

Πιο συγκεκριμένα, το πασίγνωστο καρύκευμα με το ιδιαίτερο άρωμα και την πικάντικη γεύση είναι παρόν σε σάλτσες που συνοδεύουν κρέας και ψάρι στην ασιατική, την ευρωπαϊκή και την αμερικανική κουζίνα, σε γλυκά, σουπές, αφεψήματα και ορισμένα αλκοολούχα ποτά. Η χαρακτηριστική γεύση του τζίντζερ οφείλεται στην παρουσία ενός μεγάλου αριθμού αιθερίων ελαίων και φαινολικών ενώσεων, όπως η τζίντζερόλη, η σογκαόλη, η καψαϊκίνη κλπ.^{3 8 10 14 15}

Από την άλλη, το τζίντζερ (φρέσκο ή ξηρό) χρησιμοποιείται εδώ και 2000 χρόνια σε ιατρικές εφαρμογές (π. χ. στην παραδοσιακή κινεζική και ινδική ιατρική) για την αντιμετώπιση ενός ευρέος φάσματος ασθενειών, λόγω της αντιθρομβωτικής, αντιμικροβιακής, αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιοιδηματώδους, ανοσοτροποποιητικής, ανοσοδιεγερτικής, αντιεμετικής, διουρητικής, αντινεοπλασματικής και αντικαρκινικής δράσης του και της ικανότητάς του να βελτιώνει τις πεπτικές λειτουργίες. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ρευματοπάθειες, το κοινό κρυολόγημα, η γρίπη, ο πυρετός, ο βήχας, ο πονόλαιμος, η καταρροή, το άσθμα, η βρογχίτιδα, η ιγμορίτιδα, η ουλίτιδα, τα γαστρεντερικά προβλήματα (δυσπεψία, ναυτία, εμετός, δυσκοιλιότητα, διάρροια), η απώλεια όρεξης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η υπεραιμία, ο πονόδοντος, η ημικρανία, ο πόνος από διάστρεμμα, ο μυϊκός πόνος, ο διαβήτης, διάφορες νευρολογικές παθήσεις, το εγκεφαλικό, αλλά και ο καρκίνος. Επιπλέον, δρα ως παράγοντας μακροζωΐας. Το τζίντζερ βρίσκει εφαρμογή σε όλον τον κόσμο ως συμπλήρωμα διατροφής, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων του και έχει εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων ως κατάλληλο για αυτή τη χρήση (έχει χαρακτηριστεί ως GRAS, generally recognized as safe). Συμπεριλαμβάνεται στη Βρετανική, την Ευρωπαϊκή, την Κινεζική, την Ιαπωνική και πολλές άλλες εθνικές φαρμακοποιίες και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει δημοσιεύσει μια μονογραφία για το *Rhizoma Zingiberis*. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το τζίντζερ κατατάσσεται στην κατηγορία των υπερτροφών (superfoods), λόγω της πληθώρας των βιολογικών δράσεών του που ευεργετούν την υγεία. Παρουσιάζει ελάχιστες παρενέργειες, οι οποίες περιλαμβάνουν ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές ή/και ερεθισμό στο στόμα. Οι θεραπευτικές ιδιότητες του τζίντζερ αποτελούν απόδειξη του συνθήματος «η τροφή είναι φάρμακο και το φάρμακο είναι η τροφή».^{3 8 9 10 11 14 15 16 17 18 19 20}



Εικόνα 1: Ρίζωμα του *Zingiber officinale*.

1.2.2. Βιοδραστικές ενώσεις του τζίντζερ

Το τζίντζερ είναι πλούσιο τόσο σε υδρόφιλα όσο και σε υδρόφοβα συστατικά. Ωστόσο, η βιολογική δράση του αποδίδεται κατά κύριο λόγο στις τζίντζερόλες, τις σογκαόλες και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχει. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις 6-τζίντζερόλη, 6-σογκαόλη, ζινγκερόνη, αλλά και άλλα φαινολικά και φλαβονοειδή προσδίδουν στο τζίντζερ τη φαρμακολογική του δράση. Για παράδειγμα, ενώσεις-στόχοι που περιέχονται στο *Rhizoma Zingiberis* είναι η ζινγκερόνη, η 6-, 8-, 10-τζίντζερόλη και η 6-σογκαόλη. Η ξηρή σκόνη ριζώματος τζίντζερ περιέχει τυπικά 60-70%

υδατάνθρακες, 9% πρωτεΐνη, 3–6% λιπίδια (γλυκερίδια, λεκιθίνη, λιπαρά οξέα), 3–8% ίνες, 2–6% πρωτεάσες, 1–3% πτητικές ενώσεις όπως zingiberol και zingiberene, καθώς και βιταμίνες A, C και B3. Γενικά, είναι γνωστό ότι η φυσικοχημική σύσταση ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση, το βαθμό ωρίμανσης και το περιβάλλον του ριζώματος. Επιπλέον, διαφορές στη μορφή του τζίντζερ (εκχύλισμα ή ξηρή σκόνη), στην ποικιλία, στις πρακτικές καλλιέργειας, στις αγρονομικές συνθήκες, στις συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης μετά τη συγκομιδή μπορεί να συνεπάγονται διαφορές στη σύστασή του.^{3 7 8 9 10 12 15}

Η 6-τζιντζερόλη και η 6-σογκαόλη βρίσκονται σε αφθονία στο ρίζωμα του τζίντζερ. Η 6-τζιντζερόλη έχει αναφερθεί ως η βιοδραστική ένωση σε μεγαλύτερη αφθονία σε αυτό, με ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αναλγητικών, αντιπλεγμονωδών και αντιπυρετικών ιδιοτήτων. Μελέτες αναφέρουν ότι η ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών που χαρακτηρίζει το ρίζωμα του τζίντζερ οφείλεται, εκτός από τις τζιντζερόλες και τις σογκαόλες, στην ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων, παραδολών και τζιντζερδιονών. Επιπλέον, αναφέρεται ότι τζίντζερ που έχει ξηραθεί σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες, παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα κατά των ριζών του DPPH, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία βιταμίνης C και φαινολικών ενώσεων, όπως φλαβονοειδών και ανθοκυανινών, και ειδικά τζιντζερόλης και σογκαόλης. Στο φρέσκο τζίντζερ, από την άλλη, έχει γίνει λόγος για την παρουσία διυδροπαραδολών, ακέτυλο-παραγώγων των τζιντζερολών και 6-, 8-, 10- και 12-τζιντζερδιονών.^{3 9 10}

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το ρίζωμα του τζίντζερ περιέχει πληθώρα φαρμακολογικά ενεργών ουσιών, όπως αλάτων μαγνησίου, ασβεστίου και φωσφόρου, βιταμινών της ομάδας B (B1, B2, B12), ασκορβικού οξέος και βιταμίνης A. Εκτός από τα παραπάνω, περιέχει σίδηρο, ψευδάργυρο, κάλιο, νάτριο, αργίλιο, χρώμιο, γερμάνιο, ασπαραγίνη, χολίνη, καθώς και αμινοξέα απαραίτητα για τον άνθρωπο (τρυπτοφάνη, θρεονίνη, λευκίνη, μεθειονίνη, βαλίνη κλπ).¹⁴

1.2.2.1. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες, απαντώνται πολύ συχνά στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν τους σημαντικότερους δευτερεύοντες μεταβολίτες των φυτών. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων υδροξυλομάδων (-OH) ενωμένων με έναν εξαμελή αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος συνδέεται με σάκχαρα, όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη.^{4 21}

Οι μεταβολίτες αυτοί γενικά εμπλέκονται στην προστασία των φυτών από την υπερϊώδη ακτινοβολία και από παθογόνους παράγοντες. Συνήθως παράγονται από τα φυτά ως προϊόντα της άμυνας κατά παθογόνων μικροοργανισμών, ή η βιοσύνθεσή τους αποτελεί απόκριση σε καταπονήσεις από το αβιοτικό περιβάλλον (για αυτό και αποκαλούνται μεταβολίτες του στρες) και δε σχετίζονται ευθέως με την ανάπτυξη του φυτικού ιστού. Παρόλα αυτά, συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο σχηματισμός ριζών, η βλάστηση των σπόρων και η ωρίμανση των καρπών, και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των φυτών. Είναι συνδεδεμένες με τα μορφολογικά και τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά αυτών και των παραπροϊόντων τους (συνεισφέρουν στη γεύση και το χρωματισμό τους) και είναι υπεύθυνες για διάφορες λειτουργικές ιδιότητες των φυτών.^{4 10 21 22}

Οι φαινολικές ενώσεις είναι στενά συνδεδεμένες με την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυσικών προϊόντων. Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των πολυφαινολών τις καθιστούν ικανές να δρουν ως

αναγωγικά μέσα, δότες υδρογόνου και σαρωτές δραστικών ειδών οξυγόνου. Επομένως, η ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών ενός φυτού, μπορεί να αποδοθεί στην περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες. Όπως δηλώνουν μερικές επιδημιολογικές μελέτες, η μακροχρόνια υιοθέτηση διατροφής πλούσιας σε φυτικές πολυφαινόλες συνεισφέρει στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και συνεπώς προλαμβάνει την εμφάνιση σοβαρών χρόνιων παθήσεων. Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις μειώνουν την περίσσεια ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται στους ασθενείς, με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμικής κατάστασης και για αυτό προσδίδουν στο φυσικό προϊόν στο οποίο περιέχονται (π. χ. στο τζίντζερ) ικανοποιητική δράση έναντι του διαβήτη τύπου II. Οι φαινολικές ενώσεις είναι τα κυριότερα συστατικά του τζίντζερ με υψηλή αντιοξειδωτική δράση και αντικαρκινικές ικανότητες, ενώ άλλες βιολογικές δράσεις τους που έχουν αναφερθεί είναι η αντιμικροβιακή, η αντιφλεγμονώδης, η αντιαλλεργική, η αγγειοδιασταλτική και η καρδιοπροστατευτική. Γίνεται, επομένως, αντιληπτή η ιατρική και οικονομική σημασία των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτό και διαπιστώνεται ότι είναι κρίσιμης σημασίας η εκχύλιση των δραστικών αυτών ουσιών από το τζίντζερ. Οι διεργασίες εκχύλισης των φαινολών παρουσιάζουν μια τεράστια ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Η θερμοκρασία, το είδος του διαλύτη, ο χρόνος και η μέθοδος εκχύλισης που υιοθετείται επιδρούν σημαντικά στη σύσταση του εκχυλίσματος. Σημειώνεται, ακόμη, ότι οι πολυφαινόλες έχουν προσελκύσει πολλή προσοχή λόγω της χρήσης τους στις βιομηχανίες τροφίμων για την αποτροπή του ταγγισμού και της οξείδωσης των λιπιδίων.^{3 4 15 22 23 24}

1.2.2.1.1. Τζιντζερόλες

Σύμφωνα με πολυάριθμες επιστημονικές έρευνες, η πικάντικη γεύση και οι φαρμακολογικές δράσεις του φρέσκου τζίντζερ αποδίδονται στις τζιντζερόλες, οι οποίες αποτελούν φαινολικές κετόνες, ομόλογες με το 1-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλ)-3-κετο-5-υδροξυεξάνιο και είναι λιπόφιλες ενώσεις. Μολονότι στο τζίντζερ είναι παρούσες και άλλες τζιντζερόλες με διάφορα μήκη αλυσίδας (π. χ. 8-τζιντζερόλη και 10-τζιντζερόλη), η 6-τζιντζερόλη είναι η γνωστότερη και αυτή που χρησιμοποιείται συχνότερα.^{9 11 25 26}

Οι τζιντζερόλες χαρακτηρίζονται από ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως η αντιμικροβιακή, η αντιμυκητιασική, η αντιεμετική, η δράση κατά του μεταβολικού συνδρόμου και η προστασία των νεύρων. Έχουν διακεκριμένη δράση κατά του καρκίνου του στομάχου και του εντέρου *in vitro*, και του δέρματος *in vivo*. Η 6-τζιντζερόλη έχει αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιπυρετική, αντινεοπλασματική, αντιδιαβητική, αντιλιπιδαιμική, αντιοξειδωτική δράση και διεγείρει την έκκριση πεπτικών ενζύμων.^{12 19 25 27 28 29}

Η 6-τζιντζερόλη, το κύριο φαρμακολογικά ενεργό συστατικό του τζίντζερ και φυσικό αντιοξειδωτικό που προσλαμβάνεται από τον άνθρωπο μέσω της τροφής, έχει αποδειχθεί *in vitro* ότι ελαττώνει την υπεροξείδωση των φωσφολιπιδικών λιποσωμάτων. Παρουσιάζει αξιοσημείωτη ικανότητα σάρωσης των ριζών υδροξυλίου και των μονήρων οξυγόνων. Η σάρωση των ριζών OH· από την 6-τζιντζερόλη πραγματοποιείται κυρίως με μηχανισμό προσθήκης ριζών προς σχηματισμό προϊόντος (radical adduct formation, RAF). Επιπλέον, όταν τα αντιοξειδωτικά έχουν χαμηλό δυναμικό οξείδωσης, τείνουν να σαρώνουν τα μονήρη οξυγόνα με μεγάλο ρυθμό. Η 6-τζιντζερόλη έχει τιμή δυναμικού οξείδωσης 0,39V, οπότε σαρώνει ικανοποιητικά τα μονήρη οξυγόνα και η σάρωσή τους γίνεται με μηχανισμό μεταφοράς φορτίου (charge-transfer), όπως συμβαίνει και ανάμεσα στα μονήρη οξυγόνα και τα φλαβονοειδή. Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, τη μεγάλη αφθονία της 6-τζιντζερόλης στο τζίντζερ, διαπιστώνεται ότι αυτή παίζει τον καθοριστικότερο ρόλο

στη συνολική αντιοξειδωτική δράση του φυτού, και συνεπώς είναι κατάλληλο αντιοξειδωτικό κατά των μονήρων οξυγόνων και των ριζών υδροξυλίου.²⁷

Λόγω του μη πολικού χαρακτήρα των τζιντζερολών, είναι αναγκαία για την εκχύλισή τους η χρήση κατάλληλων άπολων διαλυτών. Οι τζιντζερόλες είναι θερμικά ευαίσθητες και επιρρεπείς σε αφυδάτωση σε θερμοκρασία 60°C και άνω. Η θερμική αστάθεια της 6-τζιντζερόλης σε υψηλές θερμοκρασίες οφείλεται στην παρουσία του β-κετοϋδροξυλίου στην αλκυλική αλυσίδα. Έτσι, συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης τζιντζερολών όπως η Soxhlet, έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα, είτε λόγω της υψηλής θερμοκρασίας είτε λόγω του μεγάλου χρόνου εκχύλισης. Τα τελευταία χρόνια, έχουν τεθεί σε εφαρμογή διάφορες σύγχρονες τεχνολογίες για την παραλαβή τζιντζερολών, όπως η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE), ο υποβοηθούμενος από ένζυμα διαμερισμός τριών φάσεων και η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE).^{25 30}

Η συγκέντρωση των τζιντζερολών σε εκχυλίσματα τζίντζερ προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Ο χρωματογράφος διαθέτει ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Diode-Array Detector, DAD), η στατική φάση είναι μία στήλη C18 και η κινητή φάση είναι υδατικό διάλυμα ακετονιτριλίου μεταβαλλόμενης σταδιακά συγκέντρωσης (βαθμωτή έκλυση, gradient elution), από 20%v/v σε 100%v/v. Η θερμοκρασία είναι σταθερή στους 25°C και το μήκος κύματος ανίχνευσης είναι τα 280nm. Οι χρόνοι έκλυσης και τα εμβαδά κάτω από τις κορυφές χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντίστοιχα των τζιντζερολών, κατόπιν σύγκρισης με αυτά των προτύπων διαλυμάτων τζιντζερολών. Σημειώνεται ότι είναι αναγκαίο το φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων μέσα από μικροπορώδη μεμβράνη πριν την έγχυση στο σύστημα.^{16 25}

1.2.2.1.2. Σογκαόλες και άλλες ενώσεις-προϊόντα των τζιντζερολών

Στο ξηρό τζίντζερ, από την άλλη, τη γεύση προσδίδουν οι σογκαόλες (από την ιαπωνική λέξη shoga, που σημαίνει τζίντζερ). Οι σογκαόλες αποτελούν προϊόντα της αφυδάτωσης και της θερμικής υποβάθμισης των αντίστοιχων τζιντζερολών και σχηματίζονται κατά τη θερμική κατεργασία και τη μακροχρόνια αποθήκευση των ριζών του τζίντζερ, ενώ παραπροϊόντα αυτής της διεργασίας είναι οι τζιντζερόνες.^{9 11 13 27 28}

Η 6-σογκαόλη εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση in vivo και in vitro. Είναι πιο ισχυρή από την 6-τζιντζερόλη ως προς την αντιφλεγμονώδη και την αντιοξειδωτική δράση, ενώ υπάρχουν αναφορές που πραγματεύονται την αντικαρκινική της δράση. Η ζινγκερόνη έχει γενικά πιο χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα από την 6-τζιντζερόλη και την 6-σογκαόλη, αλλά ειδικά απέναντι στα μονήρη οξυγόνα ¹O₂ έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα σάρωσης σε σχέση με τα άλλα δύο συστατικά.^{27 28 31}

Οι σογκαόλες σπάνια συναντώνται στο φρέσκο τζίντζερ (και όταν συμβαίνει αυτό, βρίσκονται σε πολύ μικρές περιεκτικότητες). Η 6-τζιντζερόλη μπορεί να ισομεριστεί σε 6-σογκαόλη σε σύστημα όξινων συνθηκών και υψηλής θερμοκρασίας, άρα μπορεί να εφαρμοστεί αυτό το μοντέλο σε πραγματικό περιβάλλον εκχύλισης για να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της πιο δραστικής σογκαόλης. Πράγματι, η αύξηση τόσο της θερμοκρασίας ξήρανσης όσο και της θερμοκρασίας εκχύλισης και η προσαρμογή του pH του διαλύτη εκχύλισης με ισχυρό οξύ μπορούν να επιτύχουν το σκοπό αυτό. Η 6-τζιντζερόλη μπορεί να αφυδατωθεί σε 6-σογκαόλη παρουσία είτε ισχυρού οξέος (οπότε γίνεται πρωτονίωση της από αυτό) είτε ισχυρής βάσης (όπου γίνεται αποπρωτονίωση της

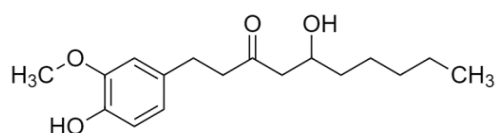
τζιντζερόλης από τη βάση), ενώ είναι πιο πιθανό να υποβαθμιστεί σε όξινο παρά σε βασικό διάλυμα.²⁸

Άλλα παράγωγα των τζιντζερολών, εκτός από τις σογκαόλες και τις τζιντζερόνες, είναι:

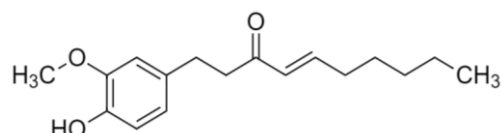
- οι τζιντζερδιόνες, που αποτελούν προϊόντα των τζιντζερολών από την αφυδρογόνωση του β-κετονικού υδροξυλίου και συμπεριλαμβάνουν την υποομάδα των 1-αφυδροτζιντζερδιονών,
- οι παραδόλες, που είναι 5-δεόξυ παράγωγα των τζιντζερολών, από την αποξυγόνωση του β-κετονικού υδροξυλίου, ή, ισοδύναμα, την υδρογόνωση της αντίστοιχης σογκαόλης και περιέχονται στο φρέσκο τζίντζερ και
- οι τζιντζερδιόλες, που αποτελούν προϊόντα των τζιντζερολών από την αναγωγή κετόνης.^{8 26}

32

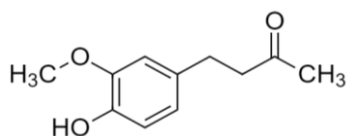
Τα μόρια των ενώσεων που ανήκουν σε καθεμία από τις παραπάνω ομόλογες σειρές περιέχουν μια μη διακλαδισμένη αλκυλική αλυσίδα διαφόρων μηκών και μάζας στο εύρος 300-500 Da (π. χ. 4-, 6-, 8-, 10- και 12-τζιντζερόλη και 4-, 6-, 8-, 10- και 12-σογκαόλη). Έχουν όλες τον ίδιο 1,3,4-τριϋποκατεστημένο δακτύλιο βενζολίου, που φέρει μία 3-μεθοξυλομάδα, μία 4-υδροξυλομάδα και μία μη διακλαδισμένη 1-αλκυλική αλυσίδα. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι όλες είναι μη πτητικές ενώσεις.^{26 28}



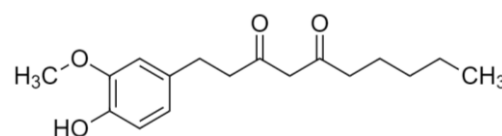
(α)



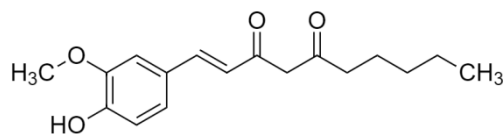
(β)



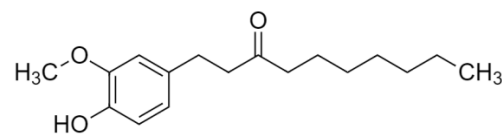
(γ)



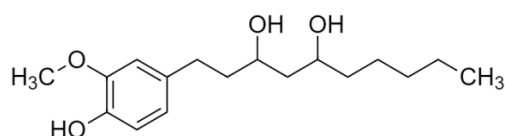
(δ)



(ε)



(στ)



(ζ)

Σχήμα 1: Συντακτικός τύπος της (α) 6-τζιντζερόλης, (β) 6-σογκαόλης, (γ) ζινγκερόνης, (δ) 6-τζιντζερδιόνης, (ε) 1-αφυδρο-6-τζιντζερδιόνης, (στ) 6-παραδόλης και (ζ) 6-τζιντζερδιόλης.

1.2.2.1.3. Φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες

Τα φλαβονοειδή συνιστούν μια κατηγορία οργανικών ενώσεων φυσικής προέλευσης που απαντώνται σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά. Συγκαταλέγονται στις πολυφαινόλες. Η ομάδα των φλαβονοειδών περιέχει πάνω από 8000 διαφορετικές ταυτοποιημένες ενώσεις, που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ορισμένων λειτουργιών στα φυτά, όπως ο χρωματισμός των διαφορετικών τμημάτων φρούτων ή λαχανικών (φύλλα, άνθη, φλοιός) και η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλες εξωτερικές απειλές, όπως τα παθογόνα. Εντοπίζονται σε διάφορα υποσυστήματα του φυτού, όπως στο φλοιό ή στις ρίζες του, όπου μπορούν να επιτελούν παρόμοιους ή διαφορετικούς σκοπούς. Το ενδιαφέρον γύρω από την εκχύλισή τους πηγάζει από τα πολλαπλά οφέλη τους για την υγεία, μερικά από τα οποία είναι η ευεργετική τους δράση στο κυκλοφορικό σύστημα, η αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης, αντι-οστεοπορωτική και αντιική δραστηριότητα και η «οχύρωση» του νευρικού συστήματος.^{23 33 34}

Από τη σκοπιά της χημικής τους δομής, όλα τα φλαβονοειδή μοιράζονται έναν κοινό κύριο σκελετό και διαφοροποιούνται το ένα από το άλλο με βάση τους υποκαταστάτες που συνδέονται με οποιοδήποτε τμήμα της δομής αυτής. Ο σκελετός τους αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο, συνδεδεμένο στη μία πλευρά με έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει ένα άτομο οξυγόνου αντί για άνθρακα δίπλα στην κοινή πλευρά των δακτυλίων. Οι δύο δακτύλιοι συνδέονται και με έναν άλλο αρωματικό δακτύλιο και διαμορφώνουν το σκελετό. Τα φλαβονοειδή, λοιπόν, φέρουν δακτυλίους φαινολικούς και πυρανίου και κατηγοριοποιούνται σε πολλές υπο-ομάδες, όπως φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, χαλκόνες και ανθοκυανιδίνες.³³

Οι ανθοκυανίνες παίζουν πολλούς ρόλους στον οργανισμό: εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, προστατεύουν από το φως και συμβάλλουν στους μηχανισμούς άμυνας. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών είναι το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία οξυγόνου και φωτός.³

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα τζίντζερ (Total Flavonoid Content, TFC) γίνεται με την πρότυπη χρωματομετρική μέθοδο συμπλοκοποίησης με χλωριούχο αργίλιο. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος χλωριούχου αργιλίου 5% σε αιθανόλη και τη μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis της απορρόφησης των διαλυμάτων στα 425nm. Η αύξηση της θερμοκρασίας ξήρανσης επηρεάζει αρνητικά την ποσότητα των φλαβονοειδών που εκχυλίζονται, πιθανώς επειδή αυτά είναι ασταθή στη θέρμανση. Έχει παρατηρηθεί ότι η μεθανόλη είναι πιο αποτελεσματική από την αιθανόλη στην εκχύλισή τους. Η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή μπορεί να προσδιοριστεί επίσης σε microplate 96 θέσεων με τη χρήση του αντιδραστήριου του Neu (2-aminoethyl diphenyl borinate). Το εκχύλισμα υφίσταται 50% αραίωση σε μεθανόλη και στο προκύπτον διάλυμα προστίθεται το αντιδραστήριο του Neu. Μετράται η απορρόφηση του μίγματος στα 405nm σε φασματοφωτόμετρο. Η απορρόφηση του εκχυλίσματος συγκρίνεται με αυτή προτύπου μεθανολικού διαλύματος κερκετίνης, που έχει υποστεί και αυτό κατεργασία με το ίδιο αντιδραστήριο και υπό τις ίδιες συνθήκες.^{3 4 24}

Τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός των κίτρινων φλαβονοειδών και των ανθοκυανινών σε ξηρό ρίζωμα τζίντζερ γίνεται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η απορρόφηση μετράται σε δύο μήκη κύματος: 535nm για τις ανθοκυανίνες και 374nm για τα κίτρινα φλαβονοειδή. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg της εκάστοτε ένωσης στα 100g τζίντζερ. Φαίνεται ότι το ξηρό τζίντζερ περιέχει κίτρινα φλαβονοειδή σε υψηλό ποσοστό, σε σύγκριση με τροπικά φρούτα, όπως η ασερόλα, το

κάσιους και η παπάγια, ενώ, όταν ξηραίνεται στους 40°C, πλησιάζει αυτό του κερασιού του Σουρινάμ.³

1.2.2.1.4. Περικεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenol Content, TPC)

Η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC). Το εκχύλισμα αραιώνεται σε νερό και στη συνέχεια προστίθενται σε αυτό συγκεκριμένες ποσότητες του αντιδραστηρίου FC, κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου και νερού. Το μίγμα αφήνεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτεινό χώρο να επωαστεί, και έπειτα μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 765nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Με δεδομένη την καμπύλη αναφοράς απορρόφησης-συγκέντρωσης διαλύματος γαλλικού οξέος, υπολογίζεται η συγκέντρωση των ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) στο διάλυμα του εκχυλίσματος και τελικά στο ίδιο το εκχύλισμα. Το γαλλικό οξύ είναι φαινολικό οξύ, παράγωγο του βενζοϊκού οξέος.^{4 9 21}

1.2.2.2. Πολυσακχαρίτες

Τα τελευταία χρόνια, οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες που περιέχονται στο τζίντζερ έχουν προσελκύσει αυξημένη προσοχή, λόγω των εξαιρετικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και της δράσης τους κατά της κόπωσης. Συνεπώς, και αυτοί συγκαταλέγονται στα βιοδραστικά συστατικά του τζίντζερ.²⁵

Έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης που ενδεχομένως χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης, οπότε σε αυτήν την περίπτωση δεν παραλαμβάνονται πολυσακχαρίτες, ακόμα και αν χρησιμοποιούνται υπέρηχοι. Συμβατικός διαλύτης εκχύλισης τους είναι το νερό και η διεργασία πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (90°C), αλλά με αυτή δεν εκχυλίζονται τζιντζερόλες. Μια αποτελεσματική πράσινη μέθοδος ταυτόχρονης εκχύλισης πολυσακχαριτών και τζιντζερολών είναι η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση με την παρουσία ιοντικού υγρού (ILUAE). Τα ιοντικά υγρά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μια γκάμα υδρόφιλων και λιπόφιλων βιοδραστικών ενώσεων με ανταλλαγή ανιόντων, δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και να τις διαλυτοποιήσουν. Συνεπώς, τα ιοντικά υγρά δίνουν τη δυνατότητα για ταυτόχρονη εκχύλιση τζιντζερολών και πολυσακχαριτών από το τζίντζερ.²⁵

Άλλος περιοριστικός παράγοντας για την εκχύλιση τους είναι η πυκνή δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων, που εμποδίζει τη διάλυση των πολυσακχαριτών στο διαλύτη, οπότε αυτή επιταχύνεται αποτελεσματικά με εκχύλιση υποβοηθούμενη είτε από υπερήχους (UAE), όπως έχει ειπωθεί, είτε από ένζυμα (EAE). Η μεν πρώτη επιστρατεύει το φαινόμενο της σπηλαίωσης και άλλα μηχανικά και θερμικά φαινόμενα για να προκαλέσει την απώθηση μεταξύ των μορίων μέσα στο πολυμερές, η δε δεύτερη είναι μια απλή διαδικασία, ασφαλής και φιλική απέναντι στο περιβάλλον, κατά την οποία τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται (κυτταρινάση, παπαΐνη, πηκτινάση) διασπούν ευθέως την κυτταρίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων και συνεισφέρουν στην απελευθέρωση των πολυσακχαριτών. Άλλη μέθοδος που προτείνεται είναι αυτή με τη χρήση βασικού διαλύματος, η οποία παρουσιάζει βελτιωμένη απόδοση και υψηλή αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων, μπορεί όμως να καταστρέψει ολοσχερώς τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα και να αποδομήσει τους πολυσακχαρίτες.³⁵

Πολυσακχαρίτες από διαφορετικά τμήματα του φυτού τζίντζερ έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες των πολυσακχαριτών που προέρχονται από τα φύλλα και το βλαστό του τζίντζερ επηρεάζονται σημαντικά από τη μέθοδο εκχύλισης που επιλέγεται, και κατ' επέκταση τα χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων (π. χ. ιξώδες) ποικίλουν και καθορίζουν τις εφαρμογές τους στην ιατρική και στη βιομηχανία καλλυντικών.³⁵

Ένα μικρό μέρος των παραπροϊόντων των φύλλων και του βλαστού του τζίντζερ χρησιμοποιείται στην παραγωγή βιοκαυσίμων, αλλά γενικά αυτά απορρίπτονται. Ωστόσο, οι πολυσακχαρίτες από τα φύλλα και το βλαστό έχουν τη δυνατότητα να αναστείλουν το διαβήτη με έναν τυπικό μηχανισμό ανταγωνισμού, αφού καταστέλλουν την κατάλυση με α-γλυκοσιδάση συνδεδεμένοι με αυτήν, αποτρέποντας την ένωσή της με το υπόστρωμα. Αυτό οφείλεται στην παρουσία ελεύθερων υδροξυλομάδων και καρβοξυλομάδων στους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τα υπολείμματα αμινοξέων του ενζύμου και το απενεργοποιούν, και όσο περισσότερα τα ηλεκτρικά φορτία των πολυσακχαριτών, τόσο πιο εύκολα σχηματίζονται συμπλέγματα ανάμεσα σε αυτούς και το ένζυμο. Επιπλέον, οι πολυσακχαρίτες από τα φύλλα και το βλαστό του τζίντζερ σαρώνουν ελεύθερες ρίζες και τερματίζουν αλυσιδωτές αντιδράσεις ριζών, δρώντας ως δότες ηλεκτρονίων και υδρογόνων. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυσακχαριτών μπορεί να επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε ουρονικό οξύ, το μοριακό βάρος, τη σύσταση σε μονοσακχαρίτες και τον τύπο γλυκοσιδικής σύνδεσης. Οι αλυσίδες πολυσακχαριτών μικρότερου μοριακού βάρους μπορούν να διέρχονται μέσω των βιολογικών μεμβρανών ευκολότερα και συνεπώς μπορούν να δρουν αποτελεσματικότερα χωρίς να προκαλούν ανοσοποιητικό στρες. Ακόμη, μικρό μοριακό βάρος πολυσακχαριτών σημαίνει περισσότερα εκτεθειμένα αναγωγικά άκρα και μεγαλύτερη επιφάνεια, που αυξάνουν την πιθανότητα για ένωση με ρίζες. Επίσης, οι ομάδες ουρονικού οξέος των πολυσακχαριτών μπορούν να αλληλεπιδρούν με άτομα άνθρακα. Έτσι, προηγούμενες αναφορές αποκαλύπτουν ότι υψηλά ποσοστά σε ουρονικό οξύ και χαμηλό μοριακό βάρος πολυσακχαριτών, προσδίδουν σε αυτούς ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.³⁵

1.2.2.3. Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που κατέχει εξέχουσα θέση στη διατροφή του ανθρώπου. Η περιεκτικότητα των διαφόρων τροφίμων σε ασκορβικό οξύ ποικίλει. Είναι θερμοευαίσθητο και ο ποσοτικός προσδιορισμός του στο ξηρό ρίζωμα τζίντζερ γίνεται με εκχύλιση του οξαλικού οξέος και περαιτέρω τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα 2,6-διχλωροφαινόλινδοφαινόλης. Το τζίντζερ κατατάσσεται στις μέτριας αξίας πηγές βιταμίνης C.³

1.2.2.4. Αιθέρια έλαια

Η διακριτή οσμή του τζίντζερ πηγάζει κυρίως από τα αιθέρια (πηκτικά) έλαιά του και η περιεκτικότητά του σε αυτά κυμαίνεται στο εύρος 1-3%. Περισσότερα από 50 συστατικά των ελαίων έχουν ταυτοποιηθεί και σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ισοπρενοειδή όπως μονοτερπενοειδή (β-*phellandrene*, (+)-*camphene*, *cineole*, *geraniol*, *curcumene*, *citral*, *terpineol*, *borneol*) και σεσκιτερπενοειδή (α-*zingiberene* (30-70%), β-*sesquiphellandrene* (15-20%), β-*bisabolene* (10-15%), (E-E)-α-*farnesene*, α-*curcumene*, *zingiberol*). Τα μονοτερπένια είναι ενώσεις που περιέχουν ένα σκελετό 10 ατόμων άνθρακα συχνά με τη μορφή δακτυλίου, ενώ τα σεσκιτερπενοειδή έχουν σκελετό από 15 άτομα άνθρακα. Με την αφυδάτωση του τζίντζερ γίνεται μετατροπή ορισμένων ισχυρών συστατικών των ελαίων σε ενώσεις με λιγότερο χαρακτηριστική οσμή. Τα αιθέρια έλαια

που περιέχονται στο τζίντζερ χαρακτηρίζονται από αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται κυρίως σε ενώσεις όπως το Zingiberene, το β-sesquiphellandrene και το α-curcumene. Οι κυριότερες εφαρμογές των αιθερίων ελαίων παρατηρούνται στα καλλυντικά, τα σαπούνια, τα αρώματα, τα βελτιωτικά γεύσης τροφίμων και την ιατρική. Η απαίτηση σε οργανικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, ισοπροπανόλη και αιθανόλη για την εκχύλιση βρώσιμων ελαίων έχει προκαλέσει σοβαρές ανησυχίες σχετικά με το περιβάλλον, ενώ η χρήση υπερήχων σε συνδυασμό με πράσινους διαλύτες είναι μια εφικτή λύση.¹⁸⁹³⁶

1.2.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα του τζίντζερ

Το τζίντζερ έχει την ικανότητα να «σαρώνει» και να αναστέλλει δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROSs), ελεύθερες ρίζες και διάφορα άλλα βλαβερά οξειδωτικά, ιδιότητα που οφείλεται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει, οι οποίες «παγιδεύουν» ελεύθερες ρίζες και αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Πράγματι, η χορήγηση τζίντζερ σε συγκεκριμένες δόσεις έχει αποδειχθεί ότι εξουδετερώνει διάφορους τύπους ελευθέρων ριζών και προστατεύει τα λιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων από την οξειδωτική δραστηριότητα. Πολλές μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει αρουραίους για πειραματόζωα έχουν δείξει ότι το τζίντζερ βελτιώνει τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της γλουταθειόνης του ορού. Εκτός αυτού, η αυξημένη χοληστερόλη ορού και ιστού, τα ανεβασμένα τριγλυκερίδια, λιποπρωτεΐνες και φωσφολιπίδια του ορού, που είχαν σημειωθεί σε κουνέλια μετά από δέκα εβδομάδες διατροφής πλούσιας σε χοληστερόλη, μειώθηκαν σημαντικά, όταν τους δόθηκε αιθανολικό εκχύλισμα τζίντζερ. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα τζίντζερ, επίσης, έχουν φανεί αποτελεσματικά στην ελάττωση του οξειδωτικού στρες σε διαβητικά κουνέλια. Άλλες έρευνες έχουν βρει ότι η αντιοξειδωτική δράση του τζίντζερ είναι ισοδύναμη με αυτήν του ασκορβικού οξέος.^{5 16 17 37}

Για παράδειγμα, φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο τζίντζερ (6-, 8-, 10-τζιντζερόλη και 6-σογκαόλη) είναι ισχυροί *in vitro* αναστολείς της οξείδωσης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL) από ιόντα Cu^{+2} , η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικής πλάκας. Οι τζιντζερόλες, που περιέχουν πολλές ομάδες υδροξυλίου και επιδεικνύουν αντιοξειδωτική ικανότητα δρώντας ως δότες υδρογόνου, προστατεύουν έναντι της υπεροξειδωσης λιπιδίων σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, όπως η καταλυόμενη από αιμογλοβίνη υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα *in vivo* έρευνας (σε αρουραίους), εκχυλίσματα από τζίντζερ μπορούν να δράσουν αντιοξειδωτικά και να προστατεύσουν αποτελεσματικά από την οξειδωτική φθορά του θυρεοειδούς λόγω χρόνιας έκθεσης σε δι(σ)φαινόλη Α (BPA, 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane), έναν από τους πιο συχνά ανιχνευόμενους χημικούς ρύπους στο περιβάλλον που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία πολυανθρακικών πλαστικών, εποξικών ρητινών κ. α. Η BPA συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και επάγει το σχηματισμό μεγάλων ποσοτήτων ROS στον εγκέφαλο, το αναπαραγωγικό σύστημα, το ήπαρ, τους νεφρούς και το θυρεοειδή αδέν. Η έκθεση σε αυτήν μπορεί να προκαλέσει υποθυρεοειδισμό. Τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων (και στο μεγαλύτερο βαθμό η 6-τζιντζερόλη) ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου του πυρηνικού παράγοντα Nrf-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), που είναι ο κύριος ενεργοποιητής της μεταγραφής αντιοξειδωτικών γονιδίων (π. χ. του ενζύμου αιμοξυγενάση-1, HO-1). Ακόμη, τα εκχυλίσματα ενισχύουν τη σύνθεση ορμονών του θυρεοειδούς (π. χ. της ελεύθερης τριωδοθυρονίνης FT3, της ελεύθερης θυροξίνης FT4 και της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης TSH) και προστατεύουν το DNA του θυρεοειδούς αδέν. από τον κατακερματισμό λόγω της BPA.^{36 38}

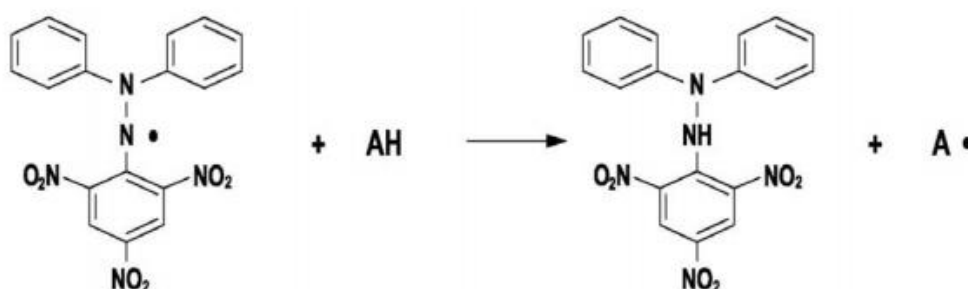
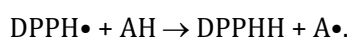
Η θέρμανση τριμμένου τζίντζερ μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα είτε την αύξηση είτε τη μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης, ανάλογα με την ελεύθερη ρίζα που σαρώνουν τα συστατικά του. Άρα, σε αντίθεση με άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης που περιέχουν αντιοξειδωτικά, η αντιοξειδωτική ικανότητα του τζίντζερ δε χάνεται απαραίτητα με το μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα, με τη θερμική κατεργασία αυξάνεται η ικανότητα σάρωσης των ριζών υπεροξειδίου, ενώ μειώνεται η ικανότητα σάρωσης των μονήρων οξυγόνων και των ριζών υπεροξυλίου. Το τελευταίο φαινόμενο οφείλεται στη χημική μετατροπή της 6-τζιντζερόλης σε 6-σογκαόλη, η οποία εμφανίζει μικρότερη ικανότητα σάρωσης των μονήρων οξυγόνων και των ριζών υπεροξυλίου, σε σχέση με την 6-τζιντζερόλη.²⁷

Σήμερα, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη γρήγορων τεχνικών ελέγχου ποιότητας για τον τεράστιο όγκο προϊόντων που παράγονται στη βιομηχανία. Υπάρχουν πολλά *in vitro* χημικά μοντέλα για να εκτιμηθεί η ικανότητα σάρωσης ριζών μιας καθαρής ένωσης ή ενός φυτικού εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα του τζίντζερ από το ρίζωμα επιδεικνύει καλή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH, που θα μελετηθεί ακολούθως.^{4 10 37}

1.2.3.1. Δοκιμή DPPH

Η δοκιμή DPPH είναι μια συνηθισμένη τεχνική και αποτελεί την πρότυπη χρωματομετρική μέθοδο που εφαρμόζεται σε εργαστήρια για τον προσδιορισμό της δυνατότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών, τόσο καθαρών φαινολικών ενώσεων όσο και φυτικών εκχυλισμάτων, γιατί είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική. Μετρά την ικανότητα μιας ένωσης να δράσει ως σαρωτής ελευθέρων ριζών ή δότης υδρογόνου. Τα αποτελέσματα συνήθως συγκρίνονται με την ικανότητα σάρωσης ενός γνωστού αντιοξειδωτικού.^{4 24}

Η αντιοξειδωτική δράση, λοιπόν, των ενώσεων που εκχυλίζονται από το τζίντζερ, δηλαδή η ικανότητά τους να σαρώνουν ελεύθερες ρίζες (Radical Scavenging Activity, RSA), προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, με τη χρήση του αντιδραστηρίου DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), μίας σταθερής ελεύθερης ρίζας. Όταν αυτό έρχεται σε επαφή με μια αντιοξειδωτική ουσία, η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως δότης υδρογόνου, αντιδρά ως εξής:



Σχήμα 2: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος αλκοολικού διαλύματος DPPH, από βαθύ ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο. Η δοκιμή DPPH πραγματοποιείται σε microplate 96 κυψελίδων, στις οποίες 100μL διαλύματος εκχυλίσματος σε αλκοόλη (π.χ. μεθανόλη) διαφόρων συγκεντρώσεων (από 5 έως 25μg/mL) προστίθενται σε 100μL αλκοολικού (π.χ. μεθανολικού) διαλύματος DPPH συγκέντρωσης 0,01%, το οποίο έχει παρασκευαστεί την ίδια μέρα που λαμβάνει χώρα η δοκιμή. Το plate επωάζεται

για 30min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, και μετράται η απορρόφηση όλων των διαλυμάτων με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-Vis) στα 515nm. Η DPPH RSA (%) υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{DPPH RSA (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] * 100,$$

όπου A_c η απορρόφηση του διαλύματος control (DPPH και μεθανόλη χωρίς εκχύλισμα) και A_s η απορρόφηση του δείγματος (DPPH και διάλυμα εκχυλίσματος).^{4,7,9}

Η ικανότητα σάρωσης ριζών εκφράζεται μέσω του δείκτη IC_{50} (50% inhibitory concentration), που ορίζεται ως η δόση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την ελάττωση κατά 50% της απορρόφησης του DPPH. Υψηλότερη τιμή IC_{50} αντιστοιχεί σε χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.^{5,22,35}

Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών ενώσεων μπορεί να εκτιμηθεί με βάση το χρόνο κατανάλωσης του 50% της ρίζας του DPPH. Όταν αυτός είναι μικρότερος από 5min, η κινητική θεωρείται γρήγορη, όταν κυμαίνεται στο εύρος 5-30min η κινητική έχει μέτρια ταχύτητα, και είναι αργή όταν ο χρόνος αυτός είναι μεγαλύτερος από 30min. Για παράδειγμα, το BHT παρουσιάζει αργή κινητική (αργή κατανάλωση της ρίζας του DPPH), ενώ το ασκορβικό οξύ γρήγορη (άμεση κατανάλωση). Έχει βρεθεί ότι μεθανολικά και αιθανολικά εκχυλίσματα τζίντζερ συγκέντρωσης 10mg/mL εμφανίζουν γρήγορη κινητική, καταναλώνοντας περισσότερο από το 80% των ριζών σε χρόνο μικρότερο από πέντε λεπτά, γεγονός που αποτελεί ένδειξη αντιοξειδωτικής δράσης μεγαλύτερης από του BHT και αποτελεσματικότητας παρεμφερούς με αυτής του ασκορβικού οξέος.³

1.2.3.2. Αύξηση αντιοξειδωτικής ικανότητας του τζίντζερ με εξαγωγείς (elicitors)

Φυτικά κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί *in vitro*, όπως κάλοι φυτών ή καλλιέργειες κυτταρικών αιωρημάτων, θα μπορούσαν να αποτελούν ανταγωνιστικά συστήματα για αποτελεσματική παραγωγή εμπορεύσιμων βιοδραστικών δευτερευόντων μεταβολιτών. Η παραγωγή αυτή, επιπρόσθετα, είναι δυνατό να ενισχυθεί με την κατεργασία των κυττάρων που δεν έχουν διαφοροποιηθεί με «εξαγωγείς» (elicitors). Το σαλικυλικό οξύ, το εκχύλισμα μαγιάς και η γλυκίνη είναι παραδείγματα σημαντικών εξαγωγέων που έχουν την ικανότητα να απάγουν δευτερεύοντες μεταβολίτες από *in vitro* καλλιέργειες.¹⁰

Γενικά, η κατεργασία των κάλων του τζίντζερ με εξαγωγείς επιδρά σημαντικά και θετικά στην αντιοξειδωτική δράση αυτών, γιατί αυξάνει την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά, φαινόμενο που σχετίζεται με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων κατά την ανάπτυξη και σταθεροποίηση των καλλιεργειών φυτικών κάλων. Συνεπώς, τελικά, η αυξημένη παραγωγή φαινολικών με μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να επιτευχθεί επιλέγοντας τον κατάλληλο εξαγωγέα στην απαιτούμενη συγκέντρωση, καθώς η παραγωγή πολυφαινολών επηρεάζεται σημαντικά από τον τύπο και τη συγκέντρωση του εξαγωγέα που χρησιμοποιείται κατά την κυτταρική ανάπτυξη. Για παράδειγμα, η χρήση εκχυλίσματος μαγιάς χαμηλής συγκέντρωσης ως εξαγωγέα σε καλλιέργεια κάλου *in vitro*, συνεπάγεται αύξηση της περιεκτικότητας σε φαινολικά στα κύτταρα που αναπτύσσονται, ενώ περαιτέρω αύξηση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας εκχυλίσματος μαγιάς δεδρα ως εξαγωγέας για την παραγωγή φαινολικών.¹⁰

Η κατεργασία, λοιπόν, των καλλιεργειών τζίντζερ (ριζώματος ή κάλου) θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τις βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών, ως μέθοδος βελτίωσης της αντιοξειδωτικής δράσης των προϊόντων.¹⁰

1.2.4. Άλλες βασικές φαρμακολογικές ιδιότητες του τζίντζερ

1.2.4.1. Αντιφλεγμονώδης, αναλγητική και νευροπροστατευτική δράση

Το έλαιο τζίντζερ απομονωμένο μέσω εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό έχει βρεθεί ότι ανακουφίζει από τον πόνο και μειώνει τη φλεγμονική απόκριση *in vivo*. Έχει εξετασθεί, για παράδειγμα, η αποτελεσματικότητα της 6-τζιντζερόλης έναντι χημικά επαγόμενου πόνου και οιδημάτων σε πόδια ζώων προκαλούμενων από λ-καραγενίνη. Υποστηρίζεται ότι το τζίντζερ είναι ικανότατο αντιφλεγμονώδες για ποικίλες ρευματικές και μυϊκές παθήσεις.^{11 14}

Πολλά υποσχόμενη είναι η χορήγηση πυκνού εκχυλίσματος τζίντζερ σε μορφή αλοιφής για την ανακούφιση από τον πόνο και την αντιμετώπιση φλεγμονών. Είναι γνωστό ότι η πρόσληψη εκχυλίσματος τζίντζερ από το στόμα έχει θετική επίδραση στη δυναμική της φλεγμονής. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά του να εμποδίζει τη φλεγμονή των αισθητήρων πόνου και πιο συγκεκριμένα των ιοντικών καναλιών TRP (Transient Receptor Potential). Οι υποδοχείς TRP είναι οι σημαντικότεροι ολοκληρωτές των ερεθισμάτων πόνου και φλεγμονής. Επειδή το τζίντζερ περιέχει συστατικά που διαφέρουν ως προς τη χημική τους δομή, ο μηχανισμός δράσης του εκχυλίσματος εμπλέκει ποικίλους φαρμακολογικούς στόχους. Σύμφωνα με τις διαθέσιμες πληροφορίες, η 10-τζιντζερόλη, η 8-σογκαόλη και η 10-σογκαόλη, αναστέλλουν ισχυρά τις δράσεις των ενζύμων COX-1, COX-2 (κυκλοοξυγενάση 1 και 2) και 5-LOX (5-λιποοξυγενάση), καταστέλλουν έτσι τη βιοσύνθεση της προσταγλανδίνης και λευκοτριενίων και κατά συνέπεια εμποδίζουν το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Τα υδατικά εκχυλίσματα από τζίντζερ εμποδίζουν την έκφραση διαφόρων προφλεγμονωδών κυτοκινών-δεικτών, όπως του TNF-α (tumor necrosis factor α) και της IL-6 (ιντερλευκίνη 6). Αναστέλλουν τη μεταγραφή του NF-κΒ και έτσι μειώνουν τον αριθμό των μορίων που προκαλούν φλεγμονές. Ο πυρηνικός παράγοντας κΒ (NF-κΒ) είναι ο κύριος ρυθμιστής της φλεγμονής, που μεσολαβεί για την έκφραση της COX-2.^{14 17 20 29}

Η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης αλοιφής με εκχύλιμα από τζίντζερ πραγματοποιείται με βάση το μοντέλο επαγόμενης οξείας φλεγμονής με τη βοήθεια AITC (AITC-induced acute inflammatory model). Το AITC είναι ισχυρό ερεθιστικό και ενεργοποιητής των καναλιών TRP. Υπολογίζεται ο δείκτης αντιεξιδρωματικής δράσης (indicator of anti-exudative activity), που αποτελεί ένα ποιοτικό μέτρο της αναστολής της ανάπτυξης φλεγμονής.¹⁴

Σε αυτά τα πλαίσια, το τζίντζερ επηρεάζει θετικά τη λειτουργία της μνήμης και επιδεικνύει αντινευροφλεγμονώδη δραστηριότητα που οφείλεται στη 10-τζιντζερόλη, άρα μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη και τη διαχείριση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως της νόσου του Αλτσχάιμερ και του Πάρκινσον. Η δράση του αυτή οφείλεται στην αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κΒ και της έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων και άρα στην ελάττωση των επιπέδων των IL-1β, IL-6 και TNF-α, στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του Nrf-2 από την 6-σογκαόλη και στη σάρωση διαφόρων ελευθέρων ριζών και την προστασία των νευρικών κυττάρων από τη φθορά του οξειδωτικού στρες από την πλευρά της 6-αφυδροτζιντζερδιόνης.³²

1.2.4.2. Αντικαρκινική δράση

Το οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα υπεροξειδωσης λιπιδίων, καθώς και δραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος συνδέονται με την ανάπτυξη του καρκίνου στον οργανισμό. Αντιοξειδωτικά μέσα θεωρείται ότι δρουν προστατευτικά κατά του καρκίνου σαρώνοντας δραστικά είδη ριζών, μειώνοντας την καταστροφή του DNA από αυτά. Μελέτες αναφέρουν τη δυνατότητα του τζίντζερ να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και κατά συνέπεια να λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας απέναντι σε διάφορα είδη καρκίνου, όπως του μαστού, του ήπατος, του παγκρέατος, του προστάτη και του παχέος εντέρου.^{20 32}

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του τζίντζερ αποδίδονται στην παρουσία των λεγόμενων όξινων βαλλινοειδών σε αυτό, όπως η 6-τζιντζερόλη και η 6-παραδόλη, αλλά και άλλων συστατικών όπως οι σογκαόλες και η ζινγκερόνη. Η 4-σογκαόλη έχει μια μοναδική δράση απέναντι στους κακοήθεις όγκους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού. Η 6-τζιντζερόλη μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και να προωθήσει την παραγωγή του παράγοντα TNF-α, που προκαλεί τη νέκρωσή τους. Είναι πιθανό αυτή να είναι υπεύθυνη για την αντινεοπλασματική συμπεριφορά του τζίντζερ στα νεφρικά κύτταρα. Όμως, για παράδειγμα, η μελέτη της ζινγκερόνης δεν έχει δείξει κυτταροτοξική δράση σε μαστικά καρκινικά κύτταρα για καμία συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος και για κανένα χρόνο έκθεσης. Αυτό σημαίνει ότι διαφορετικοί τύποι κυττάρων μπορεί να έχουν διαφορετική απόκριση και, πιθανώς, η αντινεοπλασματική δράση του τζίντζερ να οφείλεται στη συνύπαρξη βιοδραστικών ενώσεων (φαινολικά, ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή, βιταμίνη C).^{3 7 37}

Σύμφωνα με *in vivo* μελέτη σε αρουραίους, υδατικά εκχυλίσματα τζίντζερ μετριάζουν το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που σχετίζεται με τον καρκίνο του στομάχου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά στη θεραπεία αυτού. Τα βιοδραστικά συστατικά του τζίντζερ σαρώνουν τα ανιόντα υπεροξειδίου και τις ρίζες υδροξυλίου και οδηγούν σε σημαντική ελάττωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στους ιστούς του στομάχου και του ήπατος. Επιπρόσθετα, όπως ειπώθηκε προηγουμένως, τα υδατικά εκχυλίσματα από τζίντζερ αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης 2, η οποία είναι πιθανό να σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα γαστρίνης, μιας πεπτιδικής ορμόνης που εκκρίνεται από το γαστρικό βλεννογόνο και εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου του στομάχου και του γαστρινώματος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι αιθανολικά εκχυλίσματα τζίντζερ έχουν αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση σε αρουραίους στους οποίους έχει προκληθεί ηπάτωμα με αιθειονίνη.^{20 37}

Είναι σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι η αιθανόλη, σε αντίθεση με τη μεθανόλη, είναι διαλύτης που δεν αφήνει τοξικό υπόλειμμα και θεωρείται ασφαλής για την ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς, οι *in vivo* μελέτες για την εκτίμηση της βιολογικής δράσης του τζίντζερ στον οργανισμό πραγματοποιούνται για τα εκχυλίσματα που έχουν προκύψει με τη χρήση αιθανόλης ως εκχυλιστικού μέσου, γιατί έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τη μεθανόλη αλλά πολύ μικρότερη τοξικότητα.³

Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις συγκεντρώσεις των συστατικών φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται στο φαγητό και στα χορηγούμενα φάρμακα, ακόμα και αυτών που έχουν σημαντικά οφέλη, γιατί όλες οι ουσίες μπορούν να αποβούν τοξικές, ανάλογα με τις συνθήκες έκθεσης, τη χορηγούμενη δόση, το χρόνο και τη συχνότητα έκθεσης και τον τρόπο χορήγησης. Από την άλλη, η έρευνα με αντικείμενο μελέτης τα φυτά έχει αναπτυχθεί, και από τα εκχυλίσματά τους

έχουν απομονωθεί οι χημικές ενώσεις με κυτταροτοξική δράση απέναντι στα καρκινικά κύτταρα, με ή χωρίς παρενέργειες σε φυσιολογικά και υγιή κύτταρα. Ανάμεσα στις τεχνικές ανάλυσης της τοξικότητας ουσιών, είναι εκείνη που χρησιμοποιεί το φυτό *Allium cepa* L. (κρεμμύδι) και που είναι ιδανική για αρχικές εκτιμήσεις της κυτταροτοξικής δράσης θεραπευτικών φυτών, λόγω του χαμηλού κόστους της, της αξιοπιστίας της και της συμφωνίας των αποτελεσμάτων της με εκείνα άλλων δοκιμών, στηρίζοντας έτσι τις μελέτες σχετικά με την ελάττωση των βλαβών στην ανθρώπινη υγεία. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως στην παρακολούθηση της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Η μέθοδος αυτή της εκτίμησης των χρωμοσωμικών αλλαγών χρησιμοποιώντας ρίζες κρεμμυδιού ως δοκιμαστικό οργανισμό έχει πιστοποιηθεί από το Διεθνές Πρόγραμμα Χημικής Ασφάλειας (International Program of Chemical Security, IPCS) και το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environmental Program, UNEP) ως μια αποτελεσματική δοκιμή για τη μελέτη της γονιδιοτοξικότητας των ουσιών.³

1.2.4.3. Καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική και αντιλιπιδαιμική δράση

Έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί σε υπερτασικά πειραματόζωα δείχνει ότι η χρήση του τζίντζερ σε συγκεκριμένες δόσεις μπορεί να μειώσει την αρτηριακή πίεση. Προκαλεί αγγειοδιαστολή σε ποντίκια και κουνέλια και αποκλείει τους διαύλους ασβεστίου, όπως η δραστική ουσία βεραπαμίλη. Επιπρόσθετα, ελαττώνει τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης και επάγει τη μετατροπή της σε χολικά οξέα, αυξάνοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου χοληστερολ-7-α-υδροξυλάση. Μειώνει, λοιπόν, τη συγκέντρωση της συνολικής χοληστερόλης (TC) στο πλάσμα, καθώς και τα τριγλυκερίδια (TG), τη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και την πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (VLDL). Ο μηχανισμός σχετίζεται με την υψηλότερη έκφραση στο ήπαρ των ενεργοποιημένων υποδοχέων των πολλαπλασιαστών των υπεροξυσωμάτων (PPARα και PPARγ), που συνδέονται με την αθηροσκλήρωση. Σημειώνεται ότι η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας-χοληστερόλης (HDL-C), ένας προστατευτικός παράγοντας κατά της στεφανιαίας νόσου, δεν επηρεάζεται τόσο από διατροφικά συστατικά, οπότε δεν παρατηρείται αλλαγή στα επίπεδά της στον ορό του αίματος, με τη χορήγηση τζίντζερ.^{5 17 32}

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD), μια από τις πιο γνωστές χρόνιες παθήσεις του ήπατος, σημαίνει τη συσσώρευση περισσότερο από 5% τριγλυκεριδίων στο ηπατικό παρέγχυμα, χωρίς να έχει σημειωθεί κατανάλωση αλκοόλ. Περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος παθήσεων, από απλή στεάτωση μέχρι την πιο σοβαρή μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, που μπορεί να εξελιχθεί σε ίνωση και κίρρωση. Μπορεί να προκληθεί από αιτίες σχετιζόμενες με τη λεγόμενη αντίσταση στην ινσουλίνη, με σοβαρές διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων, με το οξειδωτικό στρες και με φλεγμονές. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη τζίντζερ μπορεί να λειτουργήσει ως συμπληρωματική θεραπεία μαζί με τις ήδη υπάρχουσες, σε ασθενείς με NAFLD και να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα των μέτρων που λαμβάνονται από εκείνους για τη βελτίωση του τρόπου ζωής τους (αύξηση σωματικής δραστηριότητας, αλλαγές στη διατροφή). Δεν εμφανίζει παρενέργειες και συμβάλλει στην αύξηση του ποσοστού επιτυχίας της θεραπείας.^{17 39}

Πιο αναλυτικά, το τζίντζερ μπορεί να συνεισφέρει στη θεραπεία της NAFLD, επειδή είναι ικανό να βελτιώσει την ευαισθησία των λιποκυττάρων στην ινσουλίνη, πιθανώς λόγω της επίδρασης των βιοδραστικών του ενώσεων στους PPARγ, δηλαδή στους τύπου γ υποδοχείς που ενεργοποιούνται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων, καθώς και στη ρύθμιση της αδιπονεκτίνης, η οποία αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνει τη συσσώρευση

λίπους στο ήπαρ. Οι PPAR γ και PPAR α επηρεάζουν τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ και άρα την παθογένεση της NAFLD, διότι βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνουν τη ροή ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Η 6-σογκαόλη, ειδικά, αναφέρεται ως σημαντικός αγωνιστής των PPAR γ στο λιπώδη ιστό. Επιπλέον, το τζίντζερ αναστέλλει αφενός τη δράση της φωσφορυλάσης του ήπατος για να περιορίσει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου που είναι αποθηκευμένο στα ηπατικά κύτταρα και αφετέρου της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης για να μειώσει τη διάσπαση της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε γλυκόζη, με αποτέλεσμα να ελαττώνει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Το τζίντζερ φαίνεται να μειώνει την απορρόφηση της γλυκόζης στον οργανισμό, μέσω της αναστολής ενζύμων της πορείας του μεταβολισμού της, όπως η α-γλυκοσιδάση και η αμυλάση στο έντερο. Επιπρόσθετα, συστατικά του τζίντζερ όπως οι τζίντζερόλες και η zerombon, είναι υπεύθυνα για τη μείωση του ρυθμού εξέλιξης της NAFLD και τον περιορισμό των πιθανοτήτων εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων εξαιτίας της ασθένειας αυτής, λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Αυτές αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου παραγωγής της πρωτεΐνης TNF α , η οποία διεγείρει την ηπατική στεάτωση γιατί περιορίζει την έκφραση της αδιπονεκτίνης. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλεται η παραγωγή θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως της hs-CRP, που παράγεται κυρίως στο ήπαρ και τα επίπεδά της στον ορό του αίματος σχετίζονται με το ρυθμό φλεγμονής του ήπατος. Η μείωση των επιπέδων της ALT, επίσης, δηλώνει ότι τα συστατικά του τζίντζερ δρουν προστατευτικά απέναντι στην ηπατική ίνωση. Ακόμη, η φετουίνη A συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και ευνοεί την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών, επομένως βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με NAFLD. Η μείωσή της, λοιπόν, μετά την πρόσληψη τζίντζερ, είναι μία ένδειξη βελτίωσης της κατάστασης των ασθενών. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες, τέλος, των συστατικών του τζίντζερ (τζίντζερόλες, σογκαόλες, παραδόλες και ζινγκερόνη) συντελούν στην επιβράδυνση της επιδείνωσης της NAFLD, γιατί βελτιώνουν την ανοχή στη γλυκόζη, ενδεχομένως επειδή αυξάνουν την έκφραση GLUT4 πρωτεϊνών, των υποδοχέων ινσουλίνης, και βελτιώνουν τη λειτουργία των β -παγκρεατικών κυττάρων.¹⁷

1.2.4.4. Μείωση σωματικού βάρους

Τα τελευταία χρόνια, η ευεργετική δράση του τζίντζερ στον έλεγχο του σωματικού βάρους έχει αποτελέσει αντικείμενο προσοχής. Έχουν λάβει χώρα πολλές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα και έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ανοχή στη γλυκόζη. Έχει παρατηρηθεί ότι εκχυλίσματα από τζίντζερ με οξικό αιθυλεστέρα προκαλούν σημαντική μείωση των αυξημένων επιπέδων λιπιδίων και του σωματικού βάρους, δράση που φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της 6-τζίντζερόλης στα εκχυλίσματα. Για να έχει ωστόσο εμφανή αποτελέσματα, θα πρέπει η πρόσληψη του τζίντζερ να συνδυάζεται με ισορροπημένη διατροφή και συστηματική σωματική αύξηση.^{9 17}

Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους το τζίντζερ επιδρά στην απώλεια βάρους δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί, όπως η καταστολή του ενζύμου παγκρεατική λιπάση και η ελάττωση της απορρόφησης του διατροφικού λίπους στο έντερο, η αύξηση της λιπόλυσης του λευκού λιπώδους ιστού με την ενίσχυση της ενεργοποίησης της ορμονοευαίσθητης λιπάσης, η παρεμπόδιση της λιπογένεσης και της συσσώρευσης λιπιδίων με τη μείωση της επαγωγής της συνθάσης λιπαρών οξέων και της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA, η αύξηση της θερμογένεσης και ο έλεγχος της όρεξης.¹⁷

1.2.4.5. Πρόληψη γήρανσης του δέρματος

Η 6-σογκαόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσική πρώτη ύλη στη βιομηχανία καλλυντικών για την πρόληψη της γήρανσης του δέρματος, λόγω της κυτταροπροστατευτικής, αντι-αποπτωτικής και αντιοξειδωτικής δράσης στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Human Dermal Fibroblasts, HDFs). Πιο συγκεκριμένα, η 6-σογκαόλη αναστέλλει την απόπτωση των HDFs που προκαλείται από την ακτινοβολία UVA και εμποδίζει την αύξηση των ROS λόγω αυτής, ενώ ταυτόχρονα προωθεί την έκφραση του Nrf-2, ενός παράγοντα μεταγραφής που ελέγχει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά το οξειδωτικό στρες. Έτσι, διεγείρει την έκφραση των τυπικών αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD (δισμουτάση του σουπεροξειδίου) και CAT (καταλάση), οπότε τελικά αναστέλλει την οξείδωση των δερματικών ινοβλαστών από την ακτινοβολία UVA. Προωθεί το σχηματισμό κολλαγόνου και περιορίζει τη γήρανση των HDFs.^{13 31}

1.2.4.6. Αντι-αρθριτική δράση

In vitro και in silico μελέτες έχουν αποδείξει ότι μεθανολικά εκχυλίσματα τζίντζερ δρουν κατά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (RA), μιας χρόνιας αυτοάνοσης διαταραχής που οδηγεί στην καταστροφή των οστών, των αρθρώσεων και των χόνδρων. Τα διαθέσιμα αντιφλεγμονώδη χημικά φάρμακα (στεροειδή, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) και τροποποιητικά της νόσου αντιρευματικά φάρμακα (DMARDs)) προκαλούν παρενέργειες και παρέχουν προσωρινή ανακούφιση. Τα συστατικά του τζίντζερ στα οποία οφείλεται η αντι-αρθριτική του δράση είναι η 6-τζίντζερόλη, η ζινγκερόνη και κυρίως η 8-τζίντζερόλη.²⁹

Οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνει τις παραπάνω ενέργειες το τζίντζερ χρειάζεται να ερευνηθούν περαιτέρω. Οι κατάλληλα σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές θα εγγραφούν στο μέλλον την επιβεβαίωση της δραστηριότητας του τζίντζερ στον ανθρώπινο οργανισμό.³²

1.2.5. Συμβατική εκχύλιση με πρώτη ύλη το τζίντζερ

Η εκχύλιση με αναρροή (reflux extraction), με υπερκρίσιμο CO₂ (CO₂ supercritical fluid extraction, SFE-CO₂) και με ανάδευση (agitated extraction, AE) είναι μερικές τεχνικές εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την απομόνωση βιοδραστικών συστατικών από το τζίντζερ. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα. Είναι χρονοβόρες και καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών που είναι επικίνδυνοι για το περιβάλλον και τους διαχειριστές της διεργασίας.¹⁵

Διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση με πρώτη ύλη το τζίντζερ είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το χλωριούχο μεθυλένιο, η ακετόνη, CO₂ υπό πίεση, 80% ακετονιτρίλιο, το κανονικό εξάνιο και το διχλωρομεθάνιο. Οι πολικότητες των πολυφαινόλων ποικίλουν, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολικές και μη πολικές πολυφαινόλες, επομένως μία ευρεία γκάμα διαλυτών έχει μελετηθεί για την εκχύλισή τους. Έχει παρατηρηθεί ότι η εκχύλιση σε τζίντζερ με αιθανόλη μπορεί να δώσει υψηλές αποδόσεις ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών. Η ικανότητα της αιθανόλης να εκχυλίζει περισσότερες πολυφαινόλες από τζίντζερ από ό, τι το νερό, πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητά της να εκχυλίζει τόσο πολικές όσο και μη πολικές πολυφαινόλες, λόγω της αμφιπαθητικής φύσης της, σε αντίθεση με το νερό που, λόγω της έντονα πολικής του φύσης, εκχυλίζει μόνο πολικές πολυφαινόλες. Τα κυριότερα συστατικά ενός υδατικού

εκχυλίσματος τζίντζερ είναι (πολικές) πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, ταννίνες, βιταμίνη C και b-καροτένιο.^{5 11 28 30 37 38}

1.3. Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DESS)

1.3.1. Ανάγκη σχεδιασμού και χρήσης πράσινων διαλυτών

Η παγκόσμια στροφή προς την Πράσινη Χημεία αποτελεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση κατά των συμβατικών χημικών πρακτικών. Ακολουθώντας την τάση αυτή, γίνεται επανεκτίμηση τόσο πρώτων υλών όσο και διεργασιών από το μηδέν, συνδυάζοντας την έρευνα για φυσικής προέλευσης βιώσιμες πρώτες ύλες και ανανεώσιμα υλικά, με περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικές βιομηχανικές διεργασίες και εφαρμογές.^{33 40}

Για παράδειγμα, τα τελευταία χρόνια, πραγματοποιούνται έρευνες πάνω στη διαμόρφωση «πράσινων», αποτελεσματικών και οικονομικών στρατηγικών εκχύλισης. Καταβάλλεται συνεχώς προσπάθεια να μειωθεί η χρησιμοποιούμενη ποσότητα διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης, αλλά ταυτόχρονα να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα και η εκλεκτικότητα και να προκύπτουν εκχυλίσματα υψηλής ποιότητας. Η πράσινη τεχνολογία εδώ στοχεύει στην ανάπτυξη μιας οικονομικά αποδοτικής και οικολογικά βιώσιμης μεθόδου εκχύλισης φυτοχημικών υψηλής αξίας για να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, συνταγογραφούμενα φάρμακα, προϊόντα περιποίησης και εναλλακτικά προϊόντα. Με άλλα λόγια, οι τεχνικές πράσινης εκχύλισης αναπτύσσονται με βάση το σχεδιασμό διεργασιών εκχύλισης με στόχο την ελάττωση της κατανάλωσης ενέργειας και χρημάτων στο ελάχιστο και τη μείωση της χρήσης πτητικών οργανικών διαλυτών (Volatile Organic Solvents, VOSS).^{7 16 23}

Οι διαλύτες είναι συχνά ο καθοριστικός παράγοντας του κόστους, του περιβαλλοντικού αποτυπώματος και της ασφάλειας διαφόρων χημικών και φαρμακευτικών διεργασιών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι εκχύλισης και απομόνωσης που μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση πλήθους οργανικών διαλυτών και να δώσουν πολυάριθμες νέες ενώσεις, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται σε φάρμακα, τρόφιμα και ροφήματα, καλλυντικά κλπ. Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης συνήθως συνδέονται με μεγάλους χρόνους διάρκειας της διεργασίας, κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών και την πιθανή θερμική υποβάθμιση των πολυφαινόλων. Οι περισσότεροι οργανικοί διαλύτες (και τα υδατικά τους διαλύματα), όπως η ακετόνη, το χλωροφόρμιο και το εξάνιο, που βρίσκουν εφαρμογή στην απομόνωση φυσικών προϊόντων, μπορεί να είναι εύφλεκτοι, πτητικοί, εκρηκτικοί, ακριβοί, έντονα τοξικοί, υπεύθυνοι για τη μόλυνση του περιβάλλοντος και το φαινόμενο του θερμοκηπίου (συσσωρεύονται στην ατμόσφαιρα λόγω των χαμηλών σημείων βρασμού τους), μη βιοαποικοδομήσιμοι και μπορεί να προκαλούν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Για αυτό, δεν είναι συμβατοί με τις αρχές των «πράσινων» διεργασιών εκχύλισης και η ανάγκη απομάκρυνσής τους από τα εκχυλίσματα είναι επιτακτική, οδηγώντας σε υψηλότερο ενεργειακό και οικονομικό κόστος. Το γεγονός αυτό αποτελούσε σημαντικό πρόβλημα τις προηγούμενες δεκαετίες, αλλά σήμερα είναι γνωστό ότι μπορεί να επιλυθεί μέχρι ενός σημείου με τη χρήση πράσινων διαλυτών.^{7 23 41 42}

Σε παγκόσμιο επίπεδο, λοιπόν, πραγματοποιείται έρευνα πάνω σε διάφορες ομάδες ενώσεων για το αν και πώς μπορούν να λειτουργήσουν ως ασφαλέστεροι διαλύτες, με στόχο το διαχωρισμό ουσιών με σημαντικά πλεονεκτήματα για την υγεία και την ευεξία από φυσικούς πόρους, με πράσινες μεθόδους. Σε αυτά τα πλαίσια, τα ιοντικά υγρά και οι ευτηκτικοί διαλύτες έχουν αναπτυχθεί με

σκοπό να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς διαλύτες. Στη μελέτη αυτή, το επίκεντρο του ενδιαφέροντος θα αποτελέσουν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DESs).^{7 24 33}

Προηγούμενες μελέτες συμφωνούν ότι τα DESs έχουν τη δυνατότητα εκχύλισης από φυτικούς πόρους και τα αποτελέσματα που επιτυγχάνουν είναι συγκρίσιμα με αυτά που προκύπτουν από παραδοσιακούς διαλύτες. Το να παράγονται διαλύτες φτιαγμένοι στα μέτρα της κάθε διεργασίας και να χρησιμοποιούνται σε προσεκτικά σχεδιασμένες συνθήκες για να συλλέξουν μια ουσία υψηλής αξίας από μια φυσική πηγή με τα λιγότερα δυνατά απόβλητα, δεν είναι τόσο απλό, γιατί απαιτείται κατάλληλος σχεδιασμός και έρευνα για την αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων, αλλά τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα μελετών είναι πολύ ενθαρρυντικά. Η απόδοση ενός DES ως εκχυλιστικού μέσου εκτιμάται με την ανάλυση του παραλαμβανόμενου εκχυλίσματος με μεθόδους όπως η HPLC, η φασματοφωτομετρία UV-Vis, καθώς και άλλες τεχνικές.³³

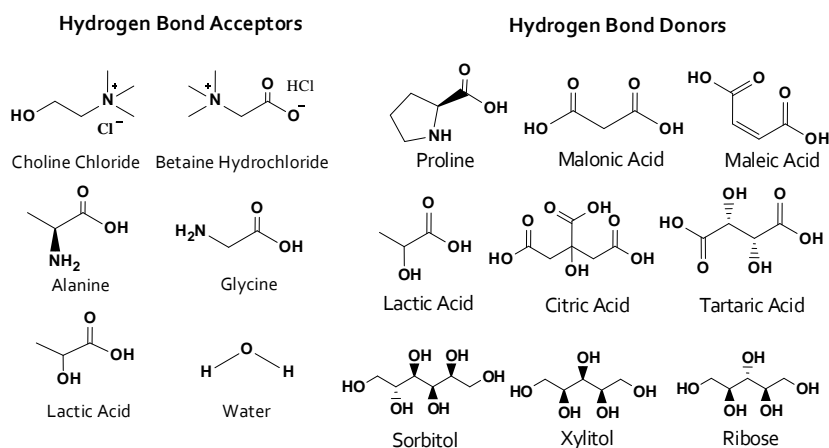
1.3.2. Ορισμός Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι ένα σύνολο πράσινων και βιώσιμων διαλυτών, οι οποίοι πρωτοεμφανίστηκαν το 2003. Αυτοί οι «καινούριοι» διαλύτες αναπτύσσονται με σκοπό να αντικαθιστούν τους συμβατικούς πετρελαιοειδείς οργανικούς διαλύτες σε πολλές εφαρμογές, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους. Ως βαθέως ευτηκτικός διαλύτης ορίζεται ένα ευτηκτικό υγρό μίγμα δύο ή περισσότερων στερεών ή υγρών συστατικών, τα οποία μπορούν να σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals. Μάλιστα, όταν πρωτεύοντες μεταβολίτες φυσικών προϊόντων, αναμιγνύονται στην κατάλληλη αναλογία, μετατρέπονται από ένα ετερογενές μίγμα σε υγρό, παρασκευάζονται οι λεγόμενοι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDESs), που συνεπώς αποτελούν υποκατηγορία των DESs. Έχουν παρασκευαστεί πάνω από 100 διαφορετικά NaDESs μέχρι σήμερα, τα οποία φαίνεται να λειτουργούν ως αποτελεσματικοί διαλύτες πολλών βιολογικά ενεργών φαρμακοφόρων μορίων διαφόρων πολικιοτήτων. Η έρευνα πάνω στα NaDESs ανθίζει με εκθετική ανάπτυξη. Τυπικά συστατικά των NaDESs που δρουν ως δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου είναι: άλατα (χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη κ. ά.), σάκχαρα (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη κ. ά.), πολυόλες (γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη, 1,2-προπυλενογλυκόλη, ξυλιτόλη, σορβιτόλη κ. ά.), αμινοξέα (αλανίνη, προλίνη, σερίνη, γλουταμινικό οξύ κ. ά.) και οργανικά οξέα (γαλακτικό, μηλονικό, μηλεϊνικό, οξαλικό, κιτρικό, μηλικό, τρυγικό οξύ κ. ά.).^{7 16 24 43}

1.3.3. Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου στα DESs

Ένας βαθέως ευτηκτικός διαλύτης συνίσταται από τουλάχιστον δύο ενώσεις, οι οποίες έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν πρωτόνια και ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της διαλυτικότητας τους. Το ένα από τα δύο συστατικά του διαλύτη λειτουργεί ως δότης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor, HBD) και το άλλο δρα ως δέκτης (Hydrogen Bond Acceptor, HBA). Με την ανάμιξη του δότη και του δέκτη σε κατάλληλη αναλογία δημιουργείται ένα εκτεταμένο «πλέγμα» μορίων διασυνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου, με ενδιαφέρουσες φυσικοχημικές ιδιότητες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενώσεων αυτών κατά αυτόν τον τρόπο οδηγεί στη δημιουργία ενός μίγματος χαμηλής θερμοκρασίας μετάβασης (Low Temperature Transition Mixture, LTTM), όπως καλείται. Η ύπαρξη των δεσμών υδρογόνου έχει παρατηρηθεί με φασματοσκοπία NMR.^{21 23 24 33 40 43}

Ως δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA), μπορούν να λειτουργήσουν ενώσεις όπως η χλωριούχος χολίνη, η βεταΐνη ή υδροχλωρική βεταΐνη, η L-καρνιτίνη, αμινοξέα (όπως η αλανίνη, η γλυκίνη, η προλίνη), ενώ ως δότες (HBD) οργανικά ιόντα φυτικής προέλευσης, όπως αμινοξέα πάλι, καρβοξυλικά οξέα (το γαλακτικό οξύ, το φορμικό οξύ, το οξικό οξύ κ. ά.), σάκχαρα, ουρία και αλκοόλες όπως η τριαιθυλενογλυκόλη, η αιθυλενογλυκόλη, η 1,3-προπανοδιόλη, η γλυκερόλη και η 1,3-βουτανοδιόλη. Γενικά, οι ομάδες αλκοολών, αμινών, αλδεϋδών, κετονών και καρβοξυλικών οξέων μπορούν να δράσουν και με τους δύο τρόπους. Μέσα στο DES, ένα πλήθος τύπων δεσμών υδρογόνου μπορεί να σχηματιστεί, π. χ. $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{OH}\cdots\text{Cl}$, $\text{NH}\cdots\text{Cl}$, $\text{OH}\cdots\text{NH}$, $\text{CH}\cdots\text{Cl}$, $\text{CH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{NH}\cdots\text{OH}$ και $\text{NH}\cdots\text{NH}$.^{16 23 40 43 44}



Σχήμα 3: Συνήθεις δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου στα NaDESs.

Τα NaDESs έχουν την ικανότητα να διαλύουν ένα μεγάλο φάσμα μεταβολιτών που δεν είναι πολύ διαλυτοί στο νερό, ή ακόμα φυσικών προϊόντων με μικρό ή μεγάλο μοριακό βάρος (π. χ. άμυλο, DNA, πρωτεΐνες). Η ιδιότητά τους αυτή οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών και των διαλυμένων ουσιών, σχετίζεται με την πολικότητα των διαλυτών και μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με την προσθήκη νερού ή την αύξηση της θερμοκρασίας. Δρουν επίσης ως εξαιρετικοί σταθεροποιητές φυσικών χρωστικών, ανθοκυανινών κλπ.⁴³

1.3.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs

Τα διάφορα DESs έχουν ποικίλες ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζονται σημαντικά από τη δομή τους και είναι άμεσα συνδεδεμένες με την απόδοση της εκχύλισης των ενώσεων-στόχων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυτών αυτών μπορούν να τροποποιηθούν με την αλλαγή της σύνθεσής τους (επιλογή συστατικών και μοριακής αναλογίας τους), με την αλλαγή της θερμοκρασίας ή με την προσθήκη νερού (είναι αναμίξιμα με αυτό).^{23 25 40 43}

1.3.4.1. Πτητικότητα και σημείο τήξεως

Τα DESs χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλή τάση ατμών και κατά συνέπεια πτητικότητα, ενώ το σημείο τήξεως ενός DES είναι σημαντικά χαμηλότερο από τα αντίστοιχα των ενώσεων από τις οποίες προέρχεται, με αποτέλεσμα ο διαλύτης να είναι σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($23\pm 2^\circ\text{C}$). Κύρια ωθούσα δύναμη για την ελάττωση του σημείου τήξεως είναι η

αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο συστατικών με δεσμούς υδρογόνου. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν στη μείωση αυτή είναι οι ενέργειες πλέγματος των ιοντικών ειδών των DESs, η φύση και η ασυμμετρία των οργανικών αλάτων και ο απεντοπισμός του φορτίου που συμβαίνει στην αλληλεπίδραση με δεσμούς υδρογόνου. Σε ορισμένα NaDESs, η προσθήκη νερού ελαττώνει το σημείο τήξεως.^{33 40 43 44}

1.3.4.2. Πολικότητα

Η πολικότητα είναι παράμετρος-κλειδί για ένα διαλύτη, γιατί καθορίζει τη διαλυτική του ικανότητα. Τα περισσότερα NaDESs είναι υδρόφιλα. Έχει διαπιστωθεί ότι τα NaDESs που περιέχουν οργανικά οξέα είναι τα πιο πολικά, ενώ ακολουθούν τα NaDESs με αμινοξέα. Τα λιγότερο πολικά (με πολικότητα κοντά σε αυτή του νερού και της μεθανόλης) είναι αυτά που συντίθενται από σάκχαρα και πολυόλες. Η πολικότητα ενός NaDES ενισχύεται με την προσθήκη νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ικανότητα διαλυτότητας ενός DES να ποικίλει με τη μεταβολή του ποσοστού του νερού, ανάλογα με τις διαφορετικές ενώσεις-στόχους. Για παράδειγμα, η ρουτίνη έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε DES χλωριούχο χολίνη-γλυκόζη με 5% νερό, αλλά η carthamin είναι περισσότερο διαλυτή στο ίδιο DES, όταν η περιεκτικότητά σε νερό είναι 10%.^{23 43 44}

1.3.4.3. Πυκνότητα

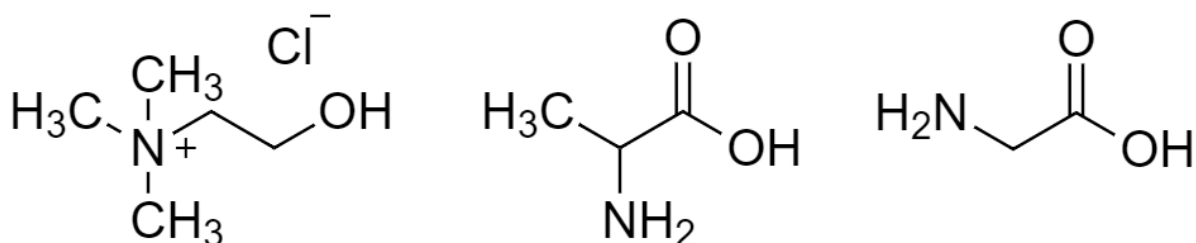
Η πυκνότητα όλων των NaDESs είναι μεγαλύτερη από εκείνη του νερού. Γενικά, η πυκνότητα μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας και της περιεκτικότητας σε προστιθέμενο νερό. Σε υψηλότερη θερμοκρασία, τα μόρια κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα και έτσι ο μοριακός όγκος του διαλύτη αυξάνεται. Μικρές αλλαγές στη μοριακή αναλογία των συστατικών του DES έχει παρατηρηθεί ότι δεν επηρεάζει σημαντικά την πυκνότητα.^{40 43}

1.3.4.4. Ιξώδες και επιφανειακή τάση

Το ιξώδες είναι μια παράμετρος που επηρεάζει τις υδροδυναμικές διεργασίες σε όλες τις εφαρμογές των DESs. Χαμηλή τιμή ιξώδους καθιστά τους διαλύτες εύκολους στη χρήση και συντελεί στη μείωση του λειτουργικού κόστους, ενώ το υψηλό ιξώδες εμποδίζει τη χρήση τους σε διεργασίες που απαιτούν διάχυση ή ροή. Όπως τα ιοντικά υγρά, έτσι και τα περισσότερα DESs (και NaDESs) έχουν υψηλότερο ιξώδες από το νερό και από πολλούς συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, εξαιτίας του πολύπλοκου δικτύου δεσμών υδρογόνου στο ευτηκτικό μίγμα και, σε μικρότερο βαθμό, λόγω των δυνάμεων van der Waals και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η μελέτη της χημικής δομής τους και η χρήση πρόσθετων (όπως νερού) διευκολύνει σημαντικά. Αυτό που είθισται είναι η ελάττωση του ιξώδους με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως προβλέπεται από το μοντέλο Arrhenius. Το δυναμικό ιξώδες μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας, λόγω της αύξησης της κινητικής ενέργειας των μορίων. Εναλλακτικά, η μείωση επιτυγχάνεται με προσθήκη νερού, το οποίο διασπά του δεσμούς υδρογόνου του πλέγματος.^{33 40 43 44}

Έχει παρατηρηθεί ότι, όσο μικρότερη είναι η ανθρακική αλυσίδα του δέκτη δεσμών υδρογόνου στο DES, τόσο πιο χαμηλό είναι το ιξώδες αυτού. Για παράδειγμα, τα DES που προέρχονται από L-καρνιτίνη, παρουσιάζουν υψηλότερο ιξώδες από αυτά που περιέχουν χλωριούχο χολίνη και βεταΐνη, και αυτό οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας της καρνιτίνης (C7>C5).¹⁶

Εκτός από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του δέκτη, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η παρουσία συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων στο μόριο. Για παράδειγμα, η χλωριούχος χολίνη έχει παρόμοια χημική δομή με τα αμινοξέα (αλανίνη, γλυκίνη), με τη διαφορά ότι η ομάδα COO⁻ έχει αντικατασταθεί από την OH. Έχει γίνει η υπόθεση ότι αυτή η ομάδα υδροξυλίου επιδρά στο ιξώδες ενός DES με π. χ. γαλακτικό οξύ ως δότη δεσμών υδρογόνου, εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ενώσεων. Παρόμοια, ένα NaDES αναμένεται να είναι πιο ιξώδες όταν ο δότης δεσμών υδρογόνου του φέρει περισσότερες υδροξυλομάδες.^{40 43}



Σχήμα 4: Συντακτικός τύπος της χλωριούχου χολίνης, της αλανίνης και της γλυκίνης (από αριστερά προς τα δεξιά).

Το πλεονέκτημα που παρουσιάζει το υψηλό ιξώδες των NaDESs είναι η συνεισφορά του στη μεγάλη σταθερότητα των φυσικών ενώσεων (π. χ. φαινολών) που είναι διαλυμένες σε αυτά. Η κινητικότητα των αποθηκευμένων ουσιών μειώνεται λόγω του πλέγματος των δεσμών υδρογόνου και αυτές προστατεύονται από την οξειδωτική διάσπαση.⁴⁴

Η επιφανειακή τάση αποτελεί σημαντική ιδιότητα σε εφαρμογές γαλακτωμάτων και επιφανειοδραστικών ουσιών. Έχει βρεθεί ότι ελαττώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας σε K.⁴³

1.3.4.5. Αγωγιμότητα

Η αγωγιμότητα εξαρτάται φυσικά από τη σύσταση των NaDESs και φαίνεται να ελαττώνεται σύμφωνα με την παρακάτω σειρά: βάση/πολυαλκοόλη>βάση/οργανικό οξύ~βάση/σάκχαρο>οργανικό οξύ/μη πολικό αμινοξύ>οργανικό οξύ/σάκχαρο>σάκχαρο/σάκχαρο. Αυξάνεται γραμμικά με τη θερμοκρασία.⁴³

1.3.4.6. pH

Το pH είναι μία φυσική ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, καθώς πρέπει να εξασφαλίζεται κάθε φορά η τιμή εκείνη του pH του μέσου που προκαλεί την ελάχιστη δυνατή διάβρωση. Τα DESs, για παράδειγμα, που έχουν ως βάση το γαλακτικό οξύ έχουν πολύ χαμηλές τιμές pH (κάτω από 2,5), δηλαδή είναι όξινα εξαιτίας της παρουσίας του οξέος. Τιμές pH στο εύρος 1-2 περίπου είναι κατάλληλες για εφαρμογή στην κλασματοποίηση της βιομάζας, διότι τα όξινα μέσα βοηθούν στις διεργασίες όξινης υδρόλυσης. Η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει μείωση του pH.⁴⁰

1.3.4.7. Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης είναι μια ιδιότητα των υλικών που εκφράζει το πώς το φως διαδίδεται στο μέσο. Η ιδιότητα αυτή είναι χρήσιμη στον έλεγχο της καθαρότητας των υλικών. Για διαφανή υγρά ο δείκτης διάθλασης κυμαίνεται στο εύρος 1-2, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στα DESs που περιέχουν γαλακτικό οξύ (σε θερμοκρασία δωματίου $23\pm 2^\circ\text{C}$, ο δείκτης διάθλασής τους κινείται μεταξύ των τιμών 1,4397 και 1,4620). Ελαττώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας σε K .^{40 43}

1.3.4.8. Θερμικές ιδιότητες

Η θερμική σταθερότητα των DESs είναι καθοριστικός παράγοντας της χρησιμότητάς τους. Τα DESs τείνουν να έχουν ελαφρώς διαφοροποιημένες θερμικές ιδιότητες σε σχέση με τα καθαρά συστατικά τους, λόγω του σχηματισμού του πυκνού δικτύου δεσμών υδρογόνου. Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση των DESs (η μελέτη της επίδρασης της σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας παρατηρώντας τις αλλαγές στο βάρος του DES) παρέχει έναν πιο λεπτομερή χαρακτηρισμό των διαλυτών, καθώς είναι σημαντικό να παρακολουθείται η συμπεριφορά τους σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης και να γνωρίζεται η θερμοκρασία θερμικής υποβάθμισης των DESs ή το ανώτατο θερμοκρασιακό όριο ευχρηστίας τους. Τα NaDESs εμφανίζουν αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα, με εξαίρεση αυτά που περιέχουν σάκχαρα. Το γαλακτικό οξύ κανονικά είναι ασταθές σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 122°C , αλλά οι δεσμοί υδρογόνου με τον αντίστοιχο δέκτη του DES εξασφαλίζουν σταθερότητα και αποτρέπουν το σχηματισμό λακτιδίου, συνεπώς η θερμοκρασία θερμικής αποσύνθεσης του DES είναι υψηλότερη.^{24 40 43 44}

Σημειώνεται επίσης ότι τα DESs τείνουν να εμφανίζουν πολύ υψηλές θερμοχωρητικότητες, το οποίο θεωρείται ένα πολύτιμο πλεονέκτημα για πολλές διεργασίες. Η θερμοχωρητικότητα του διαλύτη εκχύλισης μπορεί να ρυθμιστεί, με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας νερού. Επιπλέον, οι θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης των NaDESs είναι συνήθως μικρότερες από -50°C και το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο μπορούν σίγουρα να χρησιμοποιηθούν τα NaDESs ως διαλύτες είναι $0-100^\circ\text{C}$.^{24 43}

1.3.5. Μέθοδοι παρασκευής DESs

Οι επικρατέστερες μέθοδοι παρασκευής ενός DES είναι συνήθως απλές, φθηνές, πράσινες και περιλαμβάνουν την ανάμιξη δύο ενώσεων (του δότη και του δέκτη δεσμών υδρογόνων) σε συγκεκριμένη αναλογία υπό ανάδευση και θέρμανση ή εξάτμιση υπό κενό για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι να παραληφθεί καθαρό ομογενές υγρό. Ωστόσο, είναι δυνατή η παρασκευή DES με τη χρήση λουτρού υπερήχων, καθώς και με λυοφιλοποίηση (freeze-drying).^{16 23 24 33}

Η μέθοδος θέρμανσης, πιο αναλυτικά, περιλαμβάνει τη θέρμανση και μαγνητική ανάδευση του μίγματος των δύο συστατικών που θα αποτελέσουν το DES, σε θερμοκρασία χαμηλότερη από τους 50°C , για 30-90min, μέχρις ότου σχηματιστεί διαυγές, ομογενές και άχρωμο ρευστό. Σύμφωνα με τη μέθοδο της εξάτμισης υπό κενό για την παρασκευή NaDES, τα συστατικά διαλύονται σε νερό και ύστερα πραγματοποιείται εξάτμιση αυτού στους 50°C σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Το παραληφθέν ρευστό τοποθετείται σε ξηραντήρα, μέχρι σταθερού βάρους. Για τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης, σημειώνεται ότι τα συστατικά διαλύονται σε νερό πριν την

πραγματοποίησή της. Το νερό εξαχνώνεται και παραλαμβάνεται καθαρός διαλύτης. Συγκριτικά μιλώντας, η μέθοδος θέρμανσης είναι η φθηνότερη και η ασφαλέστερη από τις τρεις που έχουν αναφερθεί.^{7 23 41 43 44}

Για την υποβοηθούμενη από υπερήχους παρασκευή DES, τα δύο συστατικά αρχικά αναμιγνύονται στην κατάλληλη μοριακή αναλογία σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο στη συνέχεια σφραγίζεται και τοποθετείται εντός λουτρού υπερήχων. Ρυθμίζεται η ισχύς των υπερήχων (250-300W), ενώ η συχνότητα συνήθως είναι γύρω στα 40kHz. Η διαδικασία της παρασκευής ολοκληρώνεται όταν έχει σχηματιστεί διαυγές και ομογενές υγρό σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική θερμοκρασία στο λουτρό μπορεί να φτάσει έως και τους 50°C, λόγω του μεγάλου διαστήματος που λειτουργεί η συσκευή υπερήχων και διατηρείται υπό έλεγχο εξωτερικά με κυκλοφορία νερού. Ανάλογα με το μέγεθος του λουτρού υπερήχων, μπορεί να παρασκευαστεί πλήθος DESs ταυτόχρονα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός υγρού, τα DESs αφήνονται για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετά την παρασκευή τους, και το ζητούμενο είναι να μην πραγματοποιηθεί ανακρυστάλλωση. Σημειώνεται ότι η χλωριούχος χολίνη και η βεταΐνη, σε συνδυασμό με αλκοόλες, σχηματίζουν γενικά διαυγή και ομογενή υγρά μετά από παραμονή περίπου μίας ώρας στο λουτρό των υπερήχων, ενώ η L-καρνιτίνη μαζί με αλκοόλη απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στο λουτρό για να δώσουν DES, ακόμα και 5 ώρες. Η υποβοηθούμενη από υπερήχους σύνθεση DES, μπορεί να δώσει βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες όχι μόνο αποτελούμενους από ένα στερεό (π. χ. χλωριούχο χολίνη, βεταΐνη, L-καρνιτίνη) και ένα υγρό (αλκοόλες), αλλά επίσης από δύο διαφορετικά στερεά, όπως χλωριούχο χολίνη και ουρία. Τέλος, υπάρχουν αναφορές που πραγματεύονται την παρασκευή NaDESs με τη βοήθεια μικροκυμάτων, κατά την οποία το μίγμα των συστατικών ακτινοβολείται σε χαμηλή ισχύ για λίγα δευτερόλεπτα.^{16 41}

Η μέθοδος σύνθεσης που εφαρμόζεται σε κάθε περίπτωση μπορεί να επιλεγεί με βάση το κόστος (οπότε πρέπει να διατηρηθούν χαμηλές θερμοκρασίες), την ταχύτητα ή την αποτελεσματικότητα (άρα είναι επιθυμητές οι υψηλότερες θερμοκρασίες και/ή βοήθεια από υπερήχους), ή μπορεί να περιοριστεί από τις ιδιότητες των συστατικών (θερμοευαίσθητες ουσίες μπορεί να απαιτούν λυοφιλοποίηση αντί για θέρμανση λόγω θερμικής αστάθειας). Ακόμη, είναι πιθανόν η παρασκευή DES να πραγματοποιείται ευκολότερα, εάν η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου γίνεται με βάση τη φυσική κατάσταση του δότη δεσμών υδρογόνου. Για παράδειγμα, όταν ο δότης είναι σε υγρή μορφή (γλυκερόλη, γαλακτικό οξύ, φορμικό οξύ), προτιμάται η σύνθεση υποβοηθούμενη από υπερήχους, ενώ όταν ο δότης είναι στερεός, η παρασκευή γίνεται με τη μέθοδο θέρμανσης με ταυτόχρονη ανάδευση. Έτσι, για παράδειγμα, το DES χολίνη (δέκτης) - γλυκερόλη (δότης) φαίνεται να συντίθεται σε λιγότερο χρόνο και με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα με τη μέθοδο παρασκευής υποβοηθούμενη από υπερήχους, από ό, τι με τη μέθοδο θέρμανσης με ταυτόχρονη ανάδευση.^{33 41}

Μετά την παρασκευή του, το DES μπορεί να ταυτοποιηθεί και να χαρακτηριστεί με τη χρήση ποικίλων φασματοσκοπικών τεχνικών.²⁴

1.3.6. Εφαρμογές των DESs και ρόλος αυτών στους ζώντες οργανισμούς

Το ευρύ φάσμα εφαρμογών των DESs βοηθά στην εύρεση νέων τεχνολογιών βασισμένων σε «πράσινες» πτυχές με υψηλή απόδοση ανακύκλωσης, ώστε να αυξάνεται η βιωσιμότητα διαφόρων διεργασιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος, όπως ο διαχωρισμός αζεότροπων μιγμάτων και η βιοκατάλυση. Ονομαστικά, τα NaDESs βρίσκουν εφαρμογή στην κατάλυση, την οργανική σύνθεση, τη διάλυση, την εκχύλιση, την ηλεκτροχημεία, τη χημεία των υλικών και το βιομετασχηματισμό.^{24 40}

Τα NaDESs θεωρούνται πολλά υποσχόμενοι διαλύτες για διεργασίες εκχύλισης, χάρη στην ικανότητά τους να προσδίδουν και να δέχονται πρωτόνια και ηλεκτρόνια, που επιτρέπει το σχηματισμό ισχυρών δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια των εκχυλιζόμενων ενώσεων (π. χ. πολυφαινολών) και του χρησιμοποιούμενου DES, επομένως ευνοεί τη διάλυση των πρώτων στο δεύτερο. Οι δεσμοί αυτοί αυξάνουν την απόδοση της διεργασίας και σταθεροποιούν το παραλαμβανόμενο εκχύλισμα, προστατεύοντας έτσι τα μόρια από την υποβάθμιση. Αντικαθιστώντας τους συμβατικούς διαλύτες με NaDESs και χρησιμοποιώντας παράλληλα σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης υψηλής ενέργειας, όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) ή από μικροκύματα (MAE), επιτυγχάνεται βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης, ελάττωση του χρόνου εκχύλισης και μείωση της υποβάθμισης των ενώσεων και των ανεπιθύμητων επιπτώσεων στο περιβάλλον. Πλήθος ερευνών υπάρχει για τη χρήση των DESs στην εκχύλιση και σταθεροποίηση φυσικών χρωστικών, στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών ή φυσικών βιοπολυμερών, λιγνίνης, κυτταρίνης και σακχάρων, καθώς και βιοδραστικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένης της ρουτίνης, των ισοφλαβονών, των ανθρακινονών και των σαπωνινών. Όπως φαίνεται από τις μέχρι τώρα μελέτες, η χρήση DES στην εκχύλιση φλαβονοειδών μπορεί να επιτύχει εξαιρετικά αποτελέσματα, με ρυθμούς εκχύλισης ανταγωνιστικούς, αν όχι καλύτερους, από αυτούς που σημειώνονται με συμβατικούς διαλύτες και με ικανοποιητική συμπεριφορά των εκχυλισμάτων στις μετέπειτα εφαρμογές (απευθείας ανάλυση, σύνθεση ή κατάλυση), όπου αυτό επιχειρήθηκε. Αυτό που ακόμα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς είναι η εκλεκτικότητα των DESs ή NaDESs σε συγκεκριμένα μόρια φλαβονοειδών (συνήθως η αποτελεσματικότητα εκτιμάται σε όρους περιεκτικότητας ολικών φλαβονοειδών στο εκχύλισμα, ή ολικών φαινολικών ή αντιοξειδωτικής ικανότητας). Αυτό, λοιπόν, είναι το επόμενο βήμα της έρευνας που πρέπει να γίνει.^{23 24 33 40 41}

Τα DESs, σε αντίθεση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα που τα καθιστούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική στα σύγχρονα βιοδιυλιστήρια, για την απομάκρυνση της λιγνίνης (ενός φαινολικού πολυμερούς) από τον ξυλώδη ιστό και την παραγωγή χαρτιού, επίπλων, συμπληρωμάτων διατροφής και βιοκαυσίμου (κυρίως βιοαιθανόλης). Από το 2009, η χρήση των DESs στη βιομηχανία λιγνοκυτταρίνης έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Βρίσκουν εφαρμογή σε αυτήν ως καταλύτες, διαλύτες για οργανικές συνθέσεις και όχι μόνο, μέσα διαχωρισμού (π.χ. εκχυλιστικά μέσα) και μέσα αντίδρασης. Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση των DESs με βάση το γαλακτικό οξύ δείχνει ότι οι διαλύτες αυτοί είναι σταθεροί στις συνήθεις θερμοκρασίες των διεργασιών επεξεργασίας της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Η διατίμηση των λιγνοκυτταρινικών υλικών που έχουν υποστεί κατεργασία με τη βοήθεια οικολογικών διαλυτών είναι ένας παράγοντας-κλειδί για την οικονομία στον τομέα της χημικής βιομηχανίας.^{23 40 43}

Οι εκχυλίσεις παρουσία DES μπορεί να μην έχουν ως τελικό σκοπό τη συλλογή μιας ένωσης. Πολλές στοχεύουν στην παροχή καλύτερων αναλυτικών μεθόδων με τη χρήση DES, ενώ άλλες προσπαθούν να δημιουργήσουν ένα υπόστρωμα για διάφορες αντιδράσεις ή ακόλουθες εκχυλίσεις, μέσα από συστήματα που διαμορφώνονται με τη βοήθεια των DESs. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η χρήση DES επιτυγχάνει πράγματι υψηλή ανάκτηση του στόχου κατά την εκχύλιση, αλλά και επαρκώς χαμηλά όρια ανίχνευσης για τις αναλυτικές μεθόδους και σχηματισμό αποτελεσματικών υποστρωμάτων και προδρόμων για αντιδράσεις. Επιπλέον, τα DESs γενικά φαίνεται να προσαρμόζονται στις ανάγκες της κάθε διεργασίας, είτε χρησιμοποιούνται παλιότερα συστήματα εκχύλισης είτε νέες μέθοδοι (π. χ. σπηλαίωση αρνητικής πίεσης, NPC).³³

Σχετικά με την εφαρμογή των NaDESs στα συστήματα βιοκαταλυόμενων αντιδράσεων υπάρχουν ελάχιστες διαθέσιμες αναφορές. Έχει διαπιστωθεί ότι τα NaDESs επιδρούν στη δραστηριότητα και τη σταθερότητα διαφόρων ενζύμων αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται δεν είναι ακόμη γνωστός. Ο τρόπος επιρροής ποικίλει από ένζυμο σε ένζυμο και εξαρτάται από τη δομή της

πρωτεΐνης και το μηχανισμό κατάλυσης. Άλλη εφαρμογή των NaDESs είναι η χρήση τους ως μέσων ενίσχυσης του σήματος κατά τον ηλεκτροχημικό εντοπισμό βιοδραστικών υλικών (π. χ. πολυφαινολών). Οι σχετικές προτεινόμενες μέθοδοι είναι απλές, γρήγορες, βιώσιμες, χαμηλού κόστους και χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα, σταθερότητα και δυνατότητα πλήρους μετακίνησης.⁴³

Τα συστατικά των NaDESs έχουν μεγάλη διαθεσιμότητα στη φύση ως μεταβολίτες και κυτταρικά συστατικά σε όλους τους τύπους κυττάρων και οργανισμών. Έχει διατυπωθεί για αυτά ότι αποτελούν μία τρίτη κατηγορία υγρών που υπάρχουν στα ζωντανά κύτταρα, πέρα από το νερό και τα λιπίδια. Παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και πολλά βιολογικά φαινόμενα μπορούν να ερμηνευτούν όταν τα NaDESs λαμβάνονται υπόψη. Έτσι, πολλοί μεταβολίτες και μακρομόρια λίγο διαλυτά στο νερό μπορούν να συντεθούν, να αποθηκευτούν και να μεταφερθούν εντός των φυτών, λόγω της παρουσίας NaDESs ως διαλυτών/συνδιαλυτών, και τα κύτταρα και οι οργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες ξηρασίας ή/και ψύχους επειδή οι μεμβράνες, τα ένζυμα και οι μεταβολίτες τους παραμένουν σταθερά σε ένα κυτταρικό σύστημα πλούσιο σε NaDESs, όπου η πήξη αποτρέπεται από το πολύ χαμηλό σημείο τήξης των βαθέως ευτηκτικών μιγμάτων. Με αυτόν τον τρόπο, η θραύση των κυττάρων που προκαλείται από την παρουσία κρυστάλλων πάγου αποφεύγεται και τα ωσμωτικά φαινόμενα εξουδετερώνονται.^{43 44}

1.3.7. Πλεονεκτήματα των DESs

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες επιδεικνύουν πολλά προτερήματα, όπως η αμελητέα πτητικότητα (χαμηλή τάση ατμών) που μειώνει το περιβαλλοντικό αποτύπωμά τους, η ικανότητα να διαλυτοποιούν μια πληθώρα ενώσεων, η δυνατότητα αλλαγής του ιξώδους τους, το χαμηλό κόστος (ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα) και οι απλές, οικονομικές και γρήγορες διαδικασίες παρασκευής τους, κατά τις οποίες δεν παράγονται απόβλητα. Οι ιδιότητες των NaDESs που τα καθιστούν «πράσινους» διαλύτες είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα, η μη ευφλεκτότητα, η χαμηλή (ή και μηδαμινή) τοξικότητα και η φυσική τους προέλευση.^{16 24 33 34 40 44}

Τα NaDESs είναι μίγματα φυσικών, ανανεώσιμων, άμεσα διαθέσιμων και μη τοξικών συστατικών. Στην περίπτωση που τα συστατικά των DESs έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (U. S. Food and Drug Administration), τα DESs θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε εφαρμογές της φαρμακευτικής και της κοσμετολογίας. Κατ' επέκταση, και τα φυτικά εκχυλίσματα (π. χ. του τζίντζερ) που προκύπτουν με τη χρήση NaDESs, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε αυτές τις βιομηχανίες, χωρίς να είναι απαραίτητα επιπρόσθετα στάδια απομόνωσης του επιθυμητού προϊόντος (δηλαδή των βιοδραστικών μορίων) από το διαλύτη, με την προϋπόθεση βέβαια ότι έχουν πραγματοποιηθεί κατάλληλες δοκιμές τοξικότητας και συμβατότητας. Η ανάκτηση αυτή του διαλύτη θα ήταν επιπλέον δύσκολη, δεδομένης της χαμηλής τάσης ατμών των DESs. Το τελικό προϊόν της εκχύλισης, που αποτελείται από το χρησιμοποιηθέν NaDES και τις εκχυλισθείσες ενώσεις, είναι και αυτό εξ ολοκλήρου φυσικής προέλευσης. Τα NaDESs με αυτόν τον τρόπο παρέχουν σταθερότητα στις βιοδραστικές ενώσεις και λειτουργούν, παρά το υψηλό ιξώδες τους, ως συστήματα αποθήκευσης για αυτά τα ευαίσθητα μόρια ή ακόμα ως συστήματα διαμόρφωσης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατευθείαν σε συγκεκριμένες εφαρμογές (κοσμετολογία, συμπληρώματα διατροφής, διατροφικά και άλλα φαρμακευτικά προϊόντα), σε τελικά προς κατανάλωση προϊόντα. Γενικά, η εξέλιξη των DESs και, κυρίως, των NaDESs, σημαίνει ότι ο σχεδιασμός των καινούριων διαλυτών μπορεί να εστιάσει σε ένα διαλύτη που αποτελεί ικανό και βιοσυμβατό μέσο αποθήκευσης, ένα άμεσα διαθέσιμο ενεργό συστατικό, έναν πολύ αποτελεσματικό καταλύτη, ή έναν

μεταφορέα μορίων στα επόμενα στάδια, που ενδεχομένως παίζει βοηθητικό ρόλο στις αντιδράσεις που μπορεί να λαμβάνει μέρος το εκχύλισμα ή στο συνολικό περιβάλλον που πρόκειται να τοποθετηθεί. Η παράκαμψη του τελευταίου σταδίου της εκχύλισης (του διαχωρισμού του DES από το εκχύλισμα) φαίνεται ότι είναι δυνατή από την ικανοποιητική συμπεριφορά του συστήματος εκχυλίσματος με DES σε αναλυτικές μεθόδους ή χημικές διεργασίες.^{16 23 24 33}

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεταβλητών, όπως το πλήθος των συστατικών του DES, οι αναλογίες αυτών, καθώς και τα ίδια τα συστατικά, που δίνουν τη δυνατότητα στον ερευνητή να σχεδιάσει και να χρησιμοποιήσει οποιοδήποτε DES σε οποιοδήποτε σύστημα μέσω οποιασδήποτε μεθόδου, με την υπόσχεση ότι η προκύπτουσα εκχύλιση θα είναι αποτελεσματική αλλά ταυτόχρονα πράσινη, δεδομένων των γενικών ιδιοτήτων των DESs (για αυτό και αποκαλούνται designer solvents). Το σχετικά χαμηλό κόστος των συστατικών των DESs, σε συνδυασμό με την αυξημένη εκλεκτικότητα μετά από προσεκτικό σχεδιασμό, σημαίνει ότι το μέλλον των πράσινων διεργασιών θα περιλαμβάνει σίγουρα τα DESs στην επιτομή των εκχυλίσεων. Επιπλέον, σημαντικά πλεονεκτήματα των μεθοδολογιών εκχύλισης με τη χρήση DESs και τεχνικών υψηλής ενέργειας ταυτόχρονα είναι η απουσία τοξικών παραπροϊόντων (που παρατηρείται στην περίπτωση των συστημάτων κλασικών οργανικών διαλυτών) και οι μικροί χρόνοι εκχύλισης.^{24 33 43}

Αφού έχει γίνει λόγος για τα βασικότερα χαρακτηριστικά των DESs, είναι σκόπιμο στο σημείο αυτό να σχολιαστεί η συμμετοχή των DESs σε ορισμένες από τις δώδεκα αρχές που διέπουν την Πράσινη Χημεία. Η χρήση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών εξυπηρετεί την αποφυγή του διαχωρισμού και καθαρισμού του τελικού προϊόντος (εκχυλίσματος) από αυτούς, στάδια στα οποία θα ήταν απαραίτητη η παρουσία επιπλέον βοηθητικών ουσιών και διεργασιών, επομένως αποτελεί μια τυπική προσέγγιση της σύνθεσης εντός ενός δοχείου (one-pot synthesis) για την εφαρμογή της 1^{ης} αρχής της Πράσινης Χημείας (πρόληψη του σχηματισμού αποβλήτων αντί της εκ των υστέρων επεξεργασίας τους). Για το λόγο ότι ακριβώς ενσωματώνονται στο τελικό προϊόν, συντελούν στη βελτίωση της οικονομίας ατόμου. Η πολύ χαμηλή πτητικότητα των διαλυτών αυτών, ελαττώνει την έκθεση μέσω της εισπνοής σε αυτούς, σε αντίθεση με ό, τι συμβαίνει με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες χαμηλού μοριακού βάρους. Ειδικά στην περίπτωση της χρήσης NaDESs, οι οποίοι είναι μη επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία, η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών από τους νέους αυτούς διαλύτες ικανοποιεί την 5^η αρχή (ανάγκη για αβλαβείς βοηθητικές ουσίες). Η χρήση NaDESs είναι σύμφωνη και με την 6^η αρχή (αναγνώριση και ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών και οικονομικών επιπτώσεων των ενεργειακών αναγκών), αφενός γιατί δεν είναι απαραίτητος ο χρονοβόρος και ενεργοβόρος διαχωρισμός τους από το τελικό προϊόν, αφετέρου γιατί είναι συμβατά με διάφορες τεχνικές που ελαχιστοποιούν το χρόνο μιας διεργασίας και απαιτούν ηπιότερες συνθήκες (π. χ. εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα). Τα NaDESs προφανώς και εξυπηρετούν τη 10^η αρχή (σχεδιασμός για βιοαποικοδομησιμότητα), καθώς βιοδιασπώνται σε μη επικίνδυνα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον προϊόντα, λόγω της φυσικής τους προέλευσης. Τέλος, είναι μη εύφλεκτα και η παρασκευή τους είναι εύκολη, οπότε μπορούν να συντεθούν και να χρησιμοποιηθούν επιτόπου και έτσι να αποφεύγεται η μετακίνησή τους. Επομένως, οι πιθανότητες να προξενήσουν χημικό ατύχημα (π. χ. έκρηξη) είναι περιορισμένες (12^η αρχή).^{42 45}

1.3.8. Σύγκριση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών με ιοντικά υγρά

Τα DESs έχουν δοκιμαστεί ως πρόσθετα σε παραδοσιακά συστήματα εκχύλισης ή ανάλυσης, αλλά επίσης έχουν συνδυαστεί με διάφορα άλλα πρόσθετα σε εκχυλίσεις, με τα ιοντικά υγρά (μια άλλη κατηγορία πράσινων διαλυτών) να αποτελούν το επικρατέστερο παράδειγμα στη βιβλιογραφία. Η

μελέτη του συνδυασμού των DESs και των ιοντικών υγρών είναι αναπόφευκτη, δεδομένης της παρόμοιας δομής και συμπεριφοράς τους ως διαλυτών. Τα ιοντικά υγρά συντίθενται συνήθως από ένα οργανικό κατιόν μεγάλου μεγέθους και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν και έχουν θερμοκρασία τήξεως μικρότερη από 100°C. Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών, όπως η χαμηλή ευφλεκτότητα, η χαμηλή τάση ατμών, η χημική και θερμική σταθερότητα, το μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στις οποίες είναι υγρά, η υψηλή αγωγιμότητα, η εκλεκτικότητα, η ικανοποιητική ικανότητα διάλυσης οργανικών, ανόργανων και οργανομεταλλικών ενώσεων και η ευκολία στην ανακύκλωση και στο χειρισμό τους, τα καθιστούν κατάλληλα για πολλές εφαρμογές σε πολυάριθμα πεδία, όπως στη βιομηχανία τροφίμων. Για την εκχύλιση ουσιών από μπαχαρικά δεν απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και τα συστήματα εκχύλισης είναι απλοποιημένα. Ακόμη, η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την προεπεξεργασία του δείγματος, όταν χρησιμοποιείται ιοντικό υγρό ως μέσο εκχύλισης.^{9 33}

34 42

Συχνά τα DESs συγκρίνονται με τα ιοντικά υγρά και ακόμα χαρακτηρίζονται ως νέα γενιά των ιοντικών υγρών. Αποτελούν εναλλακτική των ιοντικών υγρών και παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτά, καθώς τα ιοντικά υγρά είναι τοξικά, πολύ ακριβά στην παραγωγή τους, παρασκευάζονται δυσκολότερα και με μικρότερη καθαρότητα από ό, τι τα DESs, δεν προσφέρουν τόσο μεγάλη ποικιλία όσο τα DESs (για τα οποία υπάρχουν περισσότερες επιλογές για το σχεδιασμό, περισσότεροι δότες και δέκτες και σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες) και συντίθενται από ορυκτούς πόρους, με αποτέλεσμα να τίθεται υπό αμφισβήτηση η βιοαποικοδομησιμότητά τους. Τα NaDESs, λοιπόν, αποτελούν τη φυσική εξελιγμένη μορφή των συμβατικών ιοντικών υγρών, γιατί μπορούν να σχηματιστούν από πράσινους πόρους, να είναι πολικά ή μη πολικά, υδρόφιλα ή υδρόφοβα και ειδικά φτιαγμένα για κάθε περίπτωση, δηλαδή μπορούν να σχεδιάζονται και να συντίθενται για κάθε εκχύλιση ξεχωριστά, με τη μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα. Τα DESs συχνά αντικαθιστούν τα καθαρά ILs στην εκχύλιση υψηλά υδρόφοβων ενώσεων. Ακόμη, στην περίπτωση της χρήσης ιοντικού υγρού κατά την εκχύλιση, αυτό θα πρέπει στο τέλος να διαχωριστεί από τις τζιντζερόλες στην περίπτωση του τζίντζερ ως πρώτη ύλης (π. χ. με τη βοήθεια μακροπορώδους ρητίνης) και να ανακτηθεί για ανακύκλωση, σε αντίθεση με ό, τι συμβαίνει στα DESs. Γενικά, ο διαχωρισμός του ιοντικού υγρού από το εκχύλισμα αποτελεί βήμα που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη και να μελετηθεί, ειδικά στην περίπτωση της εφαρμογής της διεργασίας εκχύλισης σε βιομηχανική κλίμακα (scale-up). Δεν είναι εφικτός με μια απλή εξάτμιση, λόγω της μη πτητικής φύσης των απρωτικών ιοντικών υγρών. Έχουν προταθεί διάφορες μεθοδολογίες (χρήση αντι-διαλύτη, οπισθοεκχύλισης και τεχνικών προσρόφησης) για την επίτευξή του, αλλά υπάρχει ακόμα πολλή έρευνα που πρέπει να γίνει. Σύμφωνα με οικονομικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί για την εκχύλιση με πρώτη ύλη βιομάζα, η χρήση ιοντικών υγρών ως διαλυτών εκχύλισης συμφέρει μόνο στην περίπτωση που η συγκέντρωση των ουσιών-στόχων στη βιομάζα είναι σημαντικά υψηλή.^{25 33 34 40 43}

1.3.9. Διαχωρισμός βιοδραστικών ουσιών από DESs

Ενδεικτικά αναφέρονται δύο τεχνικές απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων (και ειδικότερα φλαβονοειδών) από εκχυλίσματα που έχουν ληφθεί με τη βοήθεια DES, για την περίπτωση που ο διαχωρισμός είναι αναγκαίος. Μία δημοφιλής και αποτελεσματική μέθοδος για τον εμπλουτισμό και το διαχωρισμό φλαβονοειδών από τέτοιου είδους εκχυλίσματα περιλαμβάνει την εφαρμογή χρωματογραφίας σε στήλη πληρωμένη με μακροπορώδη ρητίνη καθαρισμένη με απιονισμένο νερό, η οποία μετά την έκθεση στο εκχύλισμα υφίσταται έκλυση με υδατικό διάλυμα αιθανόλης. Η μέθοδος αυτή βέβαια απαιτεί περαιτέρω κατεργασία του διαλύματος για την απομόνωση ενός

συγκεκριμένου φλαβονοειδούς από μια ομάδα φλαβονοειδών που ενδεχομένως έχουν εκχυλιστεί από μία πηγή. Η μέθοδος της πακτωμένης στήλης μπορεί να δώσει εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις που φτάνουν μέχρι το 98,92%. Από την άλλη, η οπισθοεκχύλιση με τη χρήση ενός αντι-διαλύτη αποτελεί απλούστερη μέθοδο απομόνωσης φλαβονοειδών από DESs. Μετά από φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος, το υπερκείμενο υγρό αραιώνεται με έναν οργανικό αντι-διαλύτη (π. χ. μεθανόλη) και ακολούθως φυγοκεντρείται πάλι για να δημιουργηθεί διφασικό σύστημα. Το νέο υπερκείμενο υγρό που σχηματίζεται είναι το σύστημα-στόχος και μένει μόνο η εξάτμιση του διαλύτη (π. χ. με εξάτμιση υπό κενό). Άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί κατά καιρούς για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από NaDESs είναι η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα και η κρυστάλλωση. Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται και ανακύκλωση του χρησιμοποιηθέντος NaDES.^{33 44}

1.3.10. Τοξικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα των DESs

Γενικά, πολλές φορές τα DESs αναφέρονται ως ασφαλή, μη τοξικά ή χαμηλής τοξικότητας, χωρίς καμία άλλη αιτιολόγηση πέρα από την ασφάλεια και τη χαμηλή τοξικότητα των συστατικών τους. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή είναι αληθής μόνο στην περίπτωση των NaDESs, που συνίστανται από ενώσεις φυσικής προέλευσης και θεωρούνται από τη φύση τους μη τοξικά. Σπάνια στη βιβλιογραφία εξετάζεται η τοξικότητα των DESs ή NaDESs, και στην πλειοψηφία των δημοσιευμένων εργασιών που πραγματεύονται τη χρήση τους ως διαλυτών εκχύλισης, δεν περιλαμβάνονται δοκιμές τοξικότητας. Η πρώτη μελέτη της τοξικότητας και της κυτταροτοξικότητας DESs που έφεραν χλωριούχο χολίνη ως δέκτη και γλυκερίνη, αιθυλενογλυκόλη, τριαιθυλενογλυκόλη και ουρία ως δότες, έδειξε ότι αυτά τα DESs εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη κυτταροτοξικότητα από ό, τι τα συστατικά τους ενάντια στην *Artemia salina*, προφανώς εξαιτίας του δικτύου δεσμών υδρογόνου στο DES, αλλά οπωσδήποτε απαιτείται περαιτέρω έρευνα. Από την άλλη, τόσο τα ίδια τα DESs όσο και τα συστατικά τους δεν είναι τοξικά απέναντι στα *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*.³³

Επίσης, η μελέτη της τοξικότητας μιας σειράς NaDESs ενάντια σε κύτταρα που προσομοιάζουν ινοβλάστες L929, έχει αποδείξει ότι η παρουσία οργανικών οξέων ως δοτών δεσμών υδρογόνου συνεπάγεται αυξημένη κυτταροτοξική δραστηριότητα, μάλλον λόγω της ελάττωσης του pH από τα οξέα. Επιπλέον, δοκιμές της κυτταροτοξικότητας μιας σειράς 28 NaDESs με χλωριούχο χολίνη ως δέκτη και με ποικιλία δοτών έναντι κυτταρικής γραμμής ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρών (HEK-293), κατέληξαν στο ότι η χλωριούχος χολίνη και οι ενώσεις που λειτουργούσαν ως δότες, ήταν λιγότερο τοξικές από τα αντίστοιχα NaDESs και ότι οι δομές των δοτών και ο λόγος HBA/HBD έχουν σημασία για την κυτταροτοξικότητα. Άλλη μελέτη καταλήγει στο ότι αυξημένο ιξώδες ενός NaDES σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα κυττάρων.^{33 43}

Έχει εξετασθεί η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων NaDESs κατά των *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis* και *Candida albicans*, καθώς και η κυτταροτοξικότητά τους απέναντι σε ανθρώπινα φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα (HEK293T, HeLa, MCF-7). Έχει βρεθεί ότι NaDESs που περιέχουν οργανικά οξέα χαρακτηρίζονται από καλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ενώ τα συστατικά τους ξεχωριστά δεν είναι δραστικά. Το DES χλωριούχος χολίνη-οξαλικό οξύ επιδεικνύει μέτρια κυτταροτοξικότητα επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα. Αυτή αποτελεί σημαντική παρατήρηση και, σύμφωνα με τους συγγραφείς της σχετικής εργασίας, το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα υγιή.³³

Ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη βιοαποικοδομησιμότητα των DESs. Αυτή εξαρτάται άμεσα από τη χημική δομή τους και πιστεύεται ότι ελαττώνεται ακολουθώντας την παρακάτω σειρά: DESs βασισμένα σε αμίνες>DESs βασισμένα σε σάκχαρα>DESs βασισμένα σε αλκοόλες>DESs βασισμένα σε οξέα. Έχει βρεθεί ότι η προσθήκη νερού στο διαλύτη επιταχύνει τη βιοαποικοδόμησή του γιατί αποδυναμώνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του.^{43 44}

1.4. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE)

1.4.1. Εισαγωγικά στοιχεία για την ακουστική σπηλαίωση

Με τον όρο υπέρηχοι καλούνται τα ηχητικά κύματα συχνότητας εκτός του εύρους που γίνεται αντιληπτό από το ανθρώπινο αφτί (γενικά >20kHz και <10MHz, δηλαδή μικρότερη από εκείνη των μικροκυμάτων). Η ηχοημεία χρησιμοποιεί κύματα υψηλής συχνότητας για να δημιουργήσει κοιλότητες αέρα οι οποίες σπάνε, μετατρέποντας την ηλεκτρική ενέργεια σε μηχανική. Το φαινόμενο αυτό είναι ευρέως γνωστό με τον όρο σπηλαίωση (cavitation) και, εάν είναι αποτέλεσμα της διέλευσης κυμάτων υπερήχων μέσα από ένα υγρό μέσο, τότε ορίζεται ως ακουστική σπηλαίωση. Η ακουστική σπηλαίωση δημιουργείται από μια σειρά υψηλών και χαμηλών πιέσεων των υπερηχητικών κυμάτων συγκεκριμένων συχνοτήτων (20-1000kHz), που επιδρά στα μόρια του υγρού μέσου και οδηγεί στο σχηματισμό παροδικών μικροφουσαλλίδων, λόγω των αλλαγών στην πίεση. Το μέγεθος των φουσαλλίδων μπορεί να γίνει μεγαλύτερο από το διπλάσιο του αρχικού τους μεγέθους μετά από έναν ή δύο ακουστικούς κύκλους και αυτές γίνονται ασταθείς. Τελικά, οι φουσαλλίδες σπηλαίωσης «καταρρέουν» μέσα στο υγρό μέσο και απελευθερώνουν μεγάλα ποσά ενέργειας (5000K και 1000atm), αναπτύσσοντας διατμητικές τάσεις και υψηλές ταχύτητες ρευστού και δημιουργώντας τύρβες, κύματα σοκ και μικροπίδακες. Ταυτόχρονα μπορεί να παράγονται πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες λόγω της ομολυτικής σχάσης των μορίων νερού και διαλυμένων αερίων, π. χ. οξυγόνου.^{1 2 21 42 46 47}

Πιο αναλυτικά, η εφαρμογή ενός ακουστικού πεδίου προκαλεί την ταλάντωση μιας ελεύθερης φουσαλλίδας γύρω από την ακτίνα της ισορροπίας της. Όταν η φουσαλλίδα συσπάται, αυξάνεται η συγκέντρωση αέρα στο εσωτερικό της και αυτός διαχέεται έξω από αυτή, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν η φουσαλλίδα διογκώνεται. Επειδή ο ρυθμός διάχυσης είναι ανάλογος της επιφάνειας, περισσότερος αέρας εισέρχεται στη φουσαλλίδα στη μονάδα του χρόνου παρά εξέρχεται, οπότε μετά από έναν πλήρη κύκλο, έχει αυξηθεί η ποσότητα του αέρα μέσα στη φουσαλλίδα. Αυτό το φαινόμενο σε συνδυασμό με τη συσσωμάτωση των φουσαλλίδων οδηγεί στην αύξηση του μεγέθους αυτών σε ένα εύρος τιμών μεγέθους συντονισμού, όπου με έναν ακουστικό κύκλο οι φουσαλλίδες φτάνουν στο μέγιστο δυνατό μέγεθός τους και σπάνε με βία.⁴⁷

1.4.2. Εκχύλιση βασιζόμενη στη σπηλαίωση (cavitation-based extraction, CE)

Η τεχνολογία που βασίζεται στη σπηλαίωση έχει κερδίσει την προσοχή ως μέθοδος περισσότερο πράσινης, γρήγορης και αποτελεσματικής εκχύλισης πολυάριθμων φυσικών προϊόντων, σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές (Soxhlet, διάλυσης, έγχυσης, στερεού-υγρού SLE). Τα πλεονεκτήματά της εκχύλισης που θεμελιώνεται στη σπηλαίωση (CE), σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, είναι η αποτελεσματική ανάμιξη, η λειτουργία σε χαμηλότερη θερμοκρασία, η εκλεκτική εκχύλιση, η

απλότητα και η ευκολία στη χρήση, η δυνατότητά της για εφαρμογή σε μεγάλη (βιομηχανική) κλίμακα σύντομα, η απουσία τοξικών οργανικών διαλυτών και πολλαπλών σταδίων διεργασίας, η μείωση του χρόνου εκχύλισης, της κατανάλωσης ενέργειας και διαλύτη και η επίτευξη καλύτερης απόδοσης εκχύλισης αλλά και καθαρότητας προϊόντος, και από την άποψη της απουσίας υπολειμμάτων τοξικού διαλύτη στο τελικό εκχύλισμα και της μη υποβάθμισης των θερμικά ευαίσθητων βιοδραστικών ουσιών του (π. χ. στην περίπτωση εκχύλισης ελαιόλαδου). Η CE κατηγοριοποιείται σε υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση (UAE), εκχύλιση σπηλαίωσης αρνητικής πίεσης (NPC) και εκχύλιση υδροδυναμικής σπηλαίωσης (HCE). Το βιομηχανικό ενδιαφέρον για βιοδραστικές ενώσεις φυσικής προέλευσης ολοένα και αυξάνεται, και για να καλυφθεί η ζήτησή τους, επιλέγονται οι μέθοδοι εκχύλισης σπηλαίωσης ως η εφικτή λύση. Η UAE είναι η μέθοδος που έχει εφαρμοστεί στο μεγαλύτερο βαθμό για την εκχύλιση φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων βιοδραστικών ενώσεων (π. χ. πολυσακχαριτών, ανθοκυανινών, καροτενοειδών, φλαβονοειδών), αιθερίων ελαίων, λιπιδίων, πρωτεϊνών, χρωστικών, μετάλλων κ.ά. Χαρακτηρίζεται από τη διατήρηση της δομής των μορίων και των ιδιοτήτων τους (όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες), υψηλή αναπαραγωγισιμότητα, αυξημένο βαθμό αυτοματοποίησης, χαμηλό κόστος εγκατάστασης του εξοπλισμού της, ελαττωμένη παραγωγή αποβλήτων και ελάχιστη μόλυνση προς το περιβάλλον, ενώ μπορεί να προστεθεί σε μία ήδη υπάρχουσα διεργασία με ελάχιστες αλλαγές. Επίσης, ανοίγει το δρόμο για τη χρήση πράσινων διαλυτών αντί τοξικών οργανικών. Τα βρώσιμα έλαια, για παράδειγμα, είναι τα επικρατέστερα για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών (π. χ. ηλιέλαιο αντί για εξάνιο στην εκχύλιση καροτενοειδών από καρότα). Η εκχύλιση που υποβοηθείται από υπερήχους (UAE), μαζί με την υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) ή από ένζυμα (EAE) και την εκχύλιση με υποκρίσιμο ή υπερκρίσιμο ρευστό (SFE) αποτελούν μερικές από τις νέες εναλλακτικές περισσότερο πράσινης εκχύλισης που έχουν τεθεί σε εφαρμογή τα τελευταία χρόνια.^{1 2 25 47 48 49}

Η εκχύλιση από ξηρό υλικό παρουσία διαλύτη, είναι μια διεργασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει αφενός τη διαβροχή (ή και βύθιση) του φυτικού υλικού στο διαλύτη για να διευκολυνθεί η διόγκωση και η ενυδάτωσή του, αφετέρου τη μεταφορά μάζας (των διαλυτών συστατικών) από το φυτό στο διαλύτη διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων μέσω διάχυσης, ώσμωσης και έκπλυσης, όταν τα τοιχώματα έχουν σπάσει. Και τα δύο αυτά στάδια είναι «ευαίσθητα» στους υπερήχους. Ο συνολικός μηχανισμός της ενίσχυσης της εκχύλισης φυσικών προϊόντων μέσω της σπηλαίωσης συνοψίζεται ως εξής: ο ρυθμός μεταφοράς μάζας αυξάνεται σε σχέση με την περίπτωση της απλής μηχανικής ανάδευσης και ενισχύεται η διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα, λόγω της θερμοκρασίας και της πίεσης που αναπτύσσονται κατά την κατάρρευση των φυσαλλίδων και συνεπάγονται τη λέπτυνση των μεμβρανών και τη διάρρηξη των κυττάρων. Η διάχυση βελτιώνεται χάρη στην τύρβη σε μικροσκοπικό επίπεδο, στις έντονες δια-σωματιδιακές συγκρούσεις και στην ανακίνηση μικροπορωδών σωματιδίων της μήτρας, λόγω της κατάρρευσης των φυσαλλίδων σπηλαίωσης. Ο διαλύτης διαχέεται ευκολότερα εντός της μήτρας, γιατί οι υπέρηχοι υποβοηθούν τη διόγκωση (αυξάνουν τη δείκτη διόγκωσης) και την ενυδάτωση, προκαλώντας διεύρυνση των πόρων των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αύξηση στη διόγκωση του φυτικού ιστού μπορεί να προξενήσει σε κάποιες περιπτώσεις διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων, η οποία εξυπηρετεί την έκπλυση που προαναφέρθηκε. Δημιουργούνται έντονα δραστικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν και αυτές τη διάρρηξη των κυττάρων. Οι μικροπίδακες και τα κύματα σοκ κατευθύνονται προς την επιφάνεια του φυτικού υλικού και προκαλούν αποσύνθεση αυτού, οπότε η επιφάνεια επαφής του με το διαλύτη αυξάνεται. Αποτελέσματα μελετών έχουν αποδείξει το σχηματισμό μικρορωγμών, μικροκαναλιών και πόρων στην επιφάνεια της μήτρας, που βελτιώνουν τη διαπερατότητά της. Η ενισχυμένη προσβασιμότητα του διαλύτη στην εσωτερική δομή των κυττάρων διευκολύνει την απελευθέρωση των ενώσεων-στόχων και η διάχυσή τους από τη μήτρα στο διαλύτη πολλαπλασιάζεται.^{1 48}

Σε χαμηλότερες συχνότητες (20–100 kHz), κυριαρχούν τα φυσικά φαινόμενα της δόνησης και της φυσικής ανάδευσης, οπότε αυτές βρίσκουν εφαρμογή σε μη καταστρεπτικές αναλυτικές τεχνικές. Σε ενδιάμεσες τιμές συχνότητας (200–500 kHz) επικρατούν χημικά φαινόμενα (σχηματισμός υψηλά δραστικών ριζών εντός των φυσαλλίδων σπηλαίωσης), γιατί ο αριθμός των ενεργών φυσαλλίδων που παράγονται είναι μεγαλύτερος. Σε υψηλότερες συχνότητες (>1 MHz) η σπηλαίωση και τα συνδεδεμένα με αυτή χημικά φαινόμενα δεν είναι τόσο πιθανά, ενώ κυριαρχεί η ακουστική ροή του υγρού μέσου. Όταν χρησιμοποιείται υψηλή συχνότητα υπερήχων, δε σημαίνει ότι η απόδοση της εκχύλισης θα αυξηθεί σημαντικά, αλλά μειώνεται η υποβάθμιση των φυτικών συστατικών. Στην περίπτωση της χαμηλής συχνότητας υπερήχων, η υποβάθμιση καθίσταται πιο σημαντική και ιδιαίτερα όταν εκχυλίζονται αλκαλοειδή. Αυτή η πληροφορία είναι πολύ χρήσιμη στην εκχύλιση θεραπευτικών ενώσεων, όπου η εφαρμογή χαμηλών συχνοτήτων μπορεί να βοηθήσει στην υποβάθμιση τυχόν τοξικών αλκαλοειδών κατά τη διάρκεια της διεργασίας.^{21 47 48}

Οι τεχνικές με υπερήχους έχουν χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις (χαμηλή ένταση) ή για την τροποποίηση τροφίμων (υψηλή ένταση, για να θραύονται τα κυτταρικά τοιχώματα). Οι μικροπίδακες προκαλούν αποφλοιωση της επιφάνειας του στερεού, διάβρωση και καταστροφή των τεμαχιδίων, οπότε η UAE μπορεί να βρει εφαρμογή στην εκχύλιση, στη μικροβιακή και ενζυματική απενεργοποίηση, στη ζύμωση, στην επέμβαση στην κινητική αντιδράσεων, στη γαλακτωματοποίηση και σε φυσικές τροποποιήσεις, π. χ. κρυστάλλωση.^{2 21}

Η UAE μπορεί να επιδρά είτε θετικά είτε αρνητικά στην ποσότητα και την αντιοξειδωτική δράση των βιοδραστικών. Αυτό συμβαίνει λόγω της δυνατότητας της σπηλαίωσης να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, όπως $\text{OH}\cdot$ και επομένως να οδηγεί σε ηχοχημικές αντιδράσεις οξειδωσης και υποβάθμισης. Όπου οι ελεύθερες ρίζες έχουν αρνητικά αποτελέσματα στην ποιότητα του εκχυλίσματος, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τον έλεγχο των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα, για να αποφευχθεί ή έστω να ελαχιστοποιηθεί η οξειδωτική φθορά, μπορεί να γίνει προσθήκη ασκορβικού οξέος.^{21 47}

1.4.3. Ανάγκη χρήσης υπερήχων κατά την εκχύλιση σε τζίντζερ

Όπως έχει προαναφερθεί, οι τζίντζερόλες με διάφορα μήκη πλευρικής αλυσίδας ($n=6$ έως $n=10$), είναι εκείνες που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο τζίντζερ και χαρακτηρίζονται από πολλές ευεργετικές φαρμακολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντικαρκινικής, αναλγητικής και αντιμικροβιακής δράσης. Ωστόσο, οι τζίντζερόλες είναι θερμικά ευαίσθητες και υφίστανται αφυδάτωση σε υψηλές θερμοκρασίες (>60°C). Η απορρόφηση, η απόσταξη, η εκχύλιση Soxhlet και η παραδοσιακή εκχύλιση με αιθανόλη αποτελούν συμβατικές τεχνικές που βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανίες καλλυντικών, φαρμάκων και τροφίμων για την παραλαβή δραστικών προϊόντων από φυτικά υλικά. Όμως, συνήθως αυτές οι μέθοδοι απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες εκχύλισης και τη χρήση πτητικών οργανικών διαλυτών, ενώ ταυτόχρονα είναι χρονοβόρες, ενεργοβόρες και μη εκλεκτικές. Αυτό μπορεί να έχει ως συνέπεια τη μειωμένη απόδοση της δράσης των τζίντζερολών που απομονώνονται, καθώς και την αύξηση ενδεχομένως της επικινδυνότητας της διεργασίας.^{16 25 34}

Η χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας κατά την εκχύλιση (μικροκυμάτων, υπερήχων) οδηγεί σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, εκλεκτικότητα και κινητική της διεργασίας. Ένα μεγάλο πλήθος δημοσιεύσεων ασχολείται με την εκχύλιση διαφόρων ουσιών από φυτική ύλη με τη βοήθεια υπερήχων. Η χρήση υπερήχων για την ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης είναι μία τεχνική που

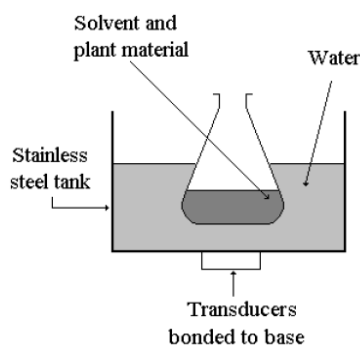
πρωτοεμφανίστηκε τη δεκαετία των '50 σε πειράματα εργαστηριακής κλίμακας. Μία από τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές που πραγματοποιήθηκε την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση από λυκίσκο με υδατικό μέσο (1952), έδειξε ότι η διεργασία αυτή είναι συγκρίσιμη με την εκχύλιση με βρασμό. Αποδείχθηκε ότι με την εφαρμογή αυτού του τύπου εκχύλισης ήταν δυνατή η εξοικονόμηση λυκίσκου κατά 30-40% στην παρασκευή μπύρας.^{22 48}

Η εκχύλιση που βασίζεται στη χρήση υπερήχων είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την εκχύλιση συστατικών φυτών αλλά και για την παραλαβή ουσιών από μικροοργανισμούς, χωρίς την απαίτηση για λειτουργία σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις (η διεργασία αναπτύσσεται σε ατμοσφαιρική πίεση), και έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε αρκετές έρευνες. Ισχυρές εφελκυστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται από κύματα υπερήχων επιτρέπουν τη διείσδυση σε μεγαλύτερο βαθμό του διαλύτη εκχύλισης στα κυτταρικά τοιχώματα του φυτικού υλικού, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η απελευθέρωση των συστατικών τους εντός του διαλύτη. Επιπρόσθετα, η ευκολία στη χρήση και το σχετικά χαμηλό κόστος του απαραίτητου εξοπλισμού (σημαντικά φθηνότερου από τον αυτόν που απαιτείται για την εκχύλιση παρουσία μικροκυμάτων, ΜΑΕ), καθιστούν την εκχύλιση σε τζίντζερ με βάση τους υπερήχους ιδιαίτερα ελκυστική.^{1 16 21 49}

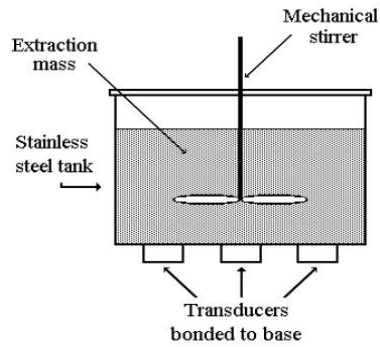
Ειδικότερα, ο συνδυασμός βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους (DES-UAE), φαίνεται να είναι επιτυχημένος, λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας εκχύλισης και του πράσινου χαρακτήρα του. Υπάρχουν πολλές έρευνες πάνω στην εφαρμογή DES-UAE στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες. Η τεχνική αυτή αναμένεται να εφαρμοστεί στο μέλλον στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.⁴¹

1.4.4. Διατάξεις UAE

Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους δεν είναι δύσκολο να λάβει χώρα σε εργαστηριακή κλίμακα, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα απλό υδατόλουτρο. Με τέτοιου είδους εξοπλισμό είναι δυνατή η επίτευξη καλών αποδόσεων εκχύλισης, με άμεση ή έμμεση εκχύλιση. Και στις δύο περιπτώσεις προτιμάται η χρήση ενός μηχανικού αναδευτήρα και η ψύξη του μίγματος εκχύλισης, καθώς η απορρόφηση της ενέργειας των υπερήχων μπορεί να προκαλέσει υπερθέρμανση. Στην έμμεση ακτινοβολία με υπερήχους, μόνο μικρή ποσότητα φυτικής ύλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί, σε αντίθεση με την άμεση, όπου ουσίες μπορούν να εκχυλιστούν και από μεγαλύτερη ποσότητα φυτικής πρώτης ύλης. Το βασικό μειονέκτημα του λουτρού υπερήχων είναι ότι γενικά λειτουργεί σε μία συγκεκριμένη συχνότητα (20 ή 40 kHz). Επίσης, σε τέτοιου είδους συστήματα, τα κύματα δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τα δείγματα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του probe υπερήχων, για το οποίο γίνεται λόγος παρακάτω.^{2 21 48}

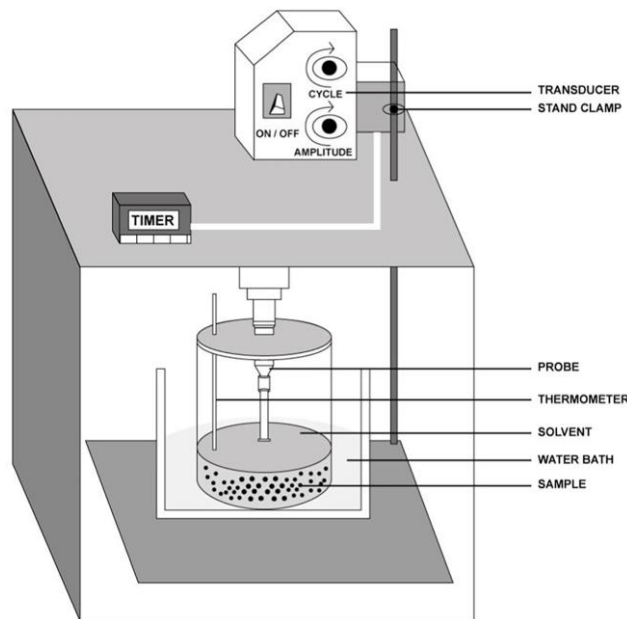


Εικόνα 2: Πειραματική διάταξη για έμμεση εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους με τη χρήση υδατόλουτρου.



Εικόνα 3: Πειραματική διάταξη για άμεση εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους.

Άλλου τύπου συσκευή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση είναι το σύστημα probe. Αυτό απαιτεί την παρουσία ενός γυάλινου δοχείου με αναδευτήρα και ένα μανδύα ψύξης. Το probe βυθίζεται εντός του υγρού μέσου που περιέχει το δείγμα, επομένως οι υπερήχοι διαδίδονται μέσω μίας μικρής επιφάνειας (της άκρης του probe). Υπάρχουν διάφορα σχέδια τέτοιων συστημάτων, με probes διαφορετικών μηκών, διαμέτρων και γεωμετριών, και η επιλογή του κατάλληλου γίνεται με κριτήριο την εφαρμογή και τον όγκο του δείγματος που πρόκειται να υποστεί κατεργασία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η φυτική πρώτη ύλη είναι μαλακή, δεν είναι δυνατή η πραγματοποίηση εκχυλίσεων με αυτού του είδους τη συσκευή και με τη συνήθη αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη 1:10 (για συγκεκριμένα φυτά ο λόγος αυτός είναι 1:5). Αυτό συμβαίνει επειδή η φυτική ύλη είναι πολύ πυκνή και εμποδίζει τη μεταφορά της ενέργειας των υπερήχων. Εάν χρησιμοποιηθεί ο ίδιος όγκος διαλύτη αλλά η φυτική μάζα διαιρεθεί σε δύο τμήματα, η εκχύλιση μπορεί να λάβει χώρα σε δύο στάδια, στο δεύτερο από τα οποία χρησιμοποιείται ο διαλύτης του πρώτου σταδίου, που περιέχει και το εκχύλισμα του πρώτου σταδίου. Στο probe, η άμεση επαφή με το δείγμα καθιστά την ακτινοβολία μέχρι και 100 φορές πιο ισχυρή από ό, τι στο λουτρό υπερήχων. Το σύστημα αυτό εμφανίζει μεγαλύτερη αναπαραγωγισιμότητα από το λουτρό υπερήχων και αμελητέα απώλεια ενέργειας των υπερήχων. Το γεγονός ότι έχει χωρητικότητα μόνο για ένα δείγμα κάθε φορά (σε αντίθεση με το λουτρό), αποτελεί αδυναμία του συστήματος.^{21 48 50}



Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους μέσω συστήματος probe.

Τέλος, σημειώνεται ότι οι υπέρηχοι μπορούν να συνδυαστούν με μικροκύματα (MW), υπερκρίσιμο ρευστό ή ένζυμο για να υποβοηθηθεί η εκχύλιση για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της διεργασίας και να αυξηθεί η απόδοση. Η US-MW χαρακτηρίζεται από έντονη ανάδευση λόγω των υπερήχων και ολική τροποποίηση της επιφάνειας της μήτρας. Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διευκολύνουν την υδρόλυση και την υποβάθμιση των αδιαπέραστων φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και, κατά την εκχύλιση πολυσακχαριτών (αλλά και άλλων φυτοχημικών, φαινολών, φλαβονοειδών, ανθοκυανινών), η ενζυματική αντίδραση με το υπόστρωμα ευνοείται από τους υπερήχους και αυξάνεται η συχνότητα συγκρούσεων ανάμεσα στο ένζυμο και τη μήτρα. Τέλος, ο συνδυασμός υπερήχων και υπερκρίσιμου CO₂ (SFE-US) (χρησιμοποιείται αυτό λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας λειτουργίας, του χαμηλού κόστους του, της μη ευφλεκτότητας και της φιλικότητάς του προς το περιβάλλον), αυξάνει το ρυθμό μεταφοράς μάζας. Επιπλέον, η μεγαλύτερη σταθερότητα του CO₂ λόγω της αδρανούς φύσης του και της χαμηλής θερμοκρασίας της διεργασίας, προκαλεί ελάχιστη καταστροφή στα ζωτικής σημασίας συστατικά του εκχυλίσματος.¹

1.4.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης σε τζίντζερ παρουσία DES και υπερήχων

1.4.5.1. Τύπος χρησιμοποιούμενου DES

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη δεδομένων των ιδιοτήτων (και ειδικότερα των λειτουργικών ομάδων και της ανθεκτικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων) του χρησιμοποιούμενου δείγματος (μήτρας) είναι το πρωταρχικό στάδιο της διεργασίας εκχύλισης. Οι ιδιότητες του διαλύτη παίζουν καθοριστικό ρόλο στην «καθοδήγηση» της ενέργειας σπηλαιώσης στη μήτρα, γιατί τα φαινόμενα της σπηλαιώσης επηρεάζονται από το ιξώδες, την επιφανειακή τάση, την πολικότητα και την τάση ατμών του υγρού μέσου.¹

Η μοριακή δομή ενός DES αναφέρεται στα συστατικά που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη σύνθεσή του. Είτε το σύστημα είναι δυαδικό είτε τριαδικό, τα μόρια που περιέχονται στο DES είναι υπεύθυνα για τις μοναδικές του ιδιότητες. Στις εκχυλίσεις, η πολικότητα του DES είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη διαλυτότητα. Το συμπέρασμα που προκύπτει από τη σάρωση πολλαπλών DES σε συνδυασμό με πολλά δείγματα και ενώσεις-στόχους, δηλώνει ότι η πολικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη πρέπει να βρίσκεται κοντά στην πολικότητα της ουσίας-στόχου («τα όμοια διαλύουν όμοια»). Μεταξύ παρόμοιων DESs, αυτό που έχει πολικότητα που προσεγγίζει περισσότερο εκείνη του στόχου, θα σημειώνει μεγαλύτερη ικανότητα εκχύλισής του. Για το λόγο αυτό, για την επιλογή του κατάλληλου DES για μια εκχύλιση, η ομοιότητα των δύο πολικότητων (συγγένεια) αποτελεί κορυφαία προτεραιότητα για να επιτευχθεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Αυτό μπορεί να είναι δύσκολο δεδομένων των πολλών δυνατών δομών DES, αλλά πιθανώς η μεγάλη αποτελεσματικότητα εξασφαλίζεται μέσω καινούριων δομών με πολικότητα κοντινή σε αυτή καθενός στόχου.^{22 33}

Επιπρόσθετα, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των δοτών και των δεκτών δεσμών υδρογόνου με το στόχο αλλά και με το υπόβαθρο. Οποιοσδήποτε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συστατικά του DES και σε άλλες ουσίες παρούσες στο σύστημα, μπορούν να επέμβουν στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης σε μεγάλο βαθμό και πιθανώς να οδηγήσουν σε επανασχεδιασμό της διεργασίας. Για παράδειγμα, αν σε ένα DES μειωθεί η περιεκτικότητα του ανιόντος χλωρίου που φέρει η χολίνη και η βεταΐνη, στην αλληλεπίδραση του οποίου με το στόχο οφείλεται η εκχυλιστική ικανότητα του DES αυτού, θα ελαττωθεί και η απόδοση

της εκχύλισης. Πιο γενικά, φαίνεται ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του DES στο δότη δεσμών υδρογόνου προκαλεί μείωση του ιξώδους του DES. Ακόμη, αύξηση των υδροξυλομάδων σε οποιοδήποτε συστατικό του DES μπορεί να προωθήσει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, δημιουργώντας ένα σημαντικά σταθερότερο DES.³³

Έχει μελετηθεί, όπως γίνεται κατανοητό από τη βιβλιογραφία, η αποτελεσματικότητα διαφόρων DESs για την ανάκτηση πολυφαινολών. Τα DES που έχουν ως βάση την 1,3-βουτανοδιόλη, για παράδειγμα, παρουσιάζουν υψηλότερη ικανότητα εκχύλισης στο τζίντζερ σε σχέση με άλλα DESs που περιέχουν αλκοόλη. Δεν υπάρχει, ωστόσο, σαφής εξήγηση της καλύτερης συμπεριφοράς κατά την εκχύλιση αυτών των DESs, σε σχέση με άλλα. Επιπλέον, ορισμένα DESs παρουσιάζουν καλύτερη απόδοση κατά την εκχύλιση τζίντζερ σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες (αιθανόλη, νερό), δηλαδή εκχυλίζουν μεγαλύτερη ποσότητα τζίντζερολών, όπως η βεταΐνη-1,3-βουτανοδιόλη (Bet-ButG), η L-καρνιτίνη-τριαιθυλενογλυκόλη (Lcat-TriG) και η L-καρνιτίνη-1,3-βουτανοδιόλη (Lcat-ButG), παρά το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από υψηλότερες τιμές ιξώδους από ό,τι οι συμβατικοί διαλύτες, τόσο τα ίδια όσο και τα υδατικά τους διαλύματα.^{16 23}

Επίσης, αναφέρεται συμπληρωματικά ότι προηγούμενη έρευνα έδειξε πως η αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων τζίντζερ που έχουν προκύψει με τη χρήση NaDESs σακχαρόζης:κιτρικού οξέος, L-προλίνης:γαλακτικού οξέος, L-προλίνης:οξαλικού οξέος, τρεχαλόζης:κιτρικού οξέος, είναι υψηλότερη από εκείνη των εκχυλισμάτων που προκύπτουν από αιθανόλη και χλωροφόρμιο (υπό τις ίδιες συνθήκες και ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία εκχύλισης), σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH. Από όλα τα παραπάνω NaDESs, την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος έδωσε το L-προλίνη:γαλακτικό οξύ (1:1).⁷

Η παρατήρηση της μικροδομής της πούδρας του τζίντζερ πριν και μετά την εκχύλιση με SEM (ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης) αποτελεί έναν τρόπο εκτίμησης της εκχυλιστικής ικανότητας του χρησιμοποιηθέντος DES. Πριν την εκχύλιση, οι ιστοί του ριζώματος εμφανίζουν τραχιά επιφάνεια με πολλές «νιφάδες». Εάν μετά από αυτή παρατηρούνται θραύσματα στις άκρες των κόκκων και καθόλου νιφάδες, αυτό σημαίνει ότι το εκάστοτε διάλυμα DES (ή οργανικός διαλύτης) καταστρέφει τα κυτταρικά τοιχώματα και διαλύει επίσης τις νιφάδες αυτές κατά την εκχύλιση. Μία ένδειξη ότι το νερό δεν είναι αποδοτικό εκχυλιστικό μέσο για τις τζίντζερόλες του τζίντζερ, ακόμα και παρουσία υπερήχων, είναι το γεγονός ότι η μικροσκοπική δομή της σκόνης είναι παρόμοια πριν και μετά την εκχύλιση, σε αντίθεση με την αιθανόλη, που έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Μετά την εκχύλιση με αιθανόλη ή μετά από Soxhlet εκχύλιση, η επιφάνεια των κυτταρικών τοιχωμάτων του δείγματος είναι τραχιά και ζαρωμένη, ενώ το σχήμα των κυττάρων παραμένει άθικτο και ακανόνιστο. Όταν το δείγμα εκτίθεται σε υπερήχους, στα κυτταρικά τοιχώματα εμφανίζονται οδοντωτές άκρες και παρατηρούνται θραύσματα κυττάρων πάνω στην επιφάνειά τους, που αποδεικνύει ότι τα κυτταρικά τοιχώματα δέχονται σκληρές επιθέσεις από τα αποτελέσματα της σπηλαίωσης των υπερήχων. Ακόμα μεγαλύτερη καταστροφή των τοιχωμάτων παρατηρείται όταν πραγματοποιείται ILUAE, που σημαίνει ότι το ιοντικό υγρό ενισχύει την ικανότητα θραύσης των υπερήχων, άρα το αποτέλεσμα της εκχύλισης προκύπτει από τη συνεργιστική επίδραση των δύο.¹⁶

25

1.4.5.2. Τύπος και σχεδιασμός της μονάδας εκχύλισης με υπερήχους

Η UAE μπορεί να λάβει χώρα είτε σε λουτρό (bath) είτε σε σύστημα τύπου probe, με το λουτρό να αποτελεί τον συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο τύπο μονάδας. Η έλλειψη ομοιομορφίας στην κατανομή της ενέργειας των υπερήχων στο λουτρό περιορίζει την αναπαραγωγιμότητα της UAE,

ενώ το probe εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα, με κυριότερη την εντονότερη σπηλαιώση, που μπορεί να «εστιάσει» σε μια συγκεκριμένη ζώνη του δείγματος για καλύτερη απόδοση. Η μονάδα τύπου probe έχει αναφερθεί ως ευνοϊκότερη για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων σε έρευνες εργαστηριακού επιπέδου. Η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση αντιοξειδωτικών από πληθώρα φυτών μέσω probe επιδεικνύει μεγαλύτερες αποδόσεις και υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων σε σχέση με το σύστημα λουτρού. Αυτό στο οποίο πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή είναι η εκχύλιση θερμοευαίσθητων υλικών, καθώς οι υπερήχοι προερχόμενοι από probe μπορούν να προκαλέσουν υποβάθμιση των ενώσεων λόγω της ισχυρής σπηλαιώσης.¹

1.4.5.3. Ιξώδες του DES

Το συνήθως υψηλό ιξώδες των DESs και των NaDESs είναι το κυριότερο μειονέκτημα που μπορεί να περιορίσει τη χρήση τους ως διαλυτών εκχύλισης, διότι παρακωλύει τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα εκχύλισης, ελαττώνοντας έτσι το ρυθμό μεταφοράς μάζας στο σύστημα και συνεπώς την ταχύτητα της διεργασίας. Επομένως, όπως ειπώθηκε παραπάνω, ο τύπος και το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του DES, μπορούν να επιδράσουν στο ιξώδες αυτού και, κατά συνέπεια, στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Η αποδεκτή τιμή ιξώδους ενός υγρού για βιομηχανική χρήση θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό χαμηλότερη, και έχουν προταθεί τιμές μικρότερες από 100 mPa*s. Μια πιθανή προσέγγιση αντιμετώπισης του προβλήματος του υψηλού ιξώδους, είναι η εκμετάλλευση του τεράστιου αριθμού των πιθανών συνδυασμών των φυσικών ενώσεων που μπορούν να παράγουν NaDESs, ώστε να σχεδιαστούν διαλύτες χαμηλού ιξώδους. Πρόσφατα έχει προταθεί η ιδέα του σχηματισμού λιγότερο πολικών NaDESs με ελαττωμένο ιξώδες, με την ανάμιξη λιπαρών οξέων με διαφορετικά μήκη αλκυλικής αλυσίδας, ή με το συνδυασμό μενθόλης με διάφορα οργανικά οξέα.^{16 33}

Εάν δεν είναι εφικτή η χρήση DES με χαμηλότερο ιξώδες, η αύξηση της θερμοκρασίας στη διεργασία εκχύλισης μπορεί να ελαττώσει το ιξώδες, όμως η επιλογή αυτή δεν είναι πάντοτε η ιδανική, γιατί καταναλώνει πολλή ενέργεια και ορισμένα θερμοευαίσθητα φυτοχημικά ενδεχομένως δεν αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες. Ένας απλός τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού είναι η προσθήκη ενός συνδιαλύτη στο μέσο εκχύλισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός είναι το νερό, που διατηρεί τον πράσινο χαρακτήρα της διεργασίας, ωστόσο και οργανικοί διαλύτες όπως μεθανόλη έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Το χαμηλό ιξώδες των υδατικών διαλυμάτων DES σε σχέση με τα DESs αυτούσια, επιφέρει υψηλή διάχυση και επομένως βελτιώνει την απόδοση της εκχύλισης. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε νερό του μίγματος DES-νερού ή NaDES-νερού (βλ. §1.4.5.4.). Για το λόγο αυτό, η προστιθέμενη σε ένα DES ποσότητα νερού είναι ένας παράγοντας που καλό είναι να παρακολουθείται προσεκτικά όταν το DES (ή NaDES) βρίσκει εφαρμογή ως διαλύτης εκχύλισης. Ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το ιξώδες αυξάνεται σημαντικά όταν είναι δυνατός ο σχηματισμός περισσότερων δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του DES.^{24 33}

1.4.5.4. Αναλογία DES/νερού στο διαλύτη εκχύλισης

Νερό μπορεί να βρεθεί σε ένα σύστημα DES αυτούσια (κατά τη σύνθεση, ή να έχει παραμείνει μες στο δοχείο) ή από πρόθεση, λόγω της συν-διάλυσης για τη δημιουργία υδατικού συστήματος. Η χρήση ενός DES ως εκχυλιστικού μέσου απουσία νερού μπορεί να αυξήσει το κόστος εκχύλισης, καθιστώντας τη διεργασία μη αποδοτική οικονομικά, είτε σε εργαστηριακή είτε σε βιομηχανική κλίμακα. Η αραιώση του DES με νερό σε συγκεκριμένη αναλογία (πάνω από 10-15%v/v) μπορεί να

αυξήσει τη διάχυση στο σύστημα, καθώς το ιξώδες του DES μειώνεται σημαντικά. Όμως, για τιμές της αναλογίας αυτής μεγαλύτερες από 40-75%v/v, η παρουσία μεγάλης ποσότητας νερού στο DES έχει αρνητικό αντίκτυπο στην εκχύλιση, γιατί ελαττώνεται η διαλυτότητα των συστατικών του τζίντζερ στο εκχυλιστικό μέσο λόγω του περιορισμού των αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του DES και των ενώσεων-στόχων από το νερό και, επιπλέον, σταδιακά αποδυναμώνονται και τελικά διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συστατικών στο ίδιο το σύστημα του DES και καταστρέφεται ο «σκελετός» του, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αραίωση των DESs μπορεί να επιδράσει στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (κυρίως στο ιξώδες) και στις εφαρμογές τους. Η τιμή-κατώφλι της κατ' όγκο περιεκτικότητας σε νερό ποικίλει γενικά από NaDES σε NaDES και, για τιμές μεγαλύτερες από αυτή, το μίγμα του DES αποτελείται από τα συστατικά του μη συνδεδεμένα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, και ειδικά με τις μελέτες στις οποίες η περιεκτικότητα σε νερό αποτελεί τμήμα της βελτιστοποίησης, ποσοστό σε νερό κοντά στο 20% διατηρεί την ισορροπία ανάμεσα στη δημιουργία ενός συστήματος εκχύλισης με ρευστό και στη διατήρηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου του χρησιμοποιούμενου DES. Αυτό βέβαια δε σημαίνει ότι υψηλότερες περιεκτικότητες σε νερό είναι ανεπιθύμητες ή αναποτελεσματικές, καθώς κάθε εκχύλιση, που διέπεται από ένα μεγάλο αριθμό μεταβλητών, μπορεί να εκμεταλλευτεί τα υψηλά ή χαμηλά ποσοστά νερού.^{16 23 33 43 44}

1.4.5.5. pH του χρησιμοποιούμενου DES

Η τιμή του pH του DES είναι ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και που, σαφώς, μπορεί να αλλάξει με την αραίωση του DES με νερό, όπως και το ιξώδες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι απαραίτητη η αραίωση του DES, αφενός γιατί δεν είναι δυνατή η μέτρηση του pH όταν το ιξώδες είναι πολύ υψηλό (>450 mPa*s), αφετέρου γιατί επιδιώκεται το pH να κυμαίνεται στο εύρος 5-9, και αυτό είναι εφικτό μόνο με αραίωση (για παράδειγμα, DES που έχουν ως βάση την καρνιτίνη έχουν pH κοντά στο 10). Είναι επιθυμητό το pH να είναι κοντά σε αυτό ουδέτερου διαλύματος, γιατί έτσι περιορίζεται η επίδραση όξινων ή βασικών συστατικών κατά την εκχύλιση. Επιπλέον, τα ουδέτερα διαλύματα με δραστικά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών απευθείας.¹⁶

Τα επίπεδα pH του συστήματος μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις να επιβάλλουν τη μορφή της ένωσης στόχου και τελικά να επηρεάσουν τη διαλυτότητά της στο DES. Μερικά συστατικά των DESs επίσης μπορεί να επηρεαστούν από το pH, να αλλάξει η πολικότητά τους ή η γενική τους συμπεριφορά, με θετικά ή ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η μορφή του στόχου (ως αποτέλεσμα του pH) μπορεί να αλλάξει ολοκληρωτικά το σχεδιασμό της εκχύλισης, δεδομένου ότι μια ουσία με εντελώς διαφορετική πολικότητα θα πρέπει να εκχυλιστεί με ένα διαφορετικό DES από αυτό που είχε επιλεγεί αρχικά.³³

1.4.5.6. Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη

Η αύξηση του όγκου του χρησιμοποιούμενου διαλύτη για σταθερή μάζα του στερεού υλικού, βελτιώνει την απόδοση των τζίντζερολών μέχρι ένα σημείο και από εκεί και έπειτα αυτή διατηρείται σταθερή. Επομένως, ο κύριος λόγος που η αναλογία αυτή δεν μπορεί να αγνοηθεί, σχετίζεται με το κόστος και τη λειτουργικότητα της διεργασίας, αφού η χρήση ποσότητας διαλύτη μεγαλύτερης από μία βέλτιστη τιμή λόγου στερεού/υγρό είναι περιττή. Εκτός αυτού, συνήθως, χαμηλή αναλογία στερεής πρώτης ύλης/διαλύτη επιτάσσει είτε περισσότερο διαλύτη είτε λιγότερη

φυτική ύλη, οπότε δημιουργείται ένα αραιό εκχύλισμα, που απαιτεί την παρουσία ενός σταδίου συμπύκνωσής του, η οποία όμως αυξάνει το ρίσκο της υποβάθμισης των ενώσεων που έχουν εκχυλισθεί. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός του βέλτιστου λόγου τζιντζερ/διαλύτη, για να επιτυγχάνεται η υψηλότερη δυνατή απόδοση εκχύλισης.^{25 37}

Ο εμβαπτισμός μιας μικροσκοπικής ποσότητας δείγματος στο διαλύτη σημαίνει ότι η εκχύλιση θα ήταν αναποτελεσματική σε μεγαλύτερη κλίμακα, γιατί μόνο αυτή η μικρή ποσότητα δείγματος μπορεί να υποστεί κατεργασία σε δεδομένο χρόνο. Από την άλλη, ο «αποπνιγμός» του διαλύτη με μεγάλη ποσότητα στερεού δείγματος μπορεί να επιβραδύνει τη διασπορά του διαλύτη γύρω από το δείγμα, να μειώνει τελικά την επιφάνεια επαφής των δύο και να ελαττώνει την απόδοση του συστήματος. Πολλά βιβλιογραφικά παραδείγματα, μετά από στατιστική ανάλυση ή αναφορά σε προηγούμενες επιτυχείς εργασίες, συγκλίνουν στο ότι η τιμή 1:10 του λόγου στερεού δείγματος προς το διαλύτη εξισορροπεί την ποσότητα δείγματος με την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.³³

1.4.5.7. Θερμοκρασία κατά την εκχύλιση

Αλλαγή στη θερμοκρασία του διαλύματος κατά τη διάρκεια της σπηλαιώσης επηρεάζει την έντασή της, διότι προκαλεί διακυμάνσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες του υγρού μέσου. Αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύτη συνδέεται με λιγότερο έντονη κατάρρευση φυσαλλίδων. Γενικά, υψηλές θερμοκρασίες εκχύλισης αυξάνουν την κινητικότητα των μορίων, διευκολύνουν τη διάσπαση των δεσμών, την καταστροφή της δομής και τελικά τη διάρρηξη των φυτικών κυττάρων του δείγματος, ελαττώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του διαλύτη εκχύλισης (ειδικά για τα DESs το φαινόμενο αυτό είναι καθοριστικό), αυξάνουν τη διάχυση του διαλύτη στα κύτταρα, την εκρόφιση των ενώσεων-στόχων από αυτά και τη διαλυτότητά τους στο εκχυλιστικό μέσο, και συνεπώς βελτιώνουν την απόδοση της διεργασίας και την επιταχύνουν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το επιθυμητό εύρος θερμοκρασιών για την εκχύλιση είναι από θερμοκρασία δωματίου (25°C) έως τους 60°C. Υψηλότερες θερμοκρασίες, εκτός από το ότι απαιτούν περισσότερη ενέργεια για να διατηρηθούν (ξεφεύγοντας από τον πράσινο χαρακτήρα της διεργασίας), μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο είτε το DES είτε την ουσία-στόχο, γιατί πολλά από τα φυσικά συστατικά που συναντώνται είναι θερμικά ευαίσθητα. Η απόδοση της εκχύλισης των τζιντζερολών, για παράδειγμα, αυξάνεται βαθμιαία με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ένα σημείο και έπειτα μειώνεται σταδιακά. Η τοπική θερμοκρασία μπορεί να φτάσει και τους 5000K σε ένα λουτρό υπερήχων σε θερμοκρασία δωματίου. Η μείωση της απόδοσης της εκχύλισης τζιντζερολών μπορεί να αποδοθεί στην αποσύνθεση των τζιντζερολών λόγω της τοπικής υπερθέρμανσης κατά την παρατεταμένη χρήση των υπερήχων. Οι τζιντζερόλες συνήθως ξεκινούν να υποβαθμίζονται σημαντικά και να αποσυντίθενται όταν η θερμοκρασία κατά την εκχύλιση φτάσει τους 60°C, με αποτέλεσμα να χάνουν ως ένα βαθμό την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Πολύ υψηλές θερμοκρασίες έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν την απόδοση σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω ελάττωσης της διαδραστικότητας μεταξύ της ένωσης-στόχου και του διαλύτη που έχει επιλεγεί, ανεξάρτητα από τη θερμική αντοχή του καθενός (που όμως ακόμα αποτελεί περιοριστικό παράγοντα). Τελικά, τα κυριότερα μειονεκτήματα που συνδέονται με την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών εκχύλισης είναι η μειωμένη εκλεκτικότητα της διεργασίας, η υποβάθμιση των εκχυλιζόμενων ενώσεων και η πραγματοποίηση άλλων χημικών αντιδράσεων στη μήτρα του δείγματος. Σημειώνεται ότι η αύξηση λόγω σπηλαιώσης της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση πρέπει να ελέγχεται με εξωτερικές μεθόδους ψύξης, όπως η κυκλοφορία ψυχρού νερού.^{1 9 16 21 24 25 33 37}

1.4.5.8. Χρόνος εκχύλισης

Σε όλους τους τύπους εκχύλισης, μεγάλοι χρόνοι συνεπάγονται αυξημένα κόστη, αλλά με συντομότερες εκχυλίσεις ελλοχεύει ο κίνδυνος της παραμονής στο δείγμα σημαντικών ποσοτήτων των ουσιών-στόχων, οπότε η διαδικασία καθίσταται μη αποτελεσματική. Φυσικά, ο τύπος εκχύλισης σχετίζεται άμεσα με το χρόνο, και πιο συγκεκριμένα οι μέθοδοι που υποβοηθούνται ενεργειακά (με θέρμανση, υπερήχους, μικροκύματα) απαιτούν μικρότερο χρόνο εκχύλισης αλλά προφανώς περισσότερη ενέργεια για τη διεξαγωγή τους. Συνολικά, πάντως, φαίνεται ότι η χρήση DES αναμφίβολα επιτυγχάνει μικρούς χρόνους εκχύλισης για όλες τις μεθόδους που έχουν μελετηθεί.³³

Γενικά, ο χρόνος εκχύλισης φαίνεται να επηρεάζει διαφορετικά την αποτελεσματικότητα της διεργασίας, ανάλογα με τη χημική φύση των διαφόρων φυτοχημικών που εκχυλίζονται. Η απόδοση της εκχύλισης των τζιντζερολών αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου παραμονής στο λουτρό των υπερήχων, γιατί επιτυγχάνεται εκτενέστερη επαφή των βιοδραστικών ενώσεων με το διαλύτη και καλύτερη διάχυση αυτών, αλλά από ένα σημείο και έπειτα η απόδοση παραμένει σχεδόν σταθερή, γιατί η διάλυση αυτών στο εκχυλιστικό μέσο έχει επιτευχθεί πλήρως. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί ελάττωση της απόδοσης της εκχύλισης των τζιντζερολών από μία χρονική στιγμή και μετά, σημαίνει ότι έχουν υποστεί υποβάθμιση, όπως συμβαίνει όταν η θερμοκρασία της διεργασίας είναι υψηλή. Από την άλλη, υψηλές τιμές χρόνου εκχύλισης με υπερήχους παρέχουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας στο σύστημα και αυτό οδηγεί σε χημικές τροποποιήσεις ορισμένων μορίων, για παράδειγμα σε υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών των φλαβονοειδών, οπότε παράγονται αγλυκόνες φλαβονοειδών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, που εκφράζεται μέσω της χαμηλότερης τιμής IC₅₀.^{16 24 37 41 49}

1.4.5.9. Ισχύς και συχνότητα υπερήχων

Τα φυσικά φαινόμενα που αναπτύσσονται λόγω των υπερήχων μπορούν να βελτιώσουν τη διεισδυτικότητα του διαλύτη και τη μεταφορά μάζας, οδηγώντας σε διάρρηξη των κυττάρων και απελευθέρωση των ενώσεων-στόχων. Οι χαμηλές τιμές ισχύος πιθανώς δημιουργούν την ανάγκη για μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, ώστε να ενισχυθεί η κινητικότητα των μορίων και να βελτιωθεί η απόδοση της εκχύλισης. Έτσι, η απόδοση της εκχύλισης τζιντζερολών αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της ισχύος (και της έντασης της σπηλαίωσης), φτάνει μέχρι ένα ανώτατο σημείο και στη συνέχεια ελαττώνεται σταδιακά. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η υψηλή ισχύς προκαλεί μεν εντονότερα φυσικά φαινόμενα και γρηγορότερη εξισορρόπηση, αλλά γεννά περισσότερη θερμότητα που μπορεί να επιφέρει τον ανεπιθύμητο μετασχηματισμό των τζιντζερολών, να καταστρέψει τα ζωτικής σημασίας συστατικά της φυτικής πρώτης ύλης και να την «κάψει». Άλλωστε, η υπερβολικά υψηλή ισχύς δεν είναι συμφέρουσα, γιατί σημαίνει μεγάλη ενεργειακή κατανάλωση.^{9 24 25 41 49}

Ο λόγος της ισχύος των υπερήχων προς το εμβαδόν της επιφάνειας του μορφοτροπέα καλείται ένταση των υπερήχων. Με την αύξηση της έντασης αυξάνεται ο ρυθμός δημιουργίας ενεργών φουσαλλίδων, όπως και το μέγεθος των φουσαλλίδων, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες κατάρρευσης, λόγω της μετατροπής περισσότερης διαθέσιμης δυναμικής ενέργειας σε θερμότητα. Επίσης, αύξηση της έντασης επιφέρει ενίσχυση της ικανότητας ανάμιξης του διαλύματος, λόγω της τύρβης που παράγεται από τα φαινόμενα σπηλαίωσης. Με την αύξηση της ισχύος, η κατάρρευση των φουσαλλίδων γίνεται πιο βίαια. Αύξηση του πλάτους των κυμάτων

προκαλεί αύξηση του αριθμού των κύκλων συμπίεσης και αραίωσης των υπερηχητικών κυμάτων και, επομένως, ενισχύει την παραλαβή ενώσεων. Η ακτινοβολία μεγαλύτερου πλάτους μπορεί να αποτελεί επιλογή για διαλύτες μεγάλου ιξώδους, αλλά η βελτιστοποίηση της έντασης είναι απαραίτητη για το δεδομένο τύπο μήτρας, για να αποφευχθεί η υποβάθμιση των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Η βέλτιστη τιμή ισχύος για αποτελεσματική εκχύλιση εξαρτάται από τη διαμόρφωση της μονάδας και την πρώτη ύλη. Τα φαινόμενα σπηλαίωσης ενδέχεται να περιοριστούν οριακά πάνω από τη βέλτιστη ισχύ (ή ένταση), λόγω της παραγωγής περίσσειας θερμότητας, που οδηγεί σε λιγότερο βίαιη κατάρρευση φυσαλλίδων.^{1,21}

Το τριχοειδές φαινόμενο λόγω των υπερήχων εξαρτάται από τη συχνότητα, καθώς οι δύσκαμπτες δομές απαιτούν υψηλή συχνότητα (≤ 500 kHz), ενώ οι χαμηλές συχνότητες (20-40 kHz) είναι κατάλληλες για εύκαμπτα υλικά (φυτική ύλη, άγλη κλπ). Ο μηχανισμός πίσω από το τριχοειδές φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στην περισταλτική δράση των κυμάτων υπερήχων, που οδηγεί σε διαστολή και συστολή των τριχοειδών καναλιών. Όμως, στην περίπτωση υψηλής έντασης και χαμηλής συχνότητας υπερήχων, το τριχοειδές φαινόμενο οφείλεται περισσότερο στην παλινδρομική άντληση στα ανοιχτά άκρα των τριχοειδών, παρά στην περισταλτική δράση. Οι υπέρηχοι χαμηλής συχνότητας είναι γνωστό ότι δημιουργούν ακραίες συνθήκες σπηλαίωσης (καλύτερο ηχοφυσικό αποτέλεσμα) σε σχέση με την υψηλή συχνότητα, οπότε επιφέρουν υψηλότερη απόδοση υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Η βέλτιστη συχνότητα εξαρτάται κυρίως από το υπόστρωμα.¹

1.4.5.10. Λειτουργία των DESs ως πρόσθετων, ή πρόσθετα στα DESs

Πρόσθετα που συνυπάρχουν με τα DESs στις εκχυλίσεις περιλαμβάνουν συστατικά παρόντα στα DESs, τα οποία σχηματίζουν τριαδικά συστήματα που στοχεύουν στην απομόνωση διαφόρων ενώσεων και στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας μιας απλής εκχύλισης. Τίποτα δεν εγγυάται, ωστόσο, ότι ένα προσεκτικά σχεδιασμένο και συντεθειμένο τριαδικό σύστημα DES θα αποβεί πιο αποτελεσματικό από ένα απλούστερο δυαδικό. Ανάλογα την ένωση-στόχο, ένα τριαδικό σύστημα μπορεί να είναι καλή ή κακή επιλογή. Και άλλου είδους πρόσθετα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να στηρίξουν την εκχύλιση μιας ουσίας ή κάποια άλλη δράση, όμως, παρόμοια με ό, τι συμβαίνει στα τριαδικά συστήματα, οποιαδήποτε προσθήκη μπορεί να προωθήσει ή να εμποδίσει μια εκχύλιση, πάλι ανάλογα με το στόχο. Για παράδειγμα, η προσθήκη β-κυκλοδεξτρίνης αλλάζει επιλεκτικά την εκχυλισιμότητα φλαβονοειδών, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο DES, ευνοώντας το ένα και χειροτερεύοντας το άλλο.³³

1.4.5.11. Ξήρανση πρώτης ύλης, βαθμός άλεσής της και άλλοι παράγοντες

Ωστόσο, χρειάζεται να αναφερθεί ότι η απόδοση της εκχύλισης των τζιντζερολών δεν εξαρτάται μόνο από τη μέθοδο εκχύλισης και τις συνθήκες της, αλλά και από τις περιοχές στις οποίες φύεται το τζιντζερ, την ποικιλία του, το κλίμα, τις συνθήκες καλλιέργειάς του και τις διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, πολλές φορές δεδομένα από διαφορετικές βιβλιογραφικές αναφορές δεν είναι κατάλληλα για τη σύγκριση. Γενικά, το χημικό περιεχόμενο των φυτών εξαρτάται άμεσα και από την περίοδο συγκομιδής. Για θεραπευτικά και αρωματικά φυτά που προορίζονται για βιομηχανικές διεργασίες, τόσο ο χρόνος συγκομιδής όσο και οι μέθοδοι αποθήκευσης και διατήρησης είναι ζωτικής σημασίας και μερικές φορές μπορεί να χρειάζεται μία συγκεκριμένη τεχνική για το σκοπό αυτό.^{25,37,48}

Η ξήρανση των φυσικών προϊόντων είναι εξέχουσας σημασίας, γιατί η υγρασία επιτρέπει και ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών και τις ενζυμικές αντιδράσεις. Επιπλέον, η θερμοκρασία στην οποία ξηραίνεται το τζίντζερ είναι καθοριστική. Η αύξηση της θερμοκρασίας ξήρανσης του ριζώματος επιφέρει ελάττωση της εκχυλιζόμενης ποσότητας των κίτρινων φλαβονοειδών και υποβάθμιση των ανθοκυανινών. Η διαλυτότητα των φαινολικών ενώσεων, επίσης, ποικίλει ανάλογα με την πολικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη ως εκχυλιστικού μέσου, το βαθμό πολυμερισμού των φαινολών και την αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά του δείγματος τζίντζερ.³

Όσο ελαττώνεται το μέγεθος των σωματιδίων της φυτικής πρώτης ύλης, τόσο αυξάνεται η ειδική επιφάνεια του στερεού και ο αριθμός των κυττάρων που εκτίθενται άμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στη σπηλαίωση που προκαλείται από τους υπερήχους. Συνεπώς, η άλεση του φυτικού υλικού πριν την εκχύλιση είναι σημαντική για την απόδοση της διεργασίας, ωστόσο είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι η έντονη ακτινοβολή με υπερήχους μπορεί από μόνη της να συντελέσει στην άλεση της φυτικής μήτρας. Τα επιφανειακά φυτικά κύτταρα, ειδικά, που είναι άμεσα εκτεθειμένα στο διαλύτη και τη σπηλαίωση, καταστρέφονται εύκολα.^{30 48}

1.4.6. Μειονεκτήματα της UAE

Παρότι η UAE μπορεί να φέρει την επανάσταση στις τεχνολογίες εκχύλισης, προκαλεί έντονους προβληματισμούς σχετικά με την υποβάθμιση του εκχυλίσματος και την αποτελεσματικότητά της ως τεχνικής κατά την εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα. Τα μειονεκτήματα της UAE είναι η απόσβεση των υπερηχητικών κυμάτων για πολύ συμπυκνωμένη διεσπαρμένη φάση, η έλλειψη ομοιομορφίας για τα διεσπαρμένα υλικά του εκχυλίσματος (στερεή πρώτη ύλη), λόγω της ελάττωσης της μετάδοσης των υπερηχητικών κυμάτων μακριά από το γειτονικό περιβάλλον της γεννήτριας και η μεγαλύτερη κατανάλωση ενέργειας σε σχέση με την NPC. Αναγκαία για την εγκατάσταση της UAE σε μεγάλη κλίμακα είναι η μελέτη των παρακάτω παραγόντων: η χρήση μονάδας πολλαπλών συχνοτήτων και μοροτροπέων, η ανάπτυξη μονάδας συνεχούς ροής κυττάρων μαζί με περιοδική ενεργοποίηση των μοροτροπέων υπερήχων και η ελαχιστοποίηση της διάβρωσης του υλικού των μοροτροπέων, με τη χρήση κατάλληλων υλικών κατασκευής.¹

1.5. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

1.5.1. Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)

Σε ένα σύστημα όλοι οι παράγοντες της Ενότητας 1.4.5. αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής αντικατοπτρίζεται στη βιολογική δράση των εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η ανάλυση της ταυτόχρονης επίδρασης των παραμέτρων αυτών στην απόκριση.²¹

Η χρήση πειραματικού σχεδιασμού για την αξιολόγηση και τη βελτιστοποίηση διεργασιών εκχύλισης καθιστά δυνατή τη λήψη χρήσιμων πληροφοριών μέσα από μικρότερο αριθμό πειραμάτων, και κατά συνέπεια την ελαχιστοποίηση του κόστους και την επίτευξη των επιθυμητών αποκρίσεων.⁵¹

Η Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) είναι μία γρήγορη, αξιόπιστη και αποτελεσματική στατιστική τεχνική για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ παραγόντων εντός ενός κατάλληλου εύρους τιμών και πιο συγκεκριμένα για τη διαμόρφωση ενός εμπειρικού μοντέλου που θα ποσοτικοποιεί τη συσχέτιση ανάμεσα στις σημαντικότερες συνθήκες (μεταβλητές) της εκχύλισης και τα αποτελέσματά της. Μάλιστα, τα γραφήματα επιφάνειας απόκρισης βοηθούν στην οπτικοποίηση των συσχετίσεων ανάμεσα στις πειραματικές συνθήκες και τις μελετούμενες αποκρίσεις. Ειδικότερα τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επιφάνειας απόκρισης αναπαριστούν τη σχέση ανάμεσα σε μία απόκριση και δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, όταν οι υπόλοιπες διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα. Η RSM μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για μία ή περισσότερες αποκρίσεις οι οποίες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες. Ελαττώνει τον αριθμό των πειραμάτων, εξοικονομεί χρόνο, ενέργεια και πρώτες ύλες και βελτιώνει την ποιότητα των πληροφοριών που λαμβάνονται από τα αποτελέσματα, σε σχέση με τη μελέτη ξεχωριστά κάθε μεταβλητής.^{16 24 49 51 52}

Όταν συνδυάζεται με τη συνάρτηση επιθυμητότητας, που αποτελεί έναν αλγόριθμο για βελτιστοποίηση με πολλές μεταβλητές, η RSM μπορεί να βελτιστοποιήσει αποτελεσματικά προβλήματα πολλαπλών αποκρίσεων με πολλαπλές μεταβλητές. Χρησιμοποιείται ευρέως για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης ελαίων, φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων, ανθοκυανινών, διαλυτών σακχάρων, πρωτεϊνών κ. ά. από διάφορες φυτικές ύλες. Έτσι, οι συνθήκες υπό τις οποίες λαμβάνει χώρα η εκχύλιση, π. χ. η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου DES, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία κατά την εκχύλιση, μπορούν να βελτιστοποιηθούν μέσω της RSM, για να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική πορεία για την εκχύλιση των ενεργών συστατικών, δηλαδή π.χ. η απόδοση της εκχύλισης να είναι υψηλή και να παραλαμβάνονται εκχυλίσματα με την καλύτερη δυνατή αντιοξειδωτική δράση.^{16 53}

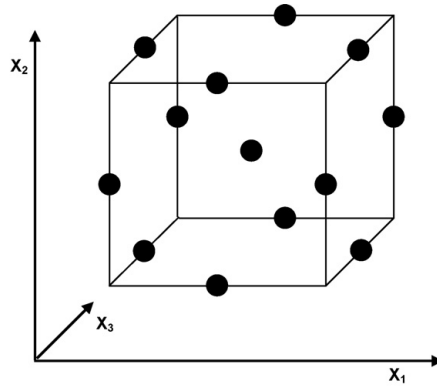
1.5.2. Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) είναι μία από τις πιο διαδεδομένες ερευνητικές μεθόδους που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης από φυτικά υλικά. Είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για πειράματα πολλαπλών παραγόντων, που δίνει ένα μοντέλο πρόβλεψης.^{41 49 53 54}

Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken βασίζεται σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό σε τρία επίπεδα (χαμηλό, ενδιάμεσο και υψηλό). Αναπαρίσταται από ένα σύνολο σημείων τα οποία είναι τοποθετημένα στα μέσα των ακμών ενός κύβου συν το κεντρικό σημείο, το οποίο επαναλαμβάνεται. Ο σχεδιασμός αυτός δεν περιλαμβάνει σημεία στις κορυφές του κύβου και για αυτό είναι πολύ χρήσιμος σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν φυσικοί περιορισμοί των ανώτατων και κατώτατων τιμών των μεταβλητών, καθιστώντας αδύνατη την παρατήρηση αυτών των σημείων. Ο αριθμός των πειραμάτων N που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σχεδιασμού αυτού, βρίσκεται από τη σχέση: $N=2k(k-1)+C_0$, όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_0 το πλήθος των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου. Οι παράγοντες κωδικοποιούνται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Κωδικοποιημένη τιμή} = \frac{\text{πραγματική τιμή} - 0,5 * (\text{υψηλή τιμή} + \text{χαμηλή τιμή})}{0,5 * (\text{υψηλή τιμή} - \text{χαμηλή τιμή})}$$

και προκύπτουν για κάθε παράγοντα τρεις τιμές, με τις δύο ακραίες να ισαπέχουν από την κεντρική.^{51 52 55}



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πρώτες ύλες, (α) με τη χρήση φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) ως εκχυλιστικού και αποθηκευτικού για τις βιοδραστικές ενώσεις μέσου και (β) με τη χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted Extraction, UAE), που αποτελεί πράσινη τεχνική υψηλής ενέργειας. Ως πρώτη ύλη για τη μελέτη επιλέχθηκε το τζίντζερ, δεδομένου ότι η εκχύλιση των βιοενεργών συστατικών του με πράσινες μεθόδους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Για τη βελτιστοποίηση και την εύρεση των σημαντικών πειραματικών παραμέτρων της διεργασίας, διενεργήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken με αποκρίσεις την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων και την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, όπως προσδιορίζονται από τις μεθόδους DPPH και Folin-Ciocalteu αντιστοίχως.

2.2. Όργανα και Αντιδραστήρια

Στους παρακάτω δύο πίνακες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών της παρασκευής των DESs, της επιλογής του κατάλληλου DES, της εκχύλισης και του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.

Εργαστηριακό όργανο/συσκευή και μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (έως 110g), Explorer, OHAUS
Ζυγός ακριβείας (έως 2g), M2P, Sartorius
Αναδευτήρας τύπου Vortex, ZX4, Velp
Λουτρό υπερήχων, 2210 Ultrasonic Bath, Branson
Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc.
Φυγόκεντρος ALC K-40
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, V-770 UV-Vis/NIR, Jasco
Molecular Devices SpectraMax 250 Microplate UV/Vis Reader
TGA/DSC 1 STAR ^e System, Mettler Toledo
NMR Varian 600MHz

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος.

Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Προμηθευτής
Απιονισμένο νερό	H ₂ O	-
Κουρκουμίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	Fluorochem
Άνυδρη βεταΐνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Alfa Aesar
Γαλακτικό οξύ 80-85% v/v	C ₃ H ₆ O ₃	Alfa Aesar
Γλυκερίνη	C ₃ H ₈ O ₃	Penta
Οξικός αιθυλεστέρας	C ₄ H ₈ O ₂	Sigma - Aldrich
Κανονικό εξάνιο	C ₆ H ₁₄	Sigma - Aldrich
Κονιοποιημένο τζίντζερ	-	-
DPPH (2,2-diphenyl-1-	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Aldrich

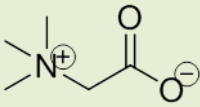
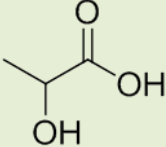
picrylhydrazyl)		
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	Sigma - Aldrich
Ανθρακικό νάτριο	Na ₂ CO ₃	Penta
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	-	Merck Millipore

2.3. Σύνθεση των NaDESs Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ (1:2) και Βεταΐνη-Γλυκερόλη (1:3)

▪ Βεταΐνη- Γαλακτικό Οξύ (1:2) (Bet-La)

Ζυγίζεται ποσότητα στερεής άνυδρης βεταΐνης (10g, 85mmol) σε ζυγό ακριβείας και προστίθεται σε αυτήν η κατάλληλη ποσότητα γαλακτικού οξέος (15,38g, 170mmol, 12,7ml 80-85% v/v), ώστε η μοριακή αναλογία των δύο συστατικών να είναι 1:2. Τα δύο συστατικά τοποθετούνται εντός σφαιρικής φιάλης και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 70°C σε αδρανείς συνθήκες αζώτου, μέχρις ότου σχηματισθεί διαυγές, άχρωμο και ομοιογενές υγρό, το οποίο συλλέγεται σε φιαλίδιο. Ακολουθεί δομικός χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία NMR (¹H και ¹³C), καθώς και μελέτη των θερμικών ιδιοτήτων του διαλύτη με TGA ανάλυση.

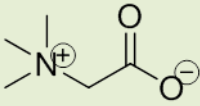
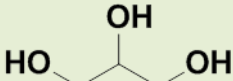
Πίνακας 3: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ.

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμών υδρογόνου (HBD)
Βεταΐνη – Γαλακτικό οξύ (Bet-La)	1:2	 Βεταΐνη MW=117,1463	 Γαλακτικό οξύ MW=90,0779

▪ Βεταΐνη- Γλυκερόλη (1:3) (Bet-Gly)

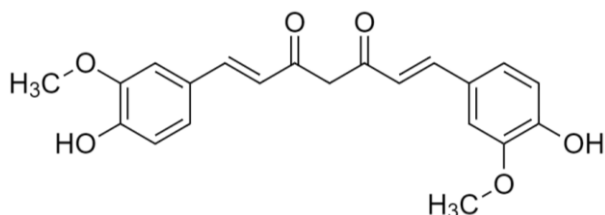
Για την παρασκευή του DES Bet:Gly, ακολουθείται η ίδια με προηγούμενως μεθοδολογία, ξεκινώντας με 3g (19mmol) άνυδρης βεταΐνης και 5,4g (57mmol) γλυκερόλης. Ο δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιείται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Πίνακας 4: Μοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη των συστατικών του NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη.

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμών υδρογόνου (HBD)
Βεταΐνη – Γλυκερόλη (Bet-Gly)	1:3	 Βεταΐνη MW=117,1463	 Γλυκερόλη MW=92,0938

2.4. Επιλογή βαθέως ευτηκτικού διαλύτη

Για την επιλογή του καταλληλότερου εκχυλιστικού μέσου για την εκχύλιση του τζίντζερ, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μια προκαταρκτική μελέτη διαλυτοποίησης της κουρκουμίνης ((1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione) (Σχήμα 6) στα επιλεγμένα NaDESs. Η κουρκουμίνη επιλέχθηκε λόγω της παρουσίας ποικίλων κουρκουμινολιδίων στο ρίζωμα του τζίντζερ, καθώς και της διαθεσιμότητάς της.⁵⁶ Τα δύο NaDESs που εξετάζονται είναι το βεταΐνη-γαλακτικό οξύ (Bet-La) (σε μοριακή αναλογία 1:2) και το βεταΐνη-γλυκερόλη (Bet-Gly) (σε μοριακή αναλογία 1:3).



Σχήμα 6: Συντακτικός τύπος της κουρκουμίνης.

Για καθένα από τα δύο DESs ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

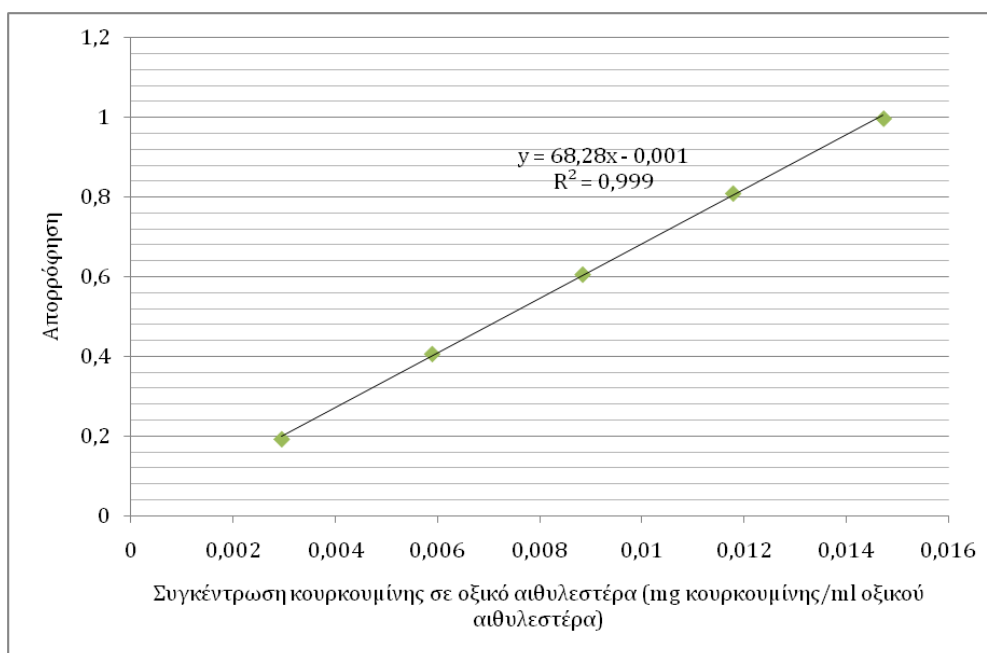
(α) Το DES αναμιγνύεται με νερό σε αναλογία 2:1 κατ' όγκο και το προκύπτον μίγμα αναδεύεται σε συσκευή vortex μέχρις ότου ομογενοποιηθεί.

(β) Στη συνέχεια προστίθεται η κουρκουμίνη ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 0,73mg κουρκουμίνης/ml διαλύτη DES/H₂O. Η διαλυτοποίηση της κουρκουμίνης υποβοηθείται με ανάδευση του μίγματος σε vortex και θέρμανσή του στους 50°C.

(γ) Το μίγμα διηθείται μέσω φίλτρου σύριγγας 0,45μm και λαμβάνονται 100μl διηθήματος, τα οποία αραιώνονται σε τελικό όγκο 3ml με οξικό αιθυλεστέρα.

Με οπτική παρακολούθηση είναι εμφανές πως το διάλυμα της κουρκουμίνης σε DES Bet-Gly είναι σχεδόν διαφανές και, δεδομένου του έντονου πορτοκαλί χρώματος της κουρκουμίνης, συμπεραίνεται η μικρή διαλυτότητα της κουρκουμίνης στο NaDES αυτό. Από την άλλη, το διάλυμα κουρκουμίνης σε Bet-La έχει πιο έντονο χρώμα, συνεπώς αναμένεται να περιέχει περισσότερη διαλυμένη κουρκουμίνη.

Για την επιβεβαίωση του συμπεράσματος αυτού, μετράται η απορρόφηση της κουρκουμίνης στα δύο διαλύματα σε μήκος κύματος 418nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis και συγκρίνονται οι δύο λαμβανόμενες τιμές απορρόφησης. Σημειώνεται ότι έχει γίνει προσδιορισμός της καμπύλης αναφοράς της κουρκουμίνης σε οξικό αιθυλεστέρα και δίνεται από την εξίσωση $y=68,28x-0,001$ ($R^2=0,999$) όπου y η απορρόφηση (αδιάστατη) και x η συγκέντρωση του διαλύματος κουρκουμίνης σε mg κουρκουμίνης/ml οξικού αιθυλεστέρα (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης σε οξικό αιθυλεστέρα.

Στο διάλυμα του NaDES Bet-La αντιστοιχεί εμφανώς μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης ($A=0,3020$, δηλαδή συγκέντρωση $0,0044$ mg κουρκουμίνης/ml οξικού αιθυλεστέρα) από ό, τι στο διάλυμα του Bet-Gly ($A=0,0340$, δηλαδή $0,00051$ mg κουρκουμίνης/ml οξικού αιθυλεστέρα), γεγονός που σημαίνει ότι στο πρώτο διάλυμα η διαλυτότητα της κουρκουμίνης είναι μεγαλύτερη. Τελικά, ο βαθέως ευτηκτικός διαλύτης που επιλέχθηκε ως ο χρησιμοποιούμενος στα ακόλουθα πειράματα εκχυλίσεων είναι ο Bet-La (1:2).

2.5. Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με τη χρήση DES ως διαλύτη

Αρχικά, πραγματοποιείται μια σειρά εισαγωγικών πειραμάτων, στην οποία όλες οι εκχυλίσεις λαμβάνουν χώρα σε λουτρό (bath) υπερήχων. Η βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης θα βασιστεί στα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων, στο probe υπερήχων. Ο στόχος, λοιπόν, των πειραμάτων στο λουτρό είναι η διεκπεραίωση ορισμένων πρωταρχικών διερευνητικών δοκιμών, από τις οποίες θα εξαχθούν συμπεράσματα χρήσιμα για τις συνθήκες υπό τις οποίες θα εκπονηθούν οι εκχυλίσεις στο probe.

Πραγματοποιούνται 6 το πλήθος εκχυλίσεις στο λουτρό υπερήχων. Στον παρακάτω πίνακα, για κάθε εκχύλιση παρουσιάζεται ο ξεχωριστός κωδικός που της έχει δοθεί, καθώς και οι τιμές των πειραματικών συνθηκών που μεταβάλλονται από πείραμα σε πείραμα. Οι πειραματικές αυτές παράμετροι που κάθε φορά αλλάζουν είναι ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία κατ' όγκο (ή κατά μάζα) DES/νερού στο εκχυλιστικό μέσο και η αναλογία βάρους κατ' όγκο πρώτης ύλης/διαλύτη.

Πίνακας 5: Κωδικοποίηση και συνθήκες εκχυλίσεων στο λουτρό υπερήχων.

Κωδικός Πειράματος	Χρόνος Εκχύλισης (min)	DES/H ₂ O	Ginger/διαλύτης (mg/ml)
STK4a	10	5:1 v/v	100/3
STK7	30	1:1 v/v	100/3
STK10a	30	2:1 w/w	100/3

STK5	30	2:1 w/w	200/3
STK8	60	2:1 w/w	200/3
STK10b	60	2:1 w/w	100/3

▪ **Πειραματική διαδικασία:**

Σε γυάλινο φιαλίδιο των 30ml τοποθετείται μικρή ποσότητα (2-5ml) του NaDES Bet-La και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα νερού, ούτως ώστε να τηρείται η κατ' όγκο αναλογία που προβλέπεται σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα. Το μίγμα αναδεύεται σε συσκευή vortex μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα σκόνης τζίντζερ που ικανοποιεί την αντίστοιχη συνθήκη αναλογίας μάζας κατ' όγκο στερεής πρώτης ύλης/διαλύτη και προστίθεται με προσοχή στο διαλύτη εκχύλισης.

Η συσκευή υπερήχων προετοιμάζεται για την εκχύλιση με την ενεργοποίηση της θέρμανσης του υδατόλουτρου. Μόλις το νερό προθερμανθεί στους 40°C, η θέρμανση σταματά και το φιαλίδιο με το τζίντζερ και το διαλύτη στερεώνεται, χωρίς το καπάκι του, στο λουτρό με μεταλλικό στήριγμα με τέτοιο τρόπο ώστε το περιεχόμενο του φιαλιδίου να βρίσκεται όλο κάτω από τη στάθμη του νερού. Αμέσως μετά ενεργοποιείται η λειτουργία των υπερήχων για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Επειδή κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η θερμοκρασία ανέρχεται, δε χρησιμοποιείται και θέρμανση ταυτόχρονα με τους υπερήχους.

Μετά το πέρας του χρόνου εκχύλισης, το φιαλίδιο απομακρύνεται από τη συσκευή και αφήνεται να ψυχθεί για λίγο στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το περιεχόμενό του φυγοκεντρείται για 20min σε ταχύτητα 5400rpm (ίση με το 90% της μέγιστης). Ακολουθεί διήθηση υπό κενό του υπερκείμενου υγρού και το παραλαμβανόμενο εκχύλισμα τοποθετείται σε καθαρό φιαλίδιο και αποθηκεύεται σε σκιερό μέρος υπό ψύξη.

2.6. Καθορισμός πειραματικών συνθηκών με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό (Design of Experiment, DoE)

Αφού πραγματοποιηθεί η πρώτη σειρά εκχυλίσεων (στο λουτρό υπερήχων), τα προκύπτοντα εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται με βάση τη δοκιμή DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης και τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών τους με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Από τη συγκριτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων των έξι αυτών εκχυλίσεων στο λουτρό υπερήχων, καθορίζονται οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων που θα διέπουν τη δεύτερη σειρά εκχυλίσεων, η οποία θα λάβει χώρα στο probe υπερήχων και τα αποτελέσματά της (αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων και περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά) θα αναλυθούν στατιστικά, με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης, μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken. Ο λόγος που επιλέγεται σε αυτήν την περίπτωση probe υπερήχων και όχι λουτρό όπως προηγουμένως, είναι ότι οι εκχυλίσεις αναμένεται να είναι αποτελεσματικότερες, λόγω της μεγαλύτερης ισχύος των υπερήχων.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που θα εξετασθούν είναι:

- ο χρόνος εκχύλισης στο probe των υπερήχων (x_1),
- η αναλογία NaDES/νερού w/w στο εκχυλιστικό μέσο (διαλύτη) (x_2) και
- η αναλογία του όγκου του διαλύτη προς τη μάζα της πρώτης ύλης (x_3).

Για καθεμία από τις παραπάνω μεταβλητές ορίζονται τρεις τιμές (3^3 πειραματικός σχεδιασμός), οι οποίες χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα -, 0 και +, σε αύξουσα σειρά. Ο χρόνος παραμονής στο probe υπερήχων επιλέγεται να είναι μικρότερος από ό, τι στο λουτρό υπερήχων, λόγω της μεγαλύτερης ισχύος του (και πάντα έχοντας υπόψη την ευαισθησία πολλών βιοδραστικών ενώσεων που περιλαμβάνονται στο τζίντζερ), ενώ η αναλογία DES/νερού στο εκχυλιστικό μέσο θα είναι μεγαλύτερη. Έτσι, επιλέγονται:

- Για τη μεταβλητή x_1 :
 - ☐ - → 10 (min),
 - ☐ 0 → 15 (min) και
 - ☐ + → 20 (min),
- για τη μεταβλητή x_2 :
 - ☐ - → 70:30 (w/w),
 - ☐ 0 → 80:20 (w/w),
 - ☐ + → 90:10 (w/w) και
- για τη μεταβλητή x_3 :
 - ☐ - → 10 (2,5ml/0,25g),
 - ☐ 0 → 15 (3ml/0,2g) και
 - ☐ + → 20 (3ml/0,15g).

Οι τρεις αυτές παράμετροι επιλέχθηκαν καθώς κρίθηκαν από τις πιο σημαντικές προς μελέτη για τη διεργασία εκχύλισης. Ο χρόνος και η αναλογία μάζας πρώτης ύλης/όγκο διαλύτη αποτελούν παραμέτρους αναφοράς και για πληθώρα άλλων επιστημονικών εργασιών. Η παράμετρος DES/H₂O επιλέχθηκε ως σημαντική για τη συγκεκριμένη διεργασία παράμετρος, καθώς το νερό βοηθά διαχειριστικά για να επιτευχθούν χαμηλότερα ιξώδη του διαλύτη, παράλληλα όμως αποτελεί μέσο στο οποίο είναι δυσδιάλυτες πολλές από τις κύριες ενώσεις του τζίντζερ.

2.7. Εκχύλιση σε probe υπερήχων με τη χρήση DES ως διαλύτη

Στο probe υπερήχων, πραγματοποιούνται 15 τον αριθμό εκχυλίσεις, οι συνθήκες των οποίων καθορίζονται, όπως προαναφέρθηκε, από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων που έλαβαν χώρα στο λουτρό. Ο κωδικός της κάθε εκχύλισης, ο συμβολισμός της κατά Box-behnken και οι τιμές των πειραματικών συνθηκών-ανεξάρτητων μεταβλητών που της αντιστοιχούν, δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 6: Κωδικοποίηση, συμβολισμός κατά Box-Behnken και τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών των εκχυλίσεων στο probe υπερήχων.

Κωδικός πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (x_1)	Λόγος DES/νερού w/w (x_2)	Λόγος όγκου διαλύτη/μάζα τζίντζερ (x_3)
STK12a	--0	10	70/30	15
STK12b	+ -0	20	70/30	15
STK13a	- +0	10	90/10	15

STK13b	++0	20	90/10	15
STK15	-0+	10	80/20	20
STK16	-0-	10	80/20	10
STK18a	000	15	80/20	15
STK18b	000	15	80/20	15
STK18c	000	15	80/20	15
STK20	+0+	20	80/20	20
STK21	0--	15	70/30	10
STK22	+0-	20	80/20	10
STK23	0+-	15	90/10	10
STK24	0-+	15	70/30	20
STK25	0++	15	90/10	20

Η διαδικασία προετοιμασίας της εκχύλισης είναι ακριβώς η ίδια με αυτή που ακολουθείτο για τις εκχυλίσεις στο λουτρό των υπερήχων. Το φιαλίδιο μετά την πλήρωσή του με τις κατάλληλες ποσότητες τζίντζερ, NaDES και νερού, τοποθετείται εντός παγόλουτρου και όλο το σύστημα εισέρχεται στο probe υπερήχων, για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος. Μεριμνάται η θέση του να είναι τέτοια ώστε το άκρο του να είναι βυθισμένο μεν στο δείγμα, να μην ακουμπά δε τον πυθμένα του φιαλιδίου, διότι υπάρχει κίνδυνος θραύσης του. Η ισχύς των υπερήχων ρυθμίζεται στα 120W (30% της μέγιστης ισχύος) και ενεργοποιείται η λειτουργία των υπερήχων για να ξεκινήσει η εκχύλιση. Η διαδικασία της εκχύλισης γίνεται διαλειμματικά. Οι υπέρηχοι, σημειώνεται, δε λειτουργούν για περισσότερα από 5 λεπτά συνεχόμενα, ενώ ανάμεσα στα επιμέρους διαστήματα μεσολαβεί μία περίοδος μη λειτουργίας, που διαρκεί περίπου 2 λεπτά κάθε φορά.

Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, ακολουθεί φυγοκέντρηση (20min, 90%) και διήθηση υπό κενό, όμοια με την περίπτωση των εκχυλίσεων στο λουτρό υπερήχων. Το εκχύλισμα φυλάγεται υπό ψύξη.



Εικόνα 5: Σύστημα probe υπερήχων εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.

2.8. Συμβατική εκχύλιση με χρήση οργανικών διαλυτών

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, έλαβε χώρα και εκχύλιση σε σκόνη τζίντζερ με συμβατικό τρόπο, ακολουθώντας ελαφρώς τροποποιημένη σχετική δημοσιευμένη μεθοδολογία από τους Endo, Kanno και Oshima.⁵⁷ Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις εικοσιτετράωρης

διάρκειας έκαστη, με τη χρήση αιθανόλης/νερού σε αναλογία 50% ως διαλύτη. Ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, εξάτμιση για τη συμπύκνωση της οργανικής φάσης και τέλος έλαβε χώρα χρωματογραφία στήλης εις τριπλούν σε σύστημα εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 7:3. Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκαν και παρελήφθησαν οι ενώσεις 6-τζιντζερόλη και 6-σογκαόλη, τακτική που ακολουθείται συνήθως προκειμένου αυτές να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στα εκχυλίσματα με NaDESS.

2.9. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

2.9.1. Μέτρηση Ολικών Φαινολικών (TPC) των εκχυλισμάτων

Το τζιντζερ είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις. Το ποσοστό των εκχυλισμάτων σε φαινολικό φορτίο, θα προσδιοριστεί με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu ελαφρώς τροποποιημένη.⁵⁸

Τα εκχυλίσματα αραιώνονται με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1 κατ' όγκο. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 100μl αραιωμένου εκχυλίσματος και 6ml απιονισμένου νερού. Παρασκευάζεται ακόμη το τυφλό διάλυμα, που περιέχει μόνο απιονισμένο νερό.

Σε σκοτεινό χώρο, γίνεται προσθήκη στο διάλυμα 0,5ml του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται, τα μίγματα αναδεύονται σε συσκευή vortex και αφήνονται να επωαστούν για 2min. Σε κάθε μίγμα προστίθεται 1,5ml κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃ (προς ρύθμιση του pH) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1,9ml απιονισμένου νερού, ώστε να επιτευχθεί τελικός όγκος μιγμάτων 10ml.

Μετά την προσθήκη νερού, τα διαλύματα επώάζονται για 1h σε σκοτεινό χώρο. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφησή τους σε μήκος κύματος 755nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλιση ισούται με:

$$A = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$$

όπου A_{sample} η απορρόφηση μίγματος που περιέχει εκχύλιση και A_{blank} η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος.

Υπολογίζονται τα ισοδύναμα γαλλικού οξέος $C_{\text{γαλλ}}$ από την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς αυτού:

$$C_{\text{γαλλ}} = 0,9631 * A - 0,0113,$$

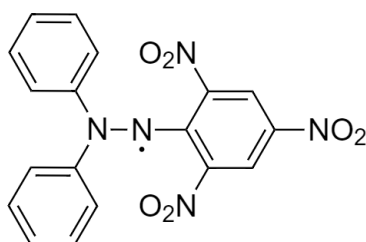
όπου A η υπολογισθείσα απορρόφηση του κάθε δείγματος εκχυλίσματος. Η περιεκτικότητα του τζιντζερ σε ολικά φαινολικά δίνεται από τη σχέση:

$$\text{T. P. C.} \left(\frac{\text{mg γαλλ.}}{\text{g τζιντζερ}} \right) = 2 * \frac{C_{\text{γαλλ}} \left(\frac{\text{mg γαλλ.}}{\text{L εκχυλ.}} \right) * V_{\text{εκχυλ.}} (\text{L εκχυλ.})}{m_{\text{πρώτης ύλης}} (\text{g τζιντζερ})}$$

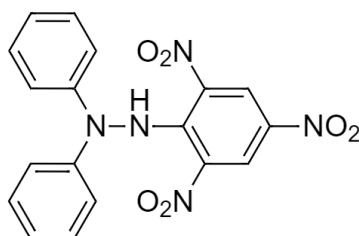
Τόσο τα δείγματα που περιέχουν εκχύλιση όσο και τα τυφλά διαλύματα παρασκευάζονται εις τριπλούν, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Συνεπώς, για τους υπολογισμούς που ακολουθούν χρησιμοποιούνται οι μέσες τιμές των μετρήσεων που λαμβάνονται.

2.9.2. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Άλλη μια σημαντική προς προσδιορισμό παράμετρος είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Για τον προσδιορισμό αυτόν, επελέγη η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο⁴, η σταθερή ρίζα DPPH• (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πυκρλυδραζόλιο) αλληλεπιδρά με τα αντιοξειδωτικά μόρια του εκχυλίσματος και αδρανοποιείται (ανάγεται).



Σχήμα 7: Συντακτικός τύπος της ρίζας DPPH.



Σχήμα 8: Συντακτικός τύπος της ανηγμένης μορφής του DPPH.

Ζυγίζονται με ακρίβεια 5mg της ρίζας DPPH και διαλύονται σε απόλυτη αιθανόλη, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50ml. Μέχρι να χρησιμοποιηθεί, το διάλυμα φυλάγεται υπό ψύξη, ωστόσο ποτέ δεν αποθηκεύεται για διάστημα πολλών ωρών, για να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας.

Υστερα, πραγματοποιείται αραίωση των εκχυλισμάτων ως εξής: από κάθε εκχύλισμα λαμβάνονται 20ml και αναμιγνύονται με 980ml αιθανόλης, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα εκχυλισμάτων (stock) συγκέντρωσης $C=0,02\mu\text{l}/\mu\text{l}$ (C αρχική συγκέντρωση).

Γίνεται πλήρωση ενός plate 96 θέσεων, τοποθετώντας σε κάθε κυψελίδα 100μl διαλύματος εκχυλίσματος (σε κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα) και 100μl διαλύματος DPPH που παρασκευάστηκε. Τα stock διαλύματα των εκχυλισμάτων έχουν υποστεί αραίωση με αιθανόλη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε στο plate να υπάρχουν διαλύματα συγκεντρώσεων C , 0,8C, 0,6C, 0,4C και 0,2C. Για παράδειγμα, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C , τοποθετούνται 100μl του αντίστοιχου stock και 100μl διαλύματος DPPH, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0,8C τοποθετούνται 80μl του stock, 20μl αιθανόλης και 100μl διαλύματος DPPH, κ.ο.κ.

Επιπλέον, παρασκευάζονται δύο τυφλά διαλύματα: ένα που αποτελείται από 100μl αιθανόλης και 100μl DPPH (χωρίς εκχύλισμα) και ένα που περιέχει αποκλειστικά DPPH (200μl). Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τόσο τα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα όσο και τα τυφλά διαλύματα, παρασκευάζονται εις τριπλούν. Για το λόγο αυτό, στους υπολογισμούς θα υπεισέρχονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων που λαμβάνονται.

Μετά από επώαση των διαλυμάτων για 30min και 60min σε σκοτεινό χώρο, μετράται η απορρόφησή τους σε μήκος κύματος 515nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων (τιμών απορρόφησης), σχεδιάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυψελίδων (μl εκχυλίσματος/ml δείγματος). Η % αναστολή ορίζεται ως:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} * 100,$$

όπου A_{blank} η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων αιθανόλης/DPPH και A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα.

Η προκύπτουσα γραφική παράσταση είναι μια ευθεία γραμμή θετικής κλίσης. Με βάση αυτήν πραγματοποιείται γραφικός υπολογισμός της συγκέντρωσης δείγματος εκχυλίσματος που επιτυγχάνει μείωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50% (IC_{50}). Η συγκέντρωση αυτή δίνεται από τη σχέση:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a},$$

όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση της ευθείας.

Στην περίπτωση που ως IC_{50} ορίζεται η συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος που απαιτείται για την ελάττωση κατά 50% της συγκέντρωσης του DPPH (και όχι της απορρόφησης του), τότε ο γραφικός υπολογισμός της τιμής IC_{50} των δειγμάτων εκχυλίσματος βασίζεται στο διάγραμμα της συγκέντρωσης των δειγμάτων (μl εκχυλίσματος/ml δείγματος) συναρτήσει του $\Delta C = C_{\text{blank}} - C_{\text{sample}}$, όπου C_{blank} και C_{sample} οι συγκεντρώσεις των τυφλών διαλυμάτων και των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα αντίστοιχα, οι οποίες εξάγονται από την καμπύλη αναφοράς του DPPH:

$$A = 13,64 * C_{\text{DPPH}} + 0,0029.$$

Το γράφημα που προκύπτει είναι πάλι ευθεία γραμμή θετικής κλίσης. Η τιμή του IC_{50} δίνεται από τον τύπο:

$$IC_{50} = a * 0,5 * C_{\text{blank}} + b,$$

όπου a η κλίση της ευθείας και b η αποτέμνουσα.

Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα των δοκιμών DPPH για τα εκχυλίσματα θα παρουσιάζονται από εδώ και στο εξής με βάση τον πρώτο τρόπο υπολογισμού, ο οποίος προκύπτει από τον ορισμό του IC_{50} ως της συγκέντρωσης διαλύματος εκχυλίσματος που είναι απαραίτητη για τη μείωση κατά 50% της απορρόφησης της ρίζας DPPH. Η επιλογή αυτή έγινε διότι στην πλειονότητα των βιβλιογραφικών πηγών που μελετήθηκαν, ο δείκτης IC_{50} ορίζεται κατά αυτόν τον τρόπο.

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του πειραματικού σχεδιασμού και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι το Design-Expert 12 (Stat-Ease Inc. – Trial Version).

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

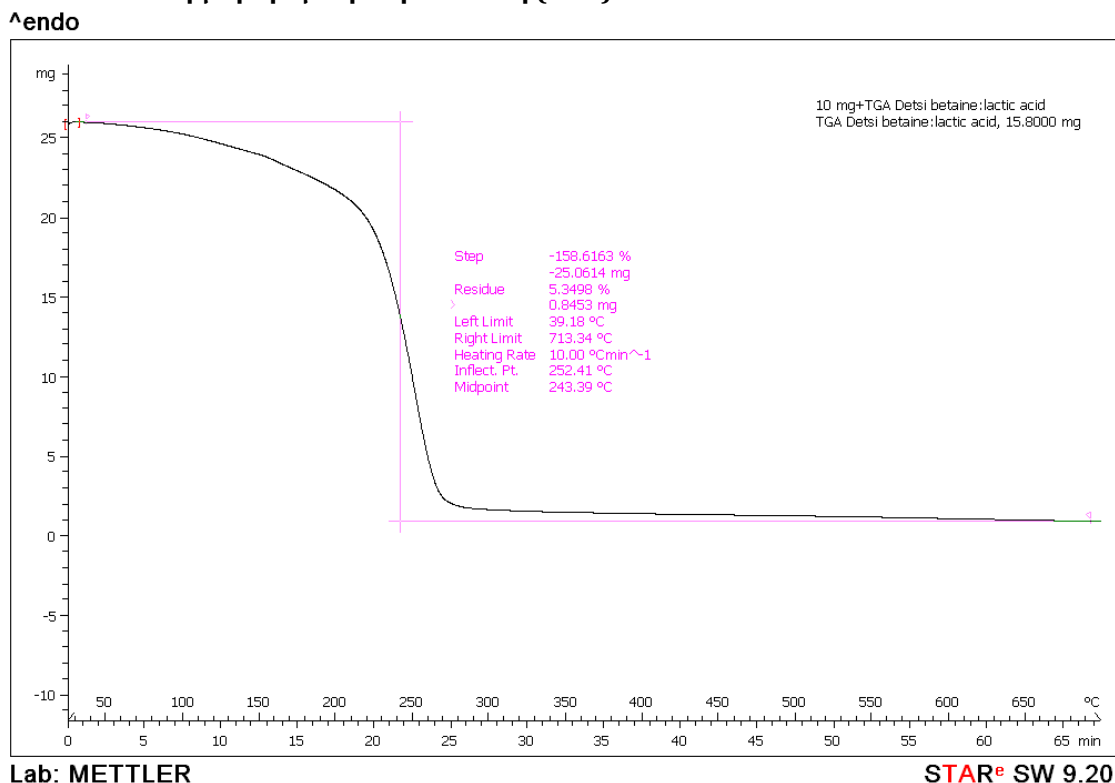
3.1. Χαρακτηρισμός του NaDES Bet-La

Όπως προαναφέρθηκε, το NaDES Bet-La επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο για χρήση ως διαλύτη εκχύλισης, δεδομένης της υψηλότερης διαλυτότητας της κουρκουμίνης σε αυτό, σε σχέση με το άλλο εξεταζόμενο DES. Η βεταΐνη ανήκει στην ομάδα βιταμινών Β και δρα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου στο διαλύτη αυτό, ενώ το γαλακτικό οξύ λειτουργεί ως δότης. Το τελευταίο είναι ένα φυσικό μη τοξικό οξύ, που μπορεί να βιοδιασπάται. Υπάρχει η δυνατότητα χρήσης του σε υγρή μορφή, γεγονός που διευκολύνει την παρασκευή του DES.⁴⁰

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το DES Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ έχει σημαντικά υψηλότερο ιξώδες από άλλα που έχουν για δότη δεσμού υδρογόνου γαλακτικό οξύ (π. χ. με αλανίνη, γλυκίνη ή χλωριούχο χολίνη για δέκτη). Η μέτρηση του ιξώδους του γίνεται σε θερμοκρασία 40-90°C (ενώ στα άλλα μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 28°C), γιατί το υψηλό ιξώδες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες προκαλεί προβλήματα στα περιστροφικά ιξωδόμετρα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση. Η προσθήκη νερού, λοιπόν, για την ελάττωση του ιξώδους του είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη χρήση του ως διαλύτη και για αυτό, για την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων της παρούσας εργασίας, η περιεκτικότητα του εκχυλιστικού μέσου σε νερό μελετήθηκε ως προς την επίδρασή της στην αποτελεσματικότητα της διεργασίας.⁴⁰

Βιβλιογραφικές τιμές πυκνότητας του DES αυτού στους 24°C είναι 1200kg/m³ και 1195kg/m³. Χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμική σταθερότητα σε σχέση με άλλα DES που έχουν ως βάση το γαλακτικό οξύ, γεγονός που δηλώνεται από την υψηλότερη θερμοκρασία θερμικής του αποσύνθεσης.⁴⁰

3.1.1. Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA)



Γράφημα 2: Καμπύλη TGA του NaDES Bet-La.

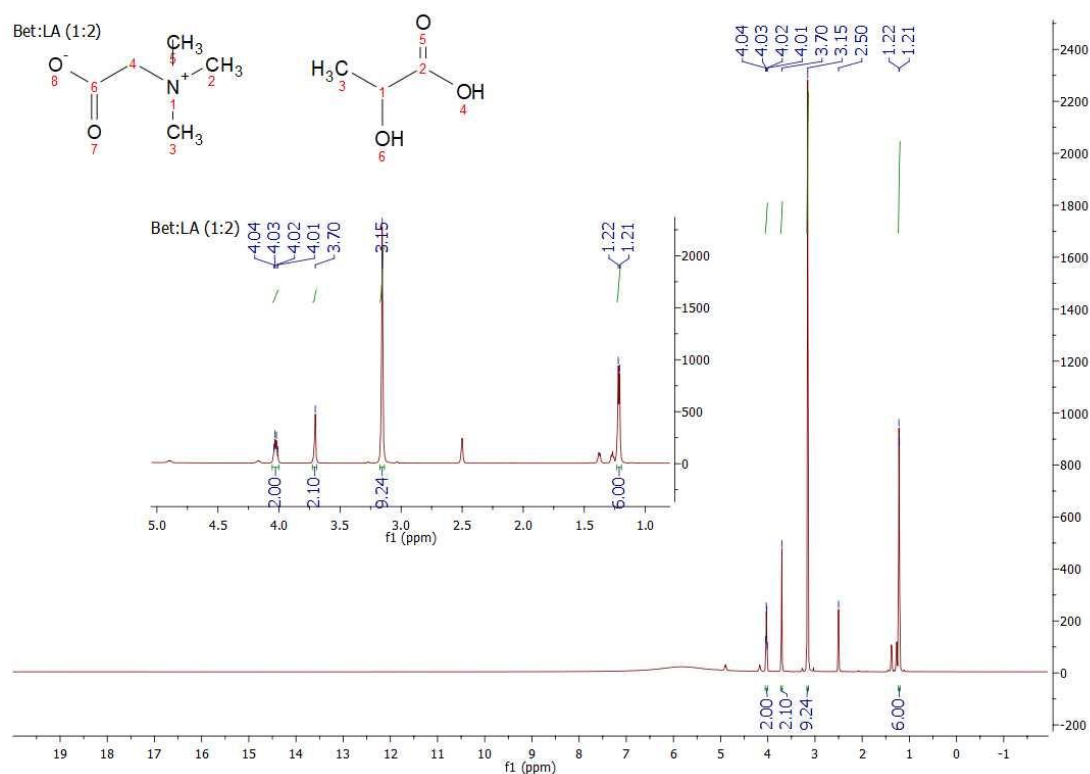
Κατά τη θερμοβαρυμετρική ή θερμοσταθμική ανάλυση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Bet-La, μελετάται η μεταβολή (και συγκεκριμένα η απώλεια) της μάζας αυτού που λαμβάνει χώρα κατά τη θέρμανσή του με σταθερό ρυθμό 10°C/min υπό αδρανείς συνθήκες αζώτου. Η αρχική μάζα του διαλύτη που τοποθετήθηκε εντός του οργάνου είναι 15,8mg, ενώ το υπόλειμμα τελικά είναι 0,8453mg. Όπως είναι εμφανές από το παραπάνω διάγραμμα, η συμπεριφορά του NaDES κατά την αύξηση της θερμοκρασίας είναι ομαλή και πραγματοποιείται αποδόμησή του σε ένα στάδιο.

Η καμπύλη έχει αριστερό και δεξί θερμοκρασιακό όριο 39,18°C και 713,34°C αντίστοιχα, ενώ το μέσο της αντιστοιχεί σε θερμοκρασία 243,39°C. Η θερμοκρασία σχηματισμού του πλατό ανέρχεται στους 252,41°C. Είναι φανερό ότι η θερμοκρασία αποδόμησης του NaDES είναι πράγματι αρκετά υψηλή, γεγονός που δικαιολογείται από το σχηματισμό του «πλέγματος» δεσμών υδρογόνου στο σύστημα του διαλύτη, που απαιτεί επιπλέον ενέργεια για την αποδόμησή του.

Η υψηλή θερμοκρασία αποδόμησης του NaDES επιτρέπει την εφαρμογή του στην εκχύλιση με τη βοήθεια probe υπερήχων χωρίς κίνδυνο αποδόμησής του και σχηματισμού παραπροϊόντων, δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της διεργασίας αυτής οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται είναι χαμηλότερες από την $T_{\text{αποδόμησης}}$.

3.1.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

3.1.2.1. ^1H NMR



Γράφημα 3: Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO-d_6) του NaDES Bet-La (1:2).

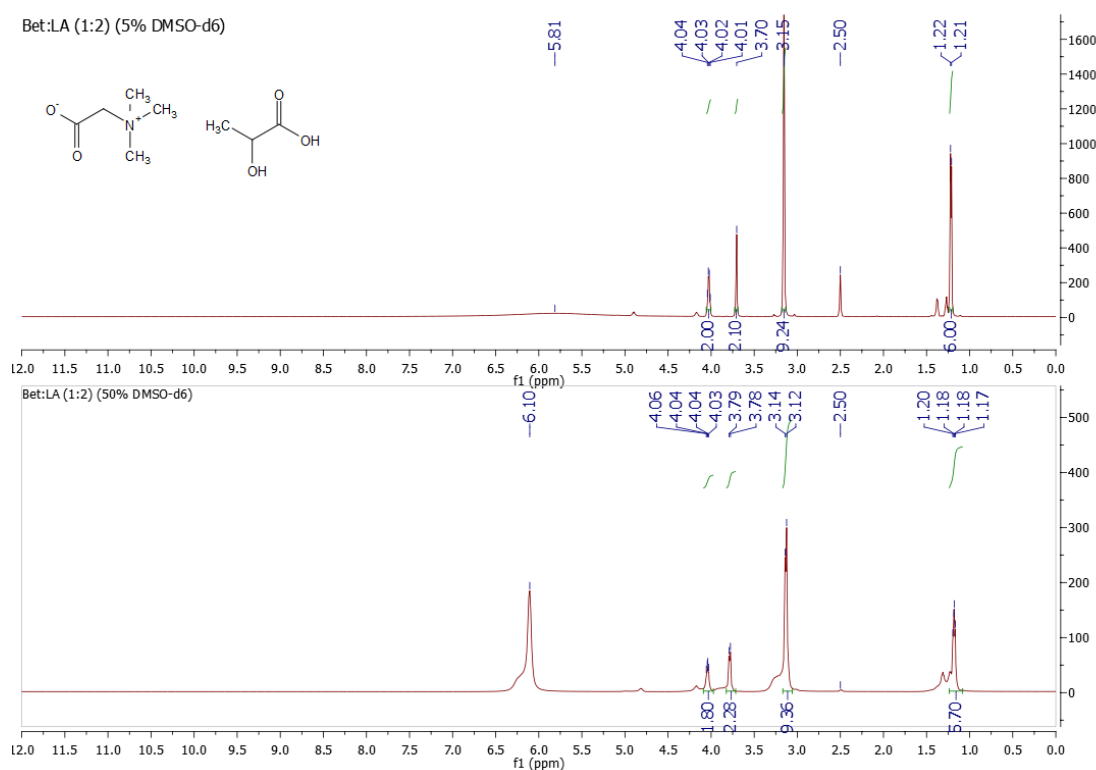
Η συχνότητα του οργάνου NMR όπου έγινε η λήψη του φάσματος είναι 600MHz και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO-d_6 .

Κάθε κορυφή του φάσματος ^1H NMR αντιστοιχεί σε μία ομάδα ισοδύναμων πρωτονίων, δηλαδή πρωτονίων που έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον και συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Το σήμα ενός πρωτονίου το οποίο έχει η γειτονικά πρωτόνια, σχάζεται δίνοντας πολλαπλή κορυφή, που αποτελείται από $n+1$ επιμέρους κορυφές και που χαρακτηρίζεται από μία σταθερά σύζευξης J . Δύο ομάδες πρωτονίων που συζεύγνυται μεταξύ τους έχουν την ίδια τιμή σταθεράς J .

Ξεκινώντας από τα πιο χαμηλά μαγνητικά πεδία, δηλαδή από τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια, η τετραπλή κορυφή στα 4,03ppm με σταθερά σύζευξης 6Hz αντιστοιχεί στο μοναδικό πρωτόνιο του γειτονικού στο καρβονύλιο άνθρακα του γαλακτικού οξέος, αλλά λόγω της γραμμομοριακής αναλογίας 1:2 των συστατικών του DES, η κορυφή ολοκληρώνεται για $2*1=2$ πρωτόνια. Η κορυφή στα 3,70ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και συνεπώς αντιστοιχεί στο μεθυλένιο της βεταΐνης. Είναι απλή γιατί τα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου δεν έχουν άλλα γειτονικά πρωτόνια. Η απλή κορυφή που εντοπίζεται στα 3,15ppm ολοκληρώνεται, όπως φαίνεται, για εννιά πρωτόνια και συνεπώς αντιστοιχεί στα εννιά ισοδύναμα πρωτόνια των τριών μεθυλίων που είναι συνδεδεμένα στο άζωτο της βεταΐνης. Είναι απλή κορυφή, γιατί τα πρωτόνια αυτά δε γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια. Η απλή κορυφή στα 2,50 ppm αντιστοιχεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη DMSO-d_6 . Στα πιο υψηλά πεδία, στα 1,22ppm, εμφανίζονται τα πιο προστατευμένα πρωτόνια του μεθυλίου του γαλακτικού οξέος που συμμετέχει στο σχηματισμό του NaDES, με σταθερά σύζευξης $J=6,7\text{Hz}$. Η ολοκλήρωση της κορυφής αντιστοιχεί σε έξι ισοδύναμα πρωτόνια, δεδομένου ότι στο μίγμα του DES, για κάθε μόριο βεταΐνης περιέχονται δύο μόρια γαλακτικού οξέος (άρα $2*3=6$ πρωτόνια

μεθυλίου). Η κορυφή αυτή είναι διπλή, γιατί το μεθύλιο του γαλακτικού οξέος δέχεται την επίδραση του ενός γειτονικού του πρωτονίου. Τα πρωτόνια των υδροξυλίων είναι πιο αποπροστατευμένα και «ευκίνητα» και για αυτό και δεν είναι πάντα εμφανή στα φάσματα NMR ^1H , ιδίως όταν υπάρχει και ποσότητα νερού στο δείγμα, όπως στην περίπτωση του Bet-La, όπου το γαλακτικό οξύ είναι υδατικό διάλυμα 80-85% v/v.

Δεδομένου ότι για τη λήψη ενός φάσματος ^1H NMR παρασκευάζεται διάλυμα του NaDES σε δευτεριωμένο διαλύτη σε πολύ μικρή αναλογία, περίπου 5% κατ' όγκο, είναι πιθανό η εικόνα που δίνεται για τη δομή του βαθώς ευτηκτικού διαλύτη να μην ανταποκρίνεται απόλυτα στην πραγματική. Η αναλογία αυτή μπορεί να επηρεάζει το πώς απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις των αρχικών συστατικών (π. χ. είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων στο φάσμα). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μία δοκιμή κατά την οποία ελήφθη φάσμα του NaDES Bet-La (1:2), το οποίο αραιώθηκε στον επιλεγμένο δευτεριωμένο διαλύτη (DMSO- d_6) σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία (50% κατ' όγκο).

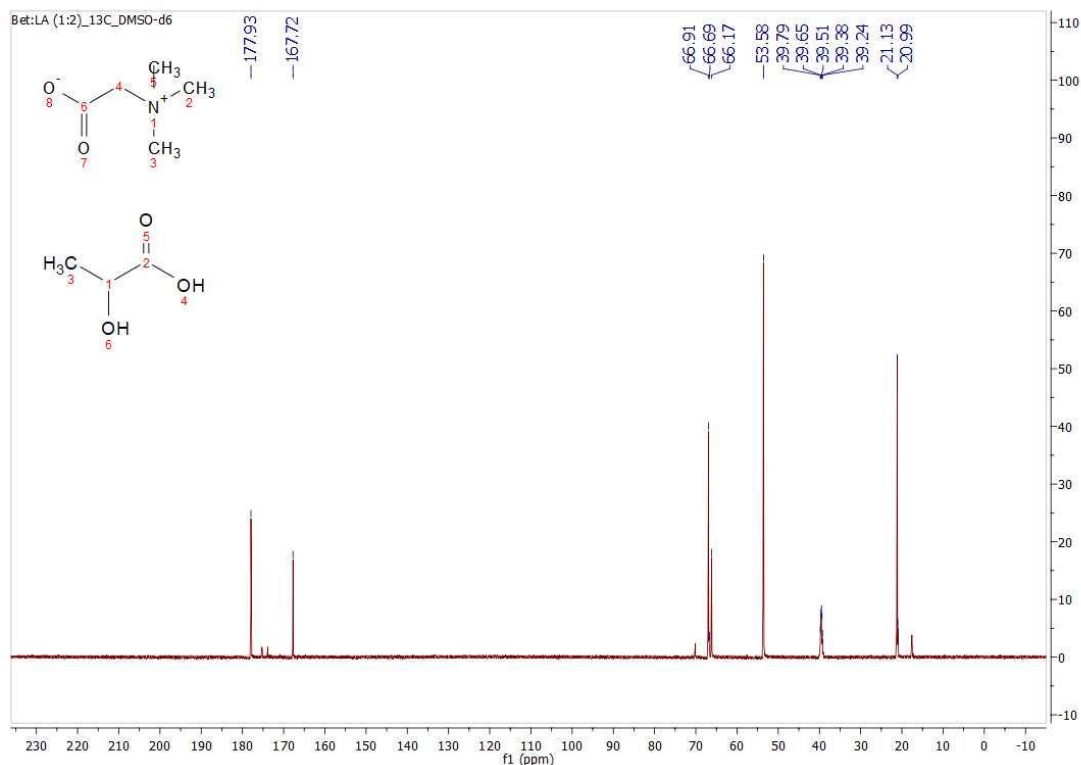


Γράφημα 4: Φάσμα ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) του NaDES Bet-La (1:2) σε αναλογία 50% στο δευτεριωμένο διαλύτη.

Διαπιστώθηκε (Γράφημα 4) ότι η βασική διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων (χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης δείγματος) είναι η εμφάνιση μίας κορυφής στα 6,08ppm στο καινούριο φάσμα. Στο πρώτο φάσμα, στη συχνότητα αυτή διακρίνεται μια πολύ χαμηλής έντασης ευρεία κορυφή, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του NaDES στο δείγμα που εισάγεται στο όργανο. Η κορυφή στα 6,08ppm οφείλεται στην παρουσία νερού στο NaDES, καθώς το γαλακτικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε είναι υδατικό διάλυμα 80-85% v/v.

Επιπλέον, μικρές μετατοπίσεις της τάξης των 0.03ppm συναντώνται στις κορυφές των μεθυλομάδων των συστατικών του NaDES, ενώ μεγαλύτερη χημική μετατόπιση (0.08ppm) απαντάται στην κορυφή που αποδίδεται στο μεθυλένιο της βεταΐνης.

3.1.2.2. ¹³C NMR



Γράφημα 5: Φάσμα ¹³C (600MHz, DMSO-d₆) του NaDES Bet-La (1:2).

Στο παραπάνω φάσμα (Γράφημα 5) διακρίνονται πέντε βασικές κορυφές, γεγονός που σημαίνει ότι στο εξεταζόμενο δείγμα υπάρχουν πέντε ομάδες ανθράκων χημικά μη ισοδύναμων μεταξύ τους.

Η κορυφή στα 39,52ppm αντιστοιχεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη DMSO-d₆. Ξεκινώντας από τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία (όπου δίνουν σήματα οι πιο αποπροστατευμένοι άνθρακες), συναντώνται δύο κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες καρβονυλίων. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 177,93ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα της καρβονυλομάδας του γαλακτικού οξέος, δεδομένου ότι είναι υψηλότερης έντασης από την άλλη και είναι ενδεικτική της αναλογίας 1:2 των συστατικών του NaDES. Αντίθετα, η χαμηλότερης έντασης κορυφή στα 167,72ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα του καρβονυλίου της βεταΐνης, λόγω της σχετικής αναλογίας των δύο συστατικών.

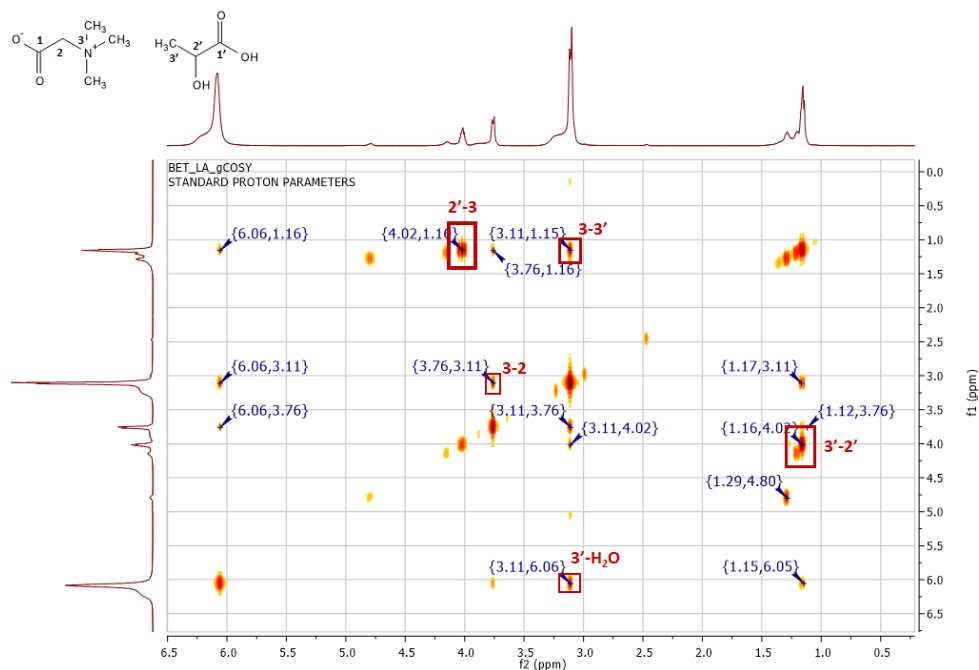
Προχωρώντας προς τα υψηλότερα πεδία, απαντώνται οι κορυφές στα 66,91ppm και στα 66,17ppm. Η πρώτη, που είναι υψηλότερης έντασης, αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλίου του γαλακτικού οξέος, αφενός λόγω του ότι δέχεται την επίδραση του γειτονικού του οξυγόνου που είναι έντονα ηλεκτραρνητικό και συνεπώς είναι αποπροστατευμένο, αφετέρου λόγω της διπλάσιας ποσότητας του γαλακτικού οξέος στο μίγμα. Η κορυφή στα 66,17ppm αντιστοιχεί στο μεθυλένιο της βεταΐνης.

Τέλος, συνεχίζοντας προς τα υψηλότερα μαγνητικά πεδία, συναντούμε τους πιο προστατευμένους άνθρακες, όπως αυτούς των μεθυλίων, στα οποία παρατηρείται ισοκατανομή του φορτίου, ως αποτέλεσμα των τριών πρωτονίων. Η υψηλή κορυφή στα 53,58ppm αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα μεταξύ τους μεθύλια που συνδέονται με το άζωτο της βεταΐνης. Ο πιο προστατευμένος άνθρακας είναι αυτός του μεθυλίου του γαλακτικού οξέος, που δίνει σήμα στα 21,06ppm.

3.1.2.3. 2D NMR (COSY)

Στα πλαίσια της μελέτης των ιδιοτήτων του Bet-La, έλαβε χώρα επιπλέον μελέτη της χωρικής διαμόρφωσης των μορίων, μέσω 2D NMR (τεχνική COSY). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆) και, για τη λήψη του φασμάτος, σε 300μl NaDES προστίθενται 300 μl διαλύτη.

Το σχετικό φάσμα (Γράφημα 6) δίνει σημαντικές πληροφορίες για το Bet-La και τον τρόπο που διαμορφώνεται στο διαλύτη DMSO-d₆.



Γράφημα 6: Φάσμα COSY NMR (600MHz, DMSO-d₆) του NaDES Bet-La (1:2).

Οι ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις που διαφαίνονται στο φάσμα COSY του NaDES Bet-La, είναι μεταξύ του πρωτονίου που είναι συνδεδεμένο στον C2' και των πρωτονίων των μεθυλίων που είναι συνδεδεμένα στο άζωτο της βεταΐνης (στη θέση 3), μεταξύ των πρωτονίων των C3' και C2' και στη συνέχεια λιγότερο ισχυρή αλληλεπίδραση εμφανίζεται μεταξύ των πρωτονίων των μεθυλίων στη θέση 3 της βεταΐνης και του C3', μεταξύ των πρωτονίων των μεθυλίων της βεταΐνης και του C2, ενώ, τέλος, ασθενή σήματα δίνονται για τις αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων των C3' και C2' με το νερό (6,06ppm).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων των C2' και C3' καθώς και του C2 και των μεθυλίων της θέσης 3 της βεταΐνης είναι αναμενόμενες, καθώς τα σήματα αυτά αντιστοιχούν σε γειτονικά πρωτόνια, όπως υποδεικνύεται και από τη δομή του διαλύτη στο Γράφημα 6.

Σημαντική ένδειξη από το παρόν φάσμα αποτελεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του πρωτονίου του C2' και των πρωτονίων των μεθυλίων της βεταΐνης καθώς και των C3' και των μεθυλίων της βεταΐνης. Η πρώτη αλληλεπίδραση δηλώνει πως τα πρωτόνια των μεθυλομάδων της βεταΐνης στη θέση 3 βρίσκονται κοντά χωροταξικά με το πρωτόνιο της θέσης 2' του γαλακτικού οξέος. Αυτή η θεώρηση ενισχύεται από την αλληλεπίδραση των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσης 3' του γαλακτικού οξέος με τα πρωτόνια των μεθυλίων της βεταΐνης.

3.2. Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

Τόσο για την πρώτη σειρά πειραμάτων (στην οποία οι εκχυλίσσεις λαμβάνουν χώρα στο λουτρό υπερήχων), όσο και για τη δεύτερη (στην οποία οι εκχυλίσσεις πραγματοποιούνται σε ροοβή υπερήχων), τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται αξιολογούνται ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία εκφράζεται μέσω του δείκτη IC₅₀, αλλά και ως προς την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC). Ο τρόπος προσδιορισμού των τιμών αυτών για κάθε εκχύλισμα έχει περιγραφεί αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την ίδια αρχική πρώτη ύλη, ώστε να μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια πως, οι όποιες διαφορές στις μετρούμενες αποκρίσεις οφείλονται καθαρά στη διεργασία της εκχύλισης και όχι σε διαφοροποιήσεις στην πρώτη ύλη.

3.2.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων

Για κάθε εκχύλισμα που παρελήφθη από το λουτρό υπερήχων (πρώτη σειρά πειραμάτων), σχεδιάστηκαν τα γραφήματα της επί τοις εκατό αναστολής (σάρωσης) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος, για τους δύο χρόνους επώασης των δειγμάτων, μισή και μία ώρα. Τα γραφήματα αυτά βρίσκονται συγκεντρωμένα στο Παράρτημα Ι. Σε κάθε διάγραμμα, έχει επιλεγθεί ως γραμμή τάσης μία ευθεία (linear trendline) και εμφανίζεται η εξίσωση αυτής μαζί με το συντελεστή προσδιορισμού R², ο οποίος εκφράζει την ποιότητα της προσαρμογής των πειραματικών σημείων στο γραμμικό μοντέλο. Η σχέση υπολογισμού της % αναστολής είναι η:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} * 100,$$

όπου A_{blank} η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων αιθανόλης/DPPH και A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα, ενώ η τιμή του IC₅₀ προσδιορίζεται από το τύπο:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a},$$

όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση της ευθείας.

Σε κάθε περίπτωση, επίσης, αναγράφεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος εκχυλίσματος (stock) για όλα τα πειράματα της πρώτης σειράς (λουτρό υπερήχων).

Σημειώνεται εδώ ότι, κατά τη δημιουργία των γραφημάτων αυτών, επιβεβαιώθηκε με κατάλληλες δοκιμές ότι η καλύτερη γραμμή τάσης (αυτή με το υψηλότερο R²) είναι η ευθεία, επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι η συσχέτιση ανάμεσα στην % σάρωση της ρίζας DPPH από τα συστατικά των εκχυλισμάτων και στη συγκέντρωση των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων αυτών είναι γραμμική.

Η τάση, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, δείχνει πως η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος ενός εκχυλίσματος οδηγεί σε αύξηση της % σάρωσης της ρίζας DPPH. Όσο πυκνότερο σε εκχύλισμα είναι το μετρούμενο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ριζών DPPH που ανάγονται από τα αντιοξειδωτικά.

Ακολουθώς, παρατίθεται πίνακας με τις τιμές του δείκτη IC₅₀ που έχουν υπολογιστεί γραφικά από τα σχετικά διαγράμματα για τα εκχυλίσματα από το λουτρό υπερήχων.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα εκχυλίσματα από το λουτρό υπερήχων.

Κωδικός εκχυλίσματος	Συγκέντρωση stock διαλύματος (μl εκχ./μl δ.)	Αντιοξειδωτική δράση (δοκιμή DPPH) IC ₅₀ (μl εκχ./ml δ.)	
		30 min	60 min
STK4a	1	30 min	890,79
		60 min	288,68
	0,5	30 min	53,36
STK5	0,5	30 min	28,35
STK7	1	30 min	311,65
		30 min	111,17
		60 min	40,30
STK8	1	30 min	369,19
		60 min	149,07
	0,5	30 min	201,43
		60 min	61,31
STK10a	0,5	30 min	60,37
		60 min	4,71
STK10b	0,5	30 min	11,08

Αξίζει να αναφερθεί ότι, ανάμεσα στην τιμή του IC₅₀ που αναφέρεται σε ένα εκχύλισμα του οποίου τα δείγματα έχουν υποστεί επώαση σε σκοτεινό χώρο για μισή ώρα πριν τη μέτρηση, και στην τιμή του IC₅₀ του ίδιου εκχυλίσματος που αντιστοιχεί σε χρόνο επώασης μία ώρα, η διαφορά που παρατηρείται είναι αισθητή. Πιο συγκεκριμένα, η πάροδος μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος μέχρι τη στιγμή της μέτρησης της απορρόφησης του DPPH στα δείγματα, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής του IC₅₀ για το ίδιο εκχύλισμα. Και αυτό το φαινόμενο είναι λογικό, δεδομένου ότι, όσο περισσότερος χρόνος περνά και τα αντιοξειδωτικά των εκχυλισμάτων σαρώνουν τις ρίζες του DPPH, στο σταθερό όγκο των διαλυμάτων που αποτελούν τα δείγματα η ποσότητα των ριζών (και άρα η συγκέντρωσή τους) ελαττώνεται σημαντικά, ενώ των εκχυλισμάτων προφανώς παραμένει η ίδια, όσος χρόνος και αν περάσει. Δηλαδή, η ίδια περιεκτικότητα διαλύματος σε εκχύλισμα επιτυγχάνει μεγαλύτερη επί τοις εκατό σάρωση, όταν ο χρόνος επώασης είναι μεγαλύτερος και, κατ' επέκταση, για να ανασταλεί (σαρωθεί) το 50% της αρχικής ποσότητας των ριζών DPPH, απαιτείται μικρότερη περιεκτικότητα διαλύματος σε εκχύλισμα. Μια πιθανή εξήγηση για αυτήν την παρατήρηση θα μπορούσε να είναι τόσο η παρουσία στα εκχυλίσματα μεγάλων μορίων τα οποία χρειάζονται περισσότερο χρόνο μέχρις ότου δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες, όσο και η δράση του DES στα εκχυλίσματα ως αποθηκευτικού μέσου μορίων (όπως έχει προαναφερθεί στο Θεωρητικό Μέρος), τα οποία αποδεσμεύονται σταδιακά κατά την επώαση.

Το αρκετά υψηλό ιξώδες του χρησιμοποιηθέντος βαθέως ευτηκτικού διαλύτη και, κατ' επέκταση, των εκχυλισμάτων, και ειδικά αυτών που προέκυψαν από τη χρήση ως εκχυλιστικού μέσου διαλύτη με υψηλή αναλογία όγκων DES/νερού, μπορεί να επιφέρει απώλειες εκχυλίσματος κατά τη μεταφορά του στο micro-plate, να δώσει μη ακριβείς τιμές απορρόφησης και κατά συνέπεια μη αξιόπιστα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πειραματικά πως, εξαιτίας της υψηλής τιμής του ιξώδους ενός πυκνού stock διαλύματος, μπορεί να προκύπτουν αρνητικές τιμές IC₅₀, που δεν έχουν φυσική σημασία, ή να εμφανίζεται μια αντίστροφη τάση στη συσχέτιση της % αναστολής της ρίζας DPPH και της συγκέντρωσης των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων (δηλαδή μπορεί να σχηματίζεται

καμπύλη φθίνουσα, δηλώνοντας ότι, όσο αραιότερο είναι το διάλυμα του εκχυλίσματος, τόσο μεγαλύτερη σάρωση επιτυγχάνει, το οποίο δεν είναι λογικό).

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα του Παραρτήματος I, σε κάποιες πειραματικές σειρές έχουν αφαιρεθεί από τις καμπύλες ακόμα και δύο πειραματικά σημεία, επειδή δεν προσαρμόζονταν κατάλληλα στο μοντέλο, γεγονός που επίσης συνδέεται με το υψηλό ιξώδες του NaDES. Παρότι διαγράμματα με ελάχιστα πειραματικά σημεία δεν είναι αξιόπιστα, είναι χρήσιμα για την παρακολούθηση της τάσης της συσχέτισης ανάμεσα στα μελετούμενα μεγέθη (% αναστολή της ρίζας DPPH και συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος).

Από τα παραπάνω πρώτα πειραματικά δεδομένα, παρατηρείται πως το ιξώδες του χρησιμοποιούμενου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη και, κατ' επέκταση, των εκχυλισμάτων, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα σφαλμάτων κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δοκιμής DPPH. Για το λόγο αυτό, κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν, για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου και να μειωθεί το σφάλμα.

Αξιοποιώντας την εμπειρία μας από τις εκχυλίσεις στο λουτρό υπερήχων και λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του ιξώδους του stock διαλύματος των εκχυλισμάτων στα αποτελέσματα, αποφασίστηκε στη δεύτερη σειρά πειραμάτων (στο probe), η αραιώση των εκχυλισμάτων με σκοπό τη δημιουργία του αρχικού διαλύματος να είναι ακραία (συγκέντρωση 0,02 μl εκχυλίσματος/μl διαλύματος), προκειμένου το ιξώδες του να είναι σημαντικά μειωμένο. Ένας ακόμη παράγοντας που αποτέλεσε αιτία για την απόφαση αυτή, είναι το γεγονός ότι το χρησιμοποιούμενο NaDES λειτουργεί ως αποθηκευτικό μέσο για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις που έχουν εκχυλισθεί, οπότε πιθανώς η σάρωση των ριζών από αυτές καθυστερεί, γιατί βρίσκονται «προστατευμένες» στο βαθέως ευτηκτικό διαλύτη.

3.2.2. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων

Στο Παράρτημα II, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα γραφήματα για τα εκχυλίσματα που προήλθαν από την εκχύλιση στο probe των υπερήχων, δηλαδή τα διαγράμματα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκάστοτε εκχυλίσματος, για τους δύο χρόνους επώασης των δειγμάτων, για μισή και μία ώρα.

Σημειώνεται ότι, στη δεύτερη αυτή σειρά πειραμάτων, η συγκέντρωση των αρχικών διαλυμάτων εκχυλισμάτων (stock), τα οποία ύστερα αραιώθηκαν για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση, ήταν κάθε φορά η ίδια και ίση με 0,02 μl εκχυλίσματος/μl διαλύματος. Η επιλογή της συγκέντρωσης αυτής είναι αποτέλεσμα πολλών δοκιμών και έχει ως στόχο την ελάττωση του ιξώδους των δειγμάτων και άρα τη βελτίωση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, την επίτευξη της επιθυμητής τάσης στη συσχέτιση σάρωσης – συγκέντρωσης διαλύματος εκχυλίσματος και την εξαγωγή φυσιολογικών αποτελεσμάτων (τιμών IC_{50} αντιοξειδωτικής δράσης), σε σχέση με την πρώτη σειρά πειραμάτων στο λουτρό. Διαλύτης στο stock διάλυμα είναι η αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στο plate για τη δημιουργία των δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων ($0,8 \cdot C_{stock}$, $0,6 \cdot C_{stock}$, $0,4 \cdot C_{stock}$, $0,2 \cdot C_{stock}$).

Όπως είναι εμφανές από τα διαγράμματα αυτά, πράγματι με την ελάττωση της συγκέντρωσης του stock διαλύματος βελτιώθηκε η προσαρμογή των πειραματικών σημείων στο γραμμικό μοντέλο. Αυτό δηλώνεται τόσο από την παρουσία και των πέντε πειραματικών σημείων στις καμπύλες (πλην ελαχίστων εξαιρέσεων), όσο και από τους υψηλότερους εν γένει συντελεστές προσδιορισμού (είναι μεγαλύτερη η μερίδα των γραφημάτων στη δεύτερη σειρά πειραμάτων που εμφανίζουν $R^2 > 0,99$, σε

σχέση με την πρώτη σειρά). Η τάση που προκύπτει φαίνεται να είναι η αναμενόμενη, δηλαδή για αυξανόμενη συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος σημειώνεται αυξανόμενη επί τοις εκατό αναστολή, και τέλος η σχέση μεταξύ των μεγεθών αυτών διέπεται κάθε φορά από εξίσωση ευθείας.

Στον Πίνακα 8 δίνεται για κάθε εκχύλισμα η τιμή του δείκτη IC₅₀, όπως αυτή υπολογίζεται γραφικά για τους δύο χρόνους επώασης.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH στα εκχυλίσματα από το probe υπερήχων.

Κωδικός εκχυλίσματος	Αντιοξειδωτική δράση (δοκιμή DPPH) IC ₅₀ (μl εκχ./ml δ.)	
	30 min	60 min
STK12a	30 min	14,83
	60 min	12,26
STK12b	30 min	15,95
	60 min	12,47
STK13a	30 min	15,91
	60 min	12,02
STK13b	30 min	20,33
	60 min	11,71
STK15	30 min	16,45
	60 min	12,28
STK16	30 min	13,64
	60 min	9,82
STK18a	30 min	11,84
	60 min	8,90
STK18b	30 min	18,08
	60 min	12,24
STK18c	30 min	15,58
	60 min	12,91
STK20	30 min	15,03
	60 min	12,60
STK21	30 min	13,35
	60 min	10,15
STK22	30 min	18,56
	60 min	14,00
STK23	30 min	11,76
	60 min	9,26
STK24	30 min	16,99
	60 min	15,16
STK25	30 min	24,19
	60 min	18,79

Από τις παραπάνω τιμές IC₅₀ που προκύπτουν από τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η χαμηλότερη (8,90 μl εκχ./ml δ.) είναι εκείνη του εκχυλίσματος STK18a για χρόνο επώασης 60 min, ενώ η υψηλότερη (24,19 μl εκχ./ml δ.) είναι αυτή του εκχυλίσματος STK25 για χρόνο επώασης 30 min. Σε επόμενη ενότητα (§3.2.8.) υπάρχει συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων με βάση τον οποίο γίνεται σχολιασμός αυτών.

3.2.3. Αντιοξειδωτική ικανότητα συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης

Τα γραφήματα από τα οποία υπολογίζεται η τιμή IC_{50} , για χρόνο επώασης δειγμάτων μισή και μία ώρα, παρουσιάζονται και για εκχύλισμα 6-τζιντζερόλης που προκύπτει συμβατικά στο εργαστήριο σε στήλη, με σκοπό να γίνει σύγκριση της αντιοξειδωτικής του δράσης με αυτήν των παραπάνω εκχυλισμάτων. Τα διαγράμματα αυτά για την 6-τζιντζερόλη βρίσκονται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Σημειώνεται ότι σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση του stock διαλύματος τζιντζερόλης από τη συμβατική εκχύλιση είναι 0,1 mg/ml (ως διαλύτης έχει χρησιμοποιηθεί αιθανόλη, όπως και στα διαλύματα των εκχυλισμάτων που περιέχουν DES).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα δοκιμής DPPH σε 6-τζιντζερόλη απομονωμένη με συμβατική μέθοδο εκχύλισης.

Αντιοξειδωτική δράση (δοκιμή DPPH) IC_{50} (μg 6-τζιντζερόλης/ml δ.)	
30 min	28,29
60 min	21,98

Στο Παράρτημα ΙΙΙ παρατίθεται επίσης το αντίστοιχο διάγραμμα αναστολής-συγκέντρωσης της ένωσης κουρκουμίνης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,01mg/ml. Η τιμή του δείκτη IC_{50} της κουρκουμίνης από τη μέθοδο DPPH προέκυψε ίση με 4,13 μg κουρκουμίνης/ml διαλύματος.

Υπολογίστηκε, επιπλέον, η τιμή IC_{50} του χρησιμοποιούμενου NaDES Bet-La, για να διαπιστωθεί εάν συνεισφέρει και αυτό στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων στα οποία είναι παρόν. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι $IC_{50, \text{Bet-La}}=328\text{mg NaDES/ml}$ διαλύματος. Η τιμή αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες των εκχυλισμάτων που υπολογίστηκαν παραπάνω γραφικά, που σημαίνει ότι ο διαλύτης αυτός δεν έχει αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς η δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται αποκλειστικά στις ενώσεις που έχουν εκχυλιστεί από το τζιντζερ. Το NaDES λειτουργεί απλώς ως αποθηκευτικό μέσο των ενώσεων αυτών και, θεωρώντας ότι είναι βιοσυμβατό λόγω της φυσικής προέλευσης των συστατικών του, δεν απαιτείται διαχωρισμός του από τα εκχυλίσματα.

3.2.4. Οπτική παρατήρηση της σάρωσης τως ριζών DPPH από αντιοξειδωτικές ενώσεις

Όπως είναι γνωστό, το αλκοολικό διάλυμα του DPPH πριν έρθει σε επαφή είτε με εκχύλισμα που έχει προκύψει με πράσινη μέθοδο από τζιντζερ είτε με το εκχύλισμα που έχει προκύψει συμβατικά, έχει σκούρο ιώδες χρώμα, δεδομένου ότι είναι σχετικά πυκνό (0,1 mg/ml). Τα μεν εκχυλίσματα είναι συνήθως ανοιχτά κίτρινα όταν δεν έχουν ακόμα υποστεί αραίωση για το σχηματισμό του stock διαλύματος, ενώ τα stock διαλύματα είναι σχεδόν άχρωμα λόγω της πολύ μικρής περιεκτικότητάς τους σε εκχύλισμα. Η τζιντζερόλη όπως προκύπτει από τη συμβατική διεργασία εκχύλισης έχει ένα έντονο πορτοκαλί χρώμα και το διάλυμά της συγκέντρωσης 0,1 mg/ml είναι και αυτό ανοιχτό κίτρινο.

Η ακόλουθη εικόνα παριστάνει μία σειρά του micro-plate, στην οποία έχουν τοποθετηθεί δείγματα του εκχυλίσματος STK18a. Στις δύο πρώτες θέσεις της σειράς υπάρχουν διαλύματα που αποτελούνται από 100 μl stock διαλύματος και 100 μl διαλύματος DPPH, στις δύο επόμενες 100 μl DPPH έχουν προστεθεί σε 80 μl stock διαλύματος και 20 μl αιθανόλης κ.ο.κ., όπως προβλέπεται από την πειραματική διαδικασία. Όπως φαίνεται, λοιπόν, στην εικόνα, υπάρχει μια διαβάθμιση του

χρώματος των δειγμάτων και, πιο συγκεκριμένα, προχωρώντας δεξιά στη σειρά του micro-plate, το χρώμα των δειγμάτων γίνεται όλο και πιο σκούρο ιώδες, ακριβώς όπως αναμένεται να συμβαίνει. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του εκχυλίσματος στην κυψελίδα (αριστερές θέσεις της σειράς), τόσο περισσότερες ρίζες DPPH σαρώνονται και το διάλυμα χάνει την έντονη μωβ απόχρωσή του.



Εικόνα 6: Δείγματα του εκχυλίσματος STK18a σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν, μετά από χρόνο επώασης 60 min.

Ιδιαίτερα έντονος είναι ο αποχρωματισμός στην περίπτωση που το εξεταζόμενο εκχύλισμα είναι της τζιντζερόλης από τη συμβατική εκχύλιση (Εικόνα 7). Τα πυκνά διαλύματα των αριστερών κυψελίδων του plate έχουν χάσει πλήρως το ιώδες χρώμα τους και έχουν γίνει ανοιχτά κίτρινα, λόγω της εξαιρετικής αντιοξειδωτικής δράσης της τζιντζερόλης που μαρτυράται από την πολύ μικρή τιμή IC_{50} της.



Εικόνα 7: Δείγματα της συμβατικά εκχυλισμένης τζιντζερόλης σε micro-plate, σε σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν, μετά από χρόνο επώασης 60 min.

3.2.5. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC)

Στον ακόλουθο πίνακα καταγράφονται, για όλα τα εκχυλίσματα που παρελήφθησαν από το λουτρό υπερήχων, η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και η περιεκτικότητα σε φαινολικά (T. P. C.) ανά μονάδα μάζας της στερεής πρώτης ύλης.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών στα εκχυλίσματα από το λουτρό υπερήχων.

Κωδικός εκχυλίσματος	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg gal/L)	T. P. C. ($\mu\text{g gal/g ginger}$)
STK5	1,1919	19,67
STK7	0,6420	19,27
STK8	0,8470	11,98
STK10a	0,4596	13,69
STK10b	0,4106	12,31

3.2.6. Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC)

Όπως έγινε για τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την εκχύλιση στο λουτρό υπερήχων, έτσι και για εκείνα από το probe, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα η συγκέντρωση του κάθε

εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, καθώς και η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (T. P. C.) ανά μονάδα μάζας του στερεού τζίντζερ.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών στα εκχυλίσματα από το probe υπερήχων.

Κωδικός εκχυλίσματος	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg gal/L)	T. P. C. (μg gal/g ginger)
STK12a	0,9182	13,77
STK12b	0,8829	13,24
STK13a	1,0810	16,21
STK13b	1,2134	18,20
STK15	0,9393	18,79
STK16	1,4308	14,31
STK18a	1,2534	18,80
STK18b	1,0304	15,46
STK18c	1,0383	15,58
STK20	0,9327	18,65
STK21	1,2643	12,64
STK22	0,8239	8,24
STK23	1,1245	11,24
STK24	0,7314	14,63
STK25	0,6407	12,81

3.2.7. Παρατηρήσεις από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων από το λουτρό υπερήχων

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα (τιμές IC₅₀ για τους δύο χρόνους επώασης και TPC) για κάθε εκχύλισμα που προέκυψε στο λουτρό υπερήχων, μαζί με τις πειραματικές συνθήκες (χρόνος εκχύλισης, λόγος κατά μάζα DES/νερού στο διαλύτη, λόγος του όγκου διαλύτη προς τη μάζα στερεού τζίντζερ) που χαρακτηρίζουν κάθε εκχύλιση. Επιλέγεται να εμφανιστούν μόνο οι τιμές του IC₅₀ που προέκυψαν από τη μελέτη του εκάστοτε εκχυλίσματος ξεκινώντας από stock διάλυμα συγκέντρωσης 0,5 μl/μl.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα αξιολόγησης εκχυλισμάτων πρώτης σειράς πειραμάτων.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Αναλογία DES/νερού	Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς όγκο διαλύτη (mg ginger/ml solv)	Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδος DPPH) IC ₅₀ (μl εκχυλίσματος/ml δ.)		TPC (μg gal/g ginger)
				30 min:	60 min:	
STK4a	10	5 ml DES/1 ml H ₂ O	100/3	30 min:	53,36	-
STK5	30	2 g DES/1 g H ₂ O	200/3,3	30 min:	28,35	19,67
STK7	30	1 ml DES/1 ml H ₂ O	100/3	30 min:	111,17	19,27
				60 min:	40,30	

STK8	60	2 g DES/1 g H ₂ O	200/2,83	30 min:	201,43	11,98
				60 min:	61,31	
STK10a	30	2 g DES/1 g H ₂ O	100/3	30 min:	60,37	13,69
				60 min:	4,71	
STK10b	60	2 g DES/1 g H ₂ O	100/3	30 min:	11,08	12,31

- Παράμετρος του χρόνου εκχύλισης

Παρατηρούνται προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα και πραγματοποιείται μία σύντομη μελέτη ζευγών εκχυλίσεων που διέπονται από δύο πειραματικές συνθήκες – παραμέτρους με όμοιες τιμές και μία διαφορετική, προκειμένου να εξαχθούν κάποια γρήγορα συμπεράσματα για τον τρόπο που κάθε παράμετρος επηρεάζει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων και την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά. Έτσι, οι διεργασίες εκχύλισης που έδωσαν τα STK10a και STK10b, διαφέρουν μόνο ως προς το χρόνο εκχύλισης και οι άλλες δύο συνθήκες είναι οι ίδιες. Παρατηρείται ότι η το εκχύλισμα STK10b, που προέκυψε μετά από παραμονή στο λουτρό υπερήχων για περισσότερη ώρα από ό, τι το STK10a, χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη τιμή IC₅₀ (εξετάζονται μόνο οι χρόνοι επώασης 30 min, γιατί για αυτούς είναι διαθέσιμα αποτελέσματα για όλα τα εκχυλίσματα) και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά ανά μονάδα μάζας πρώτης ύλης. Αντιθέτως, το συμπέρασμα που προκύπτει από τη σύγκριση των εκχυλισμάτων STK5 και STK8, είναι ότι ο μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης που αντιστοιχεί στο STK8 δίνει μεγαλύτερη τιμή IC₅₀ και λιγότερα φαινολικά.

Παρότι, λοιπόν, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης φαίνεται να ελαττώνει την περιεκτικότητα σε φαινολικά του εκχυλίσματος, δεν είναι ξεκάθαρη η επιρροή του στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Η παράμετρος αυτή, λοιπόν, αξίζει να συμπεριληφθεί στις ανεξάρτητες μεταβλητές του πειραματικού σχεδιασμού που θα εφαρμοστεί στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, για να γίνει πιο εμφανής η εξάρτηση των αποτελεσμάτων από αυτήν.

- Παράμετρος της w/w αναλογίας του NaDES και του νερού στο διαλύτη εκχύλισης

Όσον αφορά στον παράγοντα αναλογία DES/νερού στο διαλύτη εκχύλισης, φαίνεται ότι με την αύξησή της ελαττώνει τόσο την τιμή IC₅₀ του εκχυλίσματος (επιτυγχάνει καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα), όσο και την περιεκτικότητά του σε φαινολικά. Αυτό είναι εμφανές από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων STK7 και STK10a. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία²², το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές ποιότητες των πολυφαινολών στα εκχυλίσματα. Οι φαινολικές ενώσεις είναι μεν γνωστές για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση, αλλά υπάρχουν δύο κριτήρια-κλειδιά που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους. Πρώτον, η δομή της φαινολικής ένωσης είναι ένα στοιχείο που καθορίζει την αποτελεσματικότητα της δράσης της. Παρότι αυτά τα μόρια μοιράζονται μια κοινή δομή (τον αρωματικό δακτύλιο και μία τουλάχιστον υδροξυλομάδα), συνήθως φέρουν υποκαταστάτες που ανήκουν σε χημικές ομάδες διαφορετικών ειδών, όπως υδροξυλίου, μεθοξυλίου, θεικής κ.ά. Η θέση και η φύση των υποκαταστατών αυτών επιδρούν σε μεγάλο βαθμό στη δράση των φαινολικών. Δεύτερον, είναι γνωστό ότι τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με συνέργεια ή/και ανταγωνιστικές διαδικασίες. Λόγω του μηχανισμού ανταγωνισμού, ένα μίγμα φαινολικών ενώσεων έχει σχετικά χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, ο συνδυασμός διαφορετικών δομών, καθώς και οι μεταξύ τους αναλογίες και αλληλεπιδράσεις (συνέργεια ή ανταγωνισμός), είναι οι λόγοι στους οποίους οφείλεται η διαφοροποίηση στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Σε κάθε περίπτωση, ο παράγοντας της αναλογίας DES/νερού θα μελετηθεί κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

- Παράμετρος της αναλογίας της μάζας πρώτης ύλης προς τον όγκο του διαλύτη

Σχετικά με την αναλογία της μάζας τζίντζερ προς τον όγκο του διαλύτη εκχύλισης, παρατηρείται πως, στα STK8 και STK10b, η αύξηση του λόγου (δηλαδή η χρήση περισσότερης στερεής πρώτης ύλης ανά μονάδα όγκου διαλύτη) επιφέρει αύξηση του IC_{50} και ελάττωση των φαινολικών, ενώ στην περίπτωση των STK5 και STK10a, η αύξηση της αναλογίας μειώνει το IC_{50} και ενισχύει την περιεκτικότητα σε φαινολικά. Και αυτή η συνθήκη, επομένως, πρόκειται να εξεταστεί ως ανεξάρτητη μεταβλητή στον πειραματικό σχεδιασμό τύπου Box-Behnken.

Το εκχύλισμα STK8 είναι αυτό που έχει τα πιο ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, δηλαδή έχει την υψηλότερη τιμή IC_{50} (201,43μl εκχ./ml δ. για χρόνο επώασης 30min) και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά (11,98μg gal/g ginger). Οι πειραματικές συνθήκες που το οδήγησαν στην κατάσταση αυτή είναι ο μεγαλύτερος επιλεγμένος προς εξέταση χρόνος εκχύλισης, η μεσαία τιμή αναλογίας μαζών DES και νερού και η υψηλή αναλογία στερεής πρώτης ύλης και εκχυλιστικού μέσου. Από αυτά τα πειράματα δεν είναι ξεκάθαρο ποιες συνθήκες οδηγούν στο βέλτιστο εκχύλισμα ως προς τις επιλεγμένες αποκρίσεις (καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, αυξημένη τιμή φαινολικών ενώσεων). Το STK10b έχει τη χαμηλότερη δυνατή τιμή IC_{50} για χρόνο επώασης 30 min (11,08μl εκχ./ml δ.), που δηλώνει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αλλά η περιεκτικότητά του σε φαινολικά είναι χαμηλή σε σχέση με άλλα εκχυλίσματα (12,31μg gal/g ginger). Αντιθέτως, τα περισσότερα φαινολικά (19,67μg gal/g ginger) παρουσιάζει το STK5, που έχει τη δεύτερη χαμηλότερη τιμή IC_{50} (28,35μl εκχ./ml δ.).

Συμπερασματικά, τα πειράματα στο λουτρό υπερήχων δεν ήταν αρκετά για την εξαγωγή πρόχειρων συμπερασμάτων για την επίδραση των διαφόρων συνθηκών στα χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων. Υπεύθυνος μπορεί να θεωρηθεί ο μικρός αριθμός τους αλλά και ο καθοριστικός ρόλος του ιξώδους των εκχυλισμάτων, όπως έχει προαναφερθεί.

Με βάση αυτά τα προκαταρκτικά πειραματικά δεδομένα, σχεδιάστηκε η δεύτερη σειρά πειραμάτων και επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί πειραματικός σχεδιασμός 3^3 , που απαιτεί την εκπόνηση δεκαπέντε εκχυλίσεων, οι οποίες έλαβαν χώρα σε probe υπερήχων, που ως γνωστόν παράγει κύματα σημαντικά υψηλότερης ισχύος από ό,τι το λουτρό, άρα οι εκχυλίσεις αναμένονταν να έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Η επιλογή των τριών τιμών χρόνου εκχύλισης έγινε με το σκεπτικό ότι, μικρότεροι χρόνοι στο probe από ό,τι στο λουτρό είναι κατάλληλοι, λόγω της μεγάλης ισχύος των υπερήχων. Η αναλογία DES και νερού στο διαλύτη εκχύλισης ενισχύθηκε σε σχέση με την πρώτη σειρά πειραμάτων. Επιλέχθηκε η περιεκτικότητα σε νερό του συστήματος DES/H₂O να μην είναι υψηλή (συγκεκριμένα οι τιμές που της δόθηκαν είναι 10%, 20% και 30% w/w), δεδομένου ότι το νερό δεν είναι καλός διαλύτης των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στο τζίντζερ (π. χ. τζιντζερόλη και σογκαόλη) και, συνεπώς, μεγαλύτερη συγκέντρωση νερού στο διαλύτη εκχύλισης θα οδηγούσε σε μικρότερη εκχυλιστική ικανότητα αυτού. Τέλος, η αναλογία πρώτης ύλης και υγρού διαλύτη αποφασίστηκε να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την πρώτη σειρά.

3.2.8. Διαπιστώσεις από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων από το probe υπερήχων

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων που προέρχονται από το probe των υπερήχων. Πιο αναλυτικά, καταγράφονται οι τιμές του IC_{50} των εκχυλισμάτων και για τους δύο χρόνους επώασης, σε μονάδες mg

εκχυλίσματος/ml διαλύματος, καθώς συγκεκριμένος όγκος κάθε εκχυλίσματος έχει ζυγιστεί και συνεπώς έχει γίνει ένας πρώτος ενδεικτικός υπολογισμός της πυκνότητας του κάθε εκχυλίσματος ξεχωριστά. Στον ίδιο πίνακα δίνονται και οι περιεκτικότητες σε φαινολικές ενώσεις ανά μονάδα μάζας τζίντζερ. Σημειώνονται σε κάθε περίπτωση οι πειραματικές συνθήκες – παράμετροι και ο συμβολισμός της κάθε εκχύλισης κατά τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα αξιολόγησης εκχυλισμάτων από τη δεύτερη σειρά πειραμάτων.

Κωδικός πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (min)	Αναλογία μαζών DES/νερού	Αναλογία όγκου διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης (ml solvent/g ginger)	Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδος DPPH) IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ml δ.)		TPC (μg gal/g ginger)
					30 min	60 min	
STK12a	--0	10	70/30	3/0,20	14,98	12,39	13,77
STK12b	+ - 0	20	70/30	3/0,20	16,99	13,28	13,24
STK13a	- + 0	10	90/10	3/0,20	13,20	9,97	16,21
STK13b	+ + 0	20	90/10	3/0,20	16,26	9,37	18,20
STK15	- 0 +	10	80/20	3/0,15	17,24	12,87	18,79
STK16	- 0 -	10	80/20	2,5/0,25	14,07	10,14	14,31
STK18a	0 0 0	15	80/20	3/0,20	13,72	10,31	18,80
STK18b	0 0 0	15	80/20	3/0,20	18,64	12,62	15,46
STK18c	0 0 0	15	80/20	3/0,20	17,10	14,17	15,58
STK20	+ 0 +	20	80/20	3/0,15	16,61	13,92	18,65
STK21	0 - -	15	70/30	2,5/0,25	13,75	10,45	12,64
STK22	+ 0 -	20	80/20	2,5/0,25	19,60	14,77	8,24
STK23	0 + -	15	90/10	2,5/0,25	17,28	13,62	11,24
STK24	0 - +	15	70/30	3/0,15	22,00	19,63	14,63
STK25	0 + +	15	90/10	3/0,15	23,95	18,60	12,81

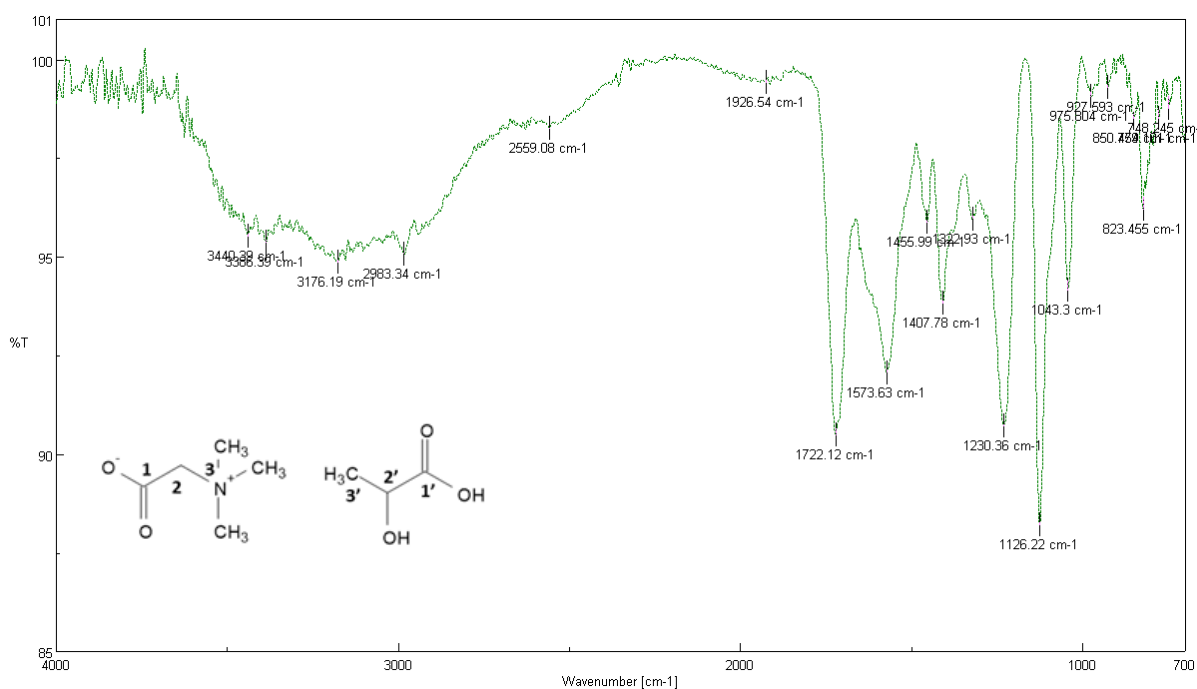
Σημειώνονται:

- IC_{50, Bet-La}=328 mg NaDES/ml διαλύματος,
- IC_{50, απομονωμένης 6-τζιντζερόλης, 30 min}= 28,29 μg 6-τζιντζερόλης/ml διαλύματος,
- IC_{50, απομονωμένης 6-τζιντζερόλης, 60 min}= 21,98 μg 6-τζιντζερόλης/ml διαλύματος.

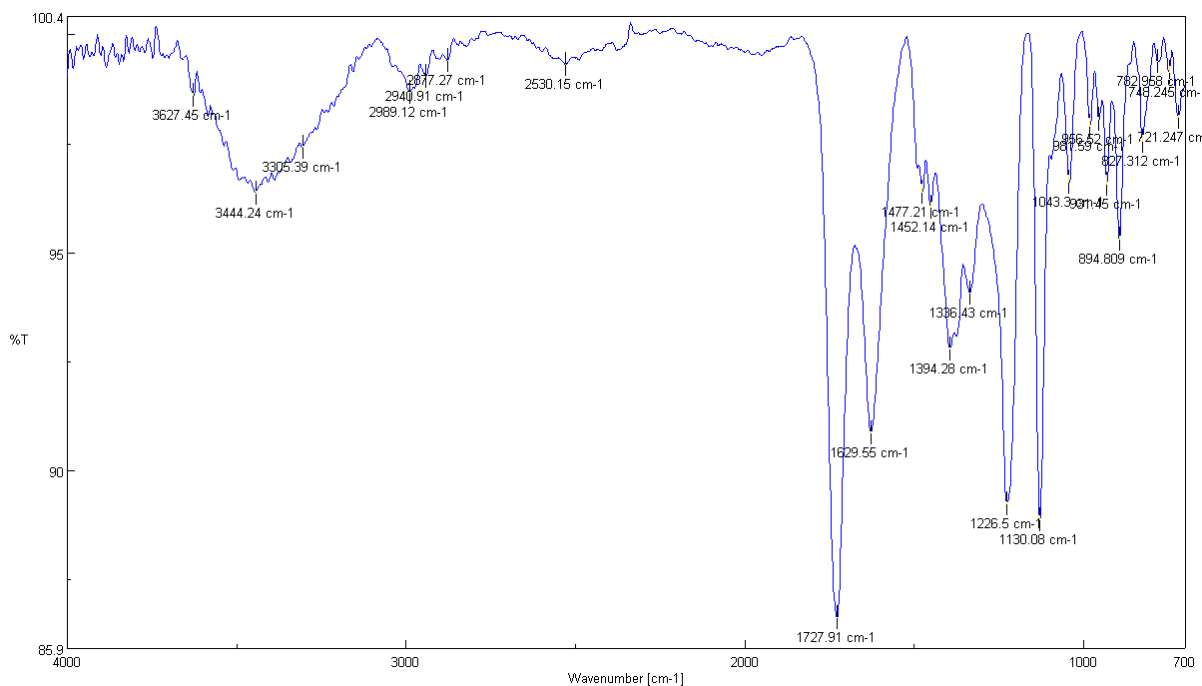
Με μια πρώτη ματιά, παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, διαπιστώνεται ότι κανένα από τα παραπάνω εκχυλίσματα που μελετήθηκαν με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό δεν έχει βέλτιστες και τις δύο αποκρίσεις ταυτόχρονα, δηλαδή και τη μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά και την ελάχιστη τιμή IC₅₀. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της διεργασίας με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει, η οποία πραγματοποιείται στη συνέχεια (§3.4.2.). Το εκχύλισμα STK18a είναι αρκετά καλό, καθώς έχει το μεγαλύτερο από όλα τα υπόλοιπα φαινολικό φορτίο (18,80 µg gal/g ginger) και η τιμή IC₅₀ του είναι σημαντικά χαμηλή (13,72 mg εκχυλίσματος/ml δ. για χρόνο επώασης 30 min και 10,31 mg εκχυλίσματος/ml δ. για χρόνο επώασης 60 min). Τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ για χρόνο επώασης 30 min έχει το εκχύλισμα STK13a (13,20 mg εκχυλίσματος/ml δ.) και για 60 min το STK13b (9,37 mg εκχυλίσματος/ml δ.), ενώ τη χαμηλότερη τιμή περιεκτικότητας σε φαινολικά έχει το STK22 (8,24 µg gal/g ginger). Το εκχύλισμα STK25 είναι το πλέον ανεπιθύμητο, καθώς έχει την υψηλότερη τιμή IC₅₀ για χρόνο επώασης 30 min (23,95 mg εκχυλίσματος/ml δ.) και πολύ χαμηλά φαινολικά (12,81 µg gal/g ginger).

3.2.9. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (FTIR-ATR) για το χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος STK18a

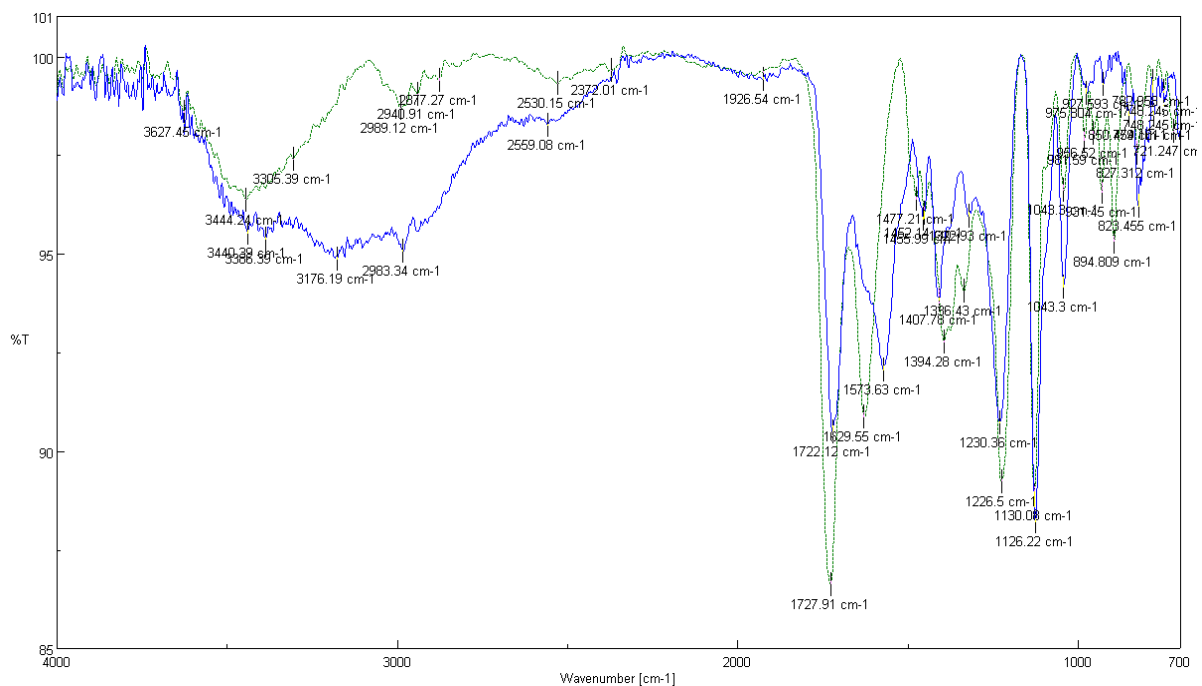
Στα Γραφήματα 7-9 γίνεται σύγκριση των φασμάτων FT-IR (ATR) για το NaDES Bet-La (Γράφημα 7) και το εκχύλισμα STK18a (Γράφημα 8). Επιλέχθηκε ενδεικτικά το εκχύλισμα STK18a καθώς χαρακτηρίζεται από το υψηλότερο ολικό φαινολικό φορτίο και αρκετά καλή αντιοξειδωτική ικανότητα και για τους δύο χρόνους επώασης. Ο χαρακτηρισμός μέσω FT-IR του εκχυλίσματος τζίντζερ με Bet-La δεν είναι εύκολος, καθώς στο φάσμα υπερτερούν οι κορυφές του διαλύτη και επίσης δεν είναι γνωστό το πλήθος των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Συνεπώς, μέσω της σύγκρισης των φασμάτων θα δοθεί έμφαση στις μετατοπίσεις των κορυφών του NaDES, οι οποίες αποτελούν μια ένδειξη των χαρακτηριστικών ομάδων του διαλύτη που αλληλεπιδρούν με τις εκχυλιζόμενες ενώσεις. Στο συγκριτικό Γράφημα 9 γίνονται πιο εμφανείς οι μεταξύ τους διαφορές.



Γράφημα 7: Φάσμα FTIR-ATR του NaDES Bet-La (1:2).



Γράφημα 8: Φάσμα FTIR-ATR του εκχυλίσματος STK18a.



Γράφημα 9: Επικαλυπτόμενα φάσματα FTIR-ATR του NaDES Bet-La (1:2) και του εκχυλίσματος STK18a.

Αρχικά, στο Γράφημα 8, παρατηρούνται δυο κορυφές στα 2989,12 και 2940,91 cm^{-1} , πολύ κοντά στην κορυφή των 3444 cm^{-1} (που μπορεί να οφείλεται σε υδροξύλια που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου). Οι κορυφές στο εύρος 2975 – 2950 cm^{-1} θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε δόνηση τάσης $-\text{CH}$ αλδευδών.

Η κορυφή στα 1722 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική για την ασύμμετρη δόνηση τάσης $\text{C}=\text{O}$ των καρβονυλίων, ενώ στα 1130 cm^{-1} παρατηρείται η ταλάντωση $\text{C}-\text{O}$ των οξέων. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως και οι δύο αυτές κορυφές είναι μετατοπισμένες συγκριτικά με το γράφημα που

προκύπτει από το σκέτο NaDES, φαινόμενο ενδεικτικό της αλληλεπίδρασης των χαρακτηριστικών αυτών ομάδων με τις εκχυλισμένες ενώσεις.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η κορυφή του εκχυλίσματος στα $1727,91\text{cm}^{-1}$ είναι ελαφρώς μετατοπισμένη αλλά και υψηλότερης έντασης συγκριτικά με αυτή που συναντάται στο NaDES, στα $1722,12\text{cm}^{-1}$. Οι δεσμοί C=O, υπάρχουν και στα δύο δείγματα (NaDES και εκχύλισμα) και για αυτό η ένταση της κορυφής στην οποία αποδίδονται είναι μεγαλύτερη στο γράφημα του εκχυλίσματος.

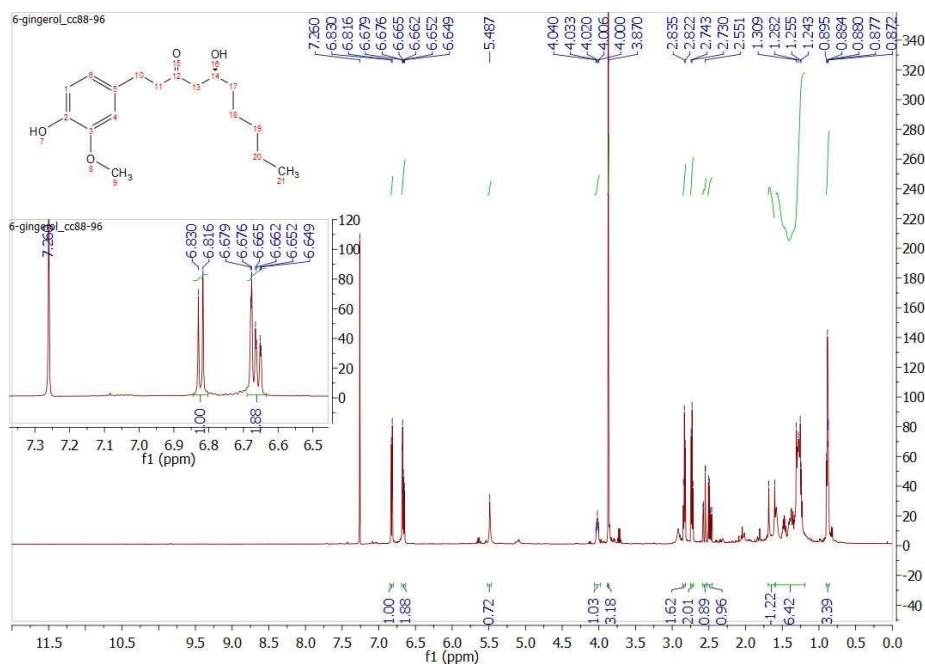
Στο εύρος κυματαριθμών $1477 - 1043\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται διακριτές κορυφές, οι οποίες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του αρχικού διαλύτη είναι περισσότερες ή και μετατοπισμένες. Η περιοχή αυτή είναι χαρακτηριστική για τις απορροφήσεις C=C αρωματικού δακτυλίου καθώς και C-O, άρα είναι πιθανό η έντασή τους να ενισχύεται παρουσία των συστατικών του εκχυλίσματος.

Πιο συγκεκριμένα, στο εύρος αυτό, χαρακτηριστική είναι η κορυφή στα $1477,21\text{cm}^{-1}$ στο φάσμα του εκχυλίσματος (η οποία δεν εμφανίζεται στο φάσμα του NaDES). Η κορυφή αυτή μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης (stretching vibration) του διπλού δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου, ο οποίος είναι παρών στο εκχύλισμα, λόγω των φαινολικών ενώσεων που εκχυλίστηκαν.

3.3. Δομικός χαρακτηρισμός συμβατικά εκχυλισμένων ενώσεων

Οι ενώσεις που απομονώθηκαν από το τζίντζερ έπειτα από χρωματογραφία στήλης στο εργαστήριο, δηλαδή η 6-τζιντζερόλη και 6-σογκαόλη, υπέστησαν δομικό χαρακτηρισμό με ^1H NMR και LC-MS αντιστοίχως. Ο χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην περίπτωση που πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός τους στα εκχυλίσματα, με τη χρήση αυτών ως προτύπων.

3.3.1. Φάσμα ^1H NMR της 6-τζιντζερόλης



Γράφημα 10: Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) της 6-τζιντζερόλης.

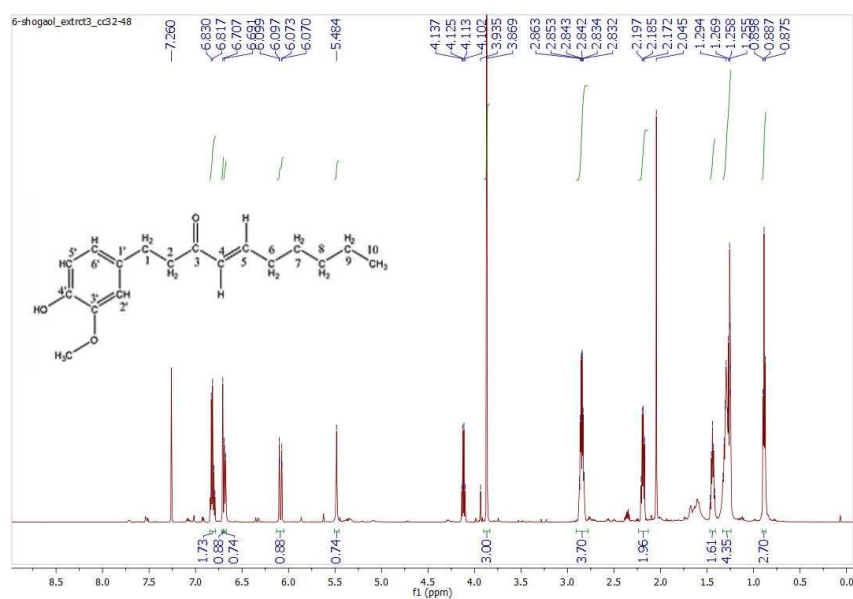
Ο χαρακτηρισμός του παραπάνω φάσματος (Γράφημα 10) είναι: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6,82 (d, $J=8,4\text{Hz}$, H-1), 6,66 (m, 2H, H-4 & H-6) 5,49 (s, 1H, OH), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 2,83 (t, $J=7,5\text{Hz}$, 2H, H-11), 2,73 (t, $J=7,5\text{Hz}$, 2H, H-10), 2,58-2,55 (d, $J=3,0\text{Hz}$, 2H, H-13), 1,68-1,24 (H-17 - H-20), 0,88 (m, 3H, H-21).

Ξεκινώντας από τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία, η κορυφή που συναντάται στα 7,26ppm αντιστοιχεί στο χρησιμοποιούμενο δευτεριωμένο διαλύτη (δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, CDCl_3). Ύστερα παρατηρείται η κορυφή στα 6,82ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1 του αρωματικού δακτυλίου της 6-τζιντζερόλης, δηλαδή στο πρωτόνιο που βρίσκεται δίπλα στην υδροξυλομάδα του δακτυλίου. Η κορυφή αυτή είναι διπλή γιατί το πρωτόνιο αυτό γειτνιάζει με ένα πρωτόνιο (αυτό της θέσης 6 του δακτυλίου) και ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο.

Ακολουθεί η πολλαπλή κορυφή στα 6,66ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και συνεπώς αντιστοιχεί στα άλλα δύο πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου (των θέσεων 4 και 6). Η κορυφή στα 5,49ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της υδροξυλομάδας του αρωματικού δακτυλίου, που είναι συνδεδεμένη με τον άνθρακα της θέσης 2. Η κορυφή ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και είναι απλή, γιατί αυτό δε γειτνιάζει με κανένα άλλο πρωτόνιο. Η υψηλή απλή κορυφή στα 3,87ppm ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και επομένως αντιστοιχεί στη μεθύξυ ομάδα του αρωματικού δακτυλίου.

Στη συνέχεια συναντώνται δύο τριπλές κορυφές που ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια έκαστη. Έτσι, η κορυφή στα 2,83ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 11 (δίπλα στο καρβονύλιο), που λόγω αυτού είναι πιο αποπροστατευμένα, ενώ η κορυφή στα 2,73ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 10 (τα συνδεδεμένα στον άνθρακα που συνδέεται με τον αρωματικό δακτύλιο). Στις συχνότητες 2,58-2,55ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στον άνθρακα 13, ενώ τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας (θέσεις 17-20) αναπαρίστανται από τις κορυφές στο εύρος 1,684-1,243ppm. Η πολλαπλή κορυφή στα 0,88ppm αντιστοιχεί στο προστατευμένο μεθύλιο της θέσης 21, καθώς ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια.

3.3.2. Φάσμα ^1H NMR της 6-σογκαόλης



Γράφημα 11: Φάσμα ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) της 6-σογκαόλης.

Ο χαρακτηρισμός του παραπάνω φάσματος (Γράφημα 11) είναι: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.83-6.79 (m, 2H, H-5' & H-6'), 6.71 (s, 1H,), 6.69 – 6.67 (m, 1H, H-4), 6.08 (dd, $J = 15.9, 1.4\text{Hz}$, 1H, H-5), 5.48 (s, 1H, OH), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.93 – 2.74 (m, 4H, H-1 & H-2), 2.20-2.17 (m, 2H, H-6), 1.44 (m, 2H, H-7), 1.36 – 1.17 (m, 4H, H-8 & H-9), 0.89 (t, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H, H-10).

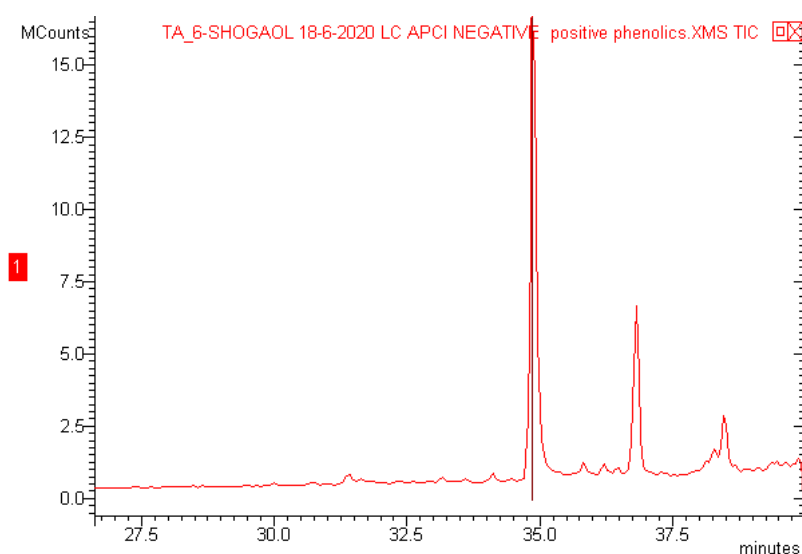
Αναλυτικότερα, ξεκινώντας από τα χαμηλά μαγνητικά πεδία, η απλή κορυφή στα 7,26ppm αντιστοιχεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη CDCl_3 , ενώ στο εύρος 6,6-6,8ppm συναντώνται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα τρία πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου της ένωσης και στο βινυλικό πρωτόνιο της θέσης 5. Το δεύτερο βινυλικό πρωτόνιο της θέσης 4 συναντάται δίνοντας μια διπλή κορυφή στα 6,08ppm για σταθερά σύζευξης $J=15,9\text{Hz}$.

Στα 5,48ppm απαντάται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της υδροξυλομάδας. Η μεγάλης έντασης απλή κορυφή στα 3,87ppm ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και χαρακτηρίζει τα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας του αρωματικού δακτυλίου, που δε γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια.

Στα υψηλότερα πεδία συναντώνται τα πρωτόνια των μεθυλίων της αλειφατικής αλυσίδας της ένωσης. Στα 2,84ppm συναντάται μία πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τέσσερα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 1 και 2 της αλυσίδας, ενώ η κορυφή στα 2,19ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 6. Η πολλαπλή κορυφή στη συχνότητα 1,44ppm ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και χαρακτηρίζει εκείνα της θέσης 7, ενώ η πολλαπλή στα 1,28ppm, που ολοκληρώνεται για τέσσερα πρωτόνια, αντιστοιχεί σε αυτά των θέσεων 8 και 9. Η χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 0,89ppm ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πιο προστατευμένα πρωτόνια της θέσης 10 του μορίου της 6-σογκαόλης. Είναι τριπλή, γιατί ο γειτονικός του άνθρακας 9 φέρει δύο πρωτόνια.

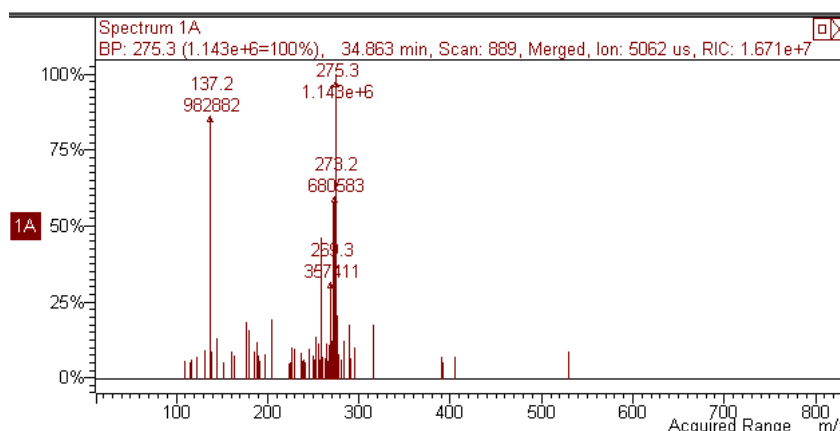
3.3.3. Φάσμα LC-MS της 6-σογκαόλης

Για τα φάσματα LC-MS χρησιμοποιήθηκε η στήλη BDSHYPERSIL C18, Dim (mm): 250x4.6.



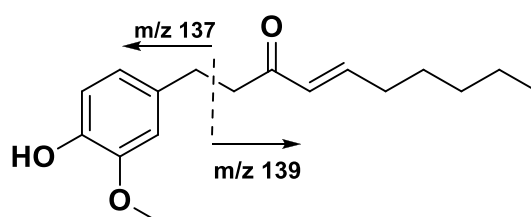
Γράφημα 12: Χρωματογράφημα της συμβατικά απομονωμένης 6-σογκαόλης.

Στο παραπάνω διάγραμμα LC-MS της εξεταζόμενης ένωσης διακρίνονται κυρίως δύο κορυφές, η πρώτη εκ των οποίων αντιστοιχεί σε χρόνο έκλουσης 34,86min και η άλλη σε χρόνο 36,82min. Η κορυφή με την υψηλότερη ένταση, όπως υποδεικνύεται από το φάσμα μάζας (Γράφημα 13), αντιστοιχεί στην 6-σογκαόλη.



Γράφημα 13: Φάσμα MS της 6-σογκαόλης.

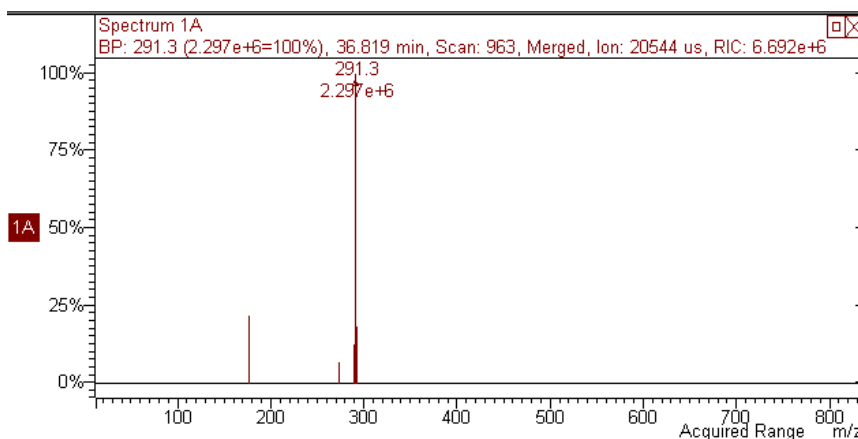
Στο φάσμα αυτό (Γράφημα 13), παρατηρούνται δύο κύρια θραύσματα: ένα σε λόγο $m/z=275$ και ένα σε λόγο $m/z=137$. Είναι γνωστό ότι το μοριακό βάρος της 6-σογκαόλης είναι 276,17 ($C_{17}H_{24}O_3$). Το σήμα σε m/z 275, λοιπόν, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν $[M-H]^-$, ενώ το σήμα σε m/z 137 χαρακτηρίζει το ιόν $[M-139]^-$, το οποίο προκύπτει από τη σχάση που απεικονίζεται ακολούθως (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Σχάση του μορίου της 6-σογκαόλης.

Συνεπώς, επιβεβαιώνεται ότι η ένωση σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο συμβατικό εκχύλισμα είναι η 6-σογκαόλη.

Σχετικά με το σήμα του χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί σε χρόνο έκλουσης 36,82min, στο φάσμα MS (Γράφημα 14) παρατηρείται ένα σήμα σε λόγο m/z 291. Αυτό μπορεί να αντιστοιχεί σε δύο ενώσεις: την 6-υδροξυ-6-σογκαόλη ή την 6-τζιντζερδιόνη, οι οποίες έχουν το ίδιο μοριακό ιόν $[M-H]^-$, σύμφωνα με διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα.²⁶



Γράφημα 14: Φάσμα MS της 6-υδροξυ-6-σογκαόλης/6-τζιντζερδιόνης.

3.4. Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiment, DoE)

3.4.1. Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

Τα 15 πειράματα τα οποία εκπονήθηκαν στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, προέκυψαν ύστερα από υπόδειξη του χρησιμοποιούμενου λογισμικού, Design Expert. Επιλέχθηκαν να γίνουν τρεις επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Αφού συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα-τιμές των αποκρίσεων (τιμή IC₅₀ για τους δύο χρόνους επώασης δειγμάτων από τη μέθοδο DPPH και TPC), πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση αυτών και εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση.

3.4.1.1. 1^η απόκριση: IC₅₀ εκχυλισμάτων για χρόνο επώασης 30 min (IC₅₀ (30 min incubation))

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής reduced quadratic model, δηλαδή απλοποιημένο τετραγωνικό. Δηλαδή, η αρχική μορφή της εξίσωσης που το διέπει περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B² και C², όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές (έχει οριστεί με A να κωδικοποιείται ο χρόνος εκχύλισης, με B η κατά βάρος περιεκτικότητα του DES στο διαλύτη εκχύλισης σε g DES/g διαλύτη και με C η αναλογία υγρού/στερεού σε ml/g), και από τη μορφή αυτή αφαιρούνται σταδιακά οι όροι που δεν είναι σημαντικοί (έχουν υψηλά p-values) και που επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι B, AB και BC. Φαίνεται ότι κανένας από τους εναπομείναντες όρους δεν έχει p-value χαμηλότερο από 0,05 και συνεπώς δεν είναι σημαντικός για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας >95%. Ο όρος C είναι σημαντικός στο επίπεδο >90%, ενώ όλοι οι υπόλοιποι όροι έχουν p-values μεγαλύτερα από 0,1. Η F-value του μοντέλου είναι 2,20 και δηλώνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 14,93% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου μαρτυρά ότι αυτό είναι ασήμαντο μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 58,53% πιθανότητα η F-value να

έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου. Ο λόγος για τον οποίο είναι δύσκολο να βρεθούν όροι σημαντικοί για το μοντέλο (με $p\text{-value} < 0,05$) είναι ότι το εύρος των τιμών IC_{50} που προέκυψαν πειραματικά είναι μικρό.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει την 1^η απόκριση (τιμή IC_{50} για χρόνο επώασης 30 min).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	82,20	6	13,70	2,20	0,1493	not significant
A-Extraction Time	12,43	1	12,43	2,00	0,1955	
C-Liquid to Solid ratio	28,50	1	28,50	4,58	0,0648	
AC	9,49	1	9,49	1,52	0,2521	
A ²	11,27	1	11,27	1,81	0,2154	
B ²	1,41	1	1,41	0,2264	0,6469	
C ²	16,92	1	16,92	2,72	0,1379	
Residual	49,81	8	6,23			
Lack of Fit	37,14	6	6,19	0,9774	0,5853	not significant
Pure Error	12,67	2	6,33			
Cor Total	132,01	14				

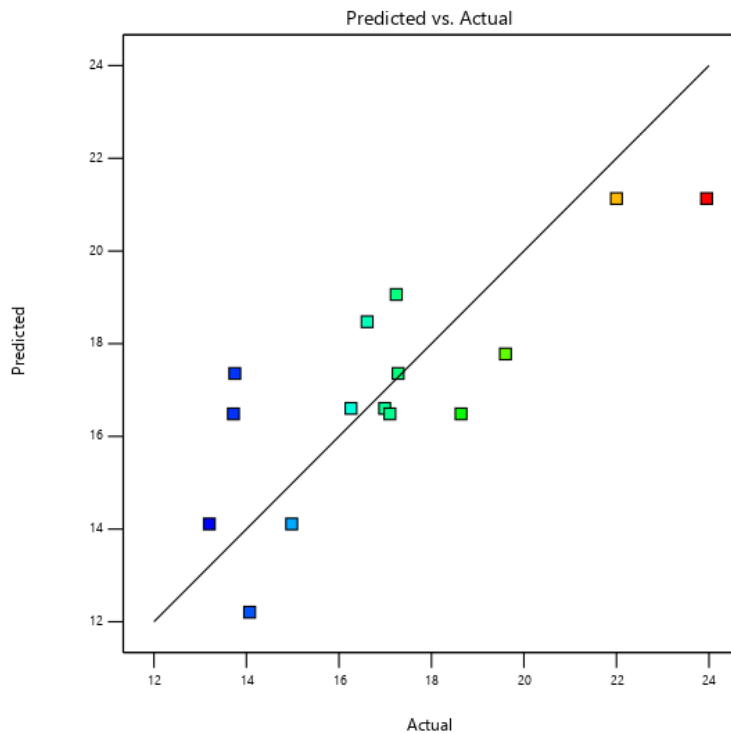
Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα, η τιμή «Predicted R²» αποκλίνει από το «Adjusted R²» περισσότερες από 0,2 μονάδες, που είναι η μέγιστη αποδεκτή γενικά απόκλιση. Η τιμή «Adequate Precision» που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο, από την άλλη, είναι ικανοποιητική καθώς είναι μεγαλύτερη από 4.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει την 1^η απόκριση (τιμή IC_{50} για χρόνο επώασης 30 min).

Std. Dev.	2,50	R²	0,6227
Mean	17,03	Adjusted R²	0,3397
C.V. %	14,66	Predicted R²	-1,3188
		Adeq Precision	5,2365

Στο παρακάτω διάγραμμα, απεικονίζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών με τις πραγματικές που ελήφθησαν.

Γράφημα 15: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 1^{ης} απόκρισης (τιμής IC₅₀ για χρόνο επώασης 30 min).



Συμπερασματικά, η εξίσωση που περιγράφει την πρώτη απόκριση (IC₅₀ εκχυλισμάτων για επώαση 30min), είναι η εξής (κωδικοποιημένη με τη χρήση των συμβόλων A, B, C):

$$IC_{50} (30\text{min incubation})=16,49+1,25A+1,89C-1,54AC-1,75A^2+0,62B^2+2,14C^2.$$

3.4.1.2. 2^η απόκριση: IC₅₀ εκχυλισμάτων για χρόνο επώασης 60 min (IC₅₀ (60 min incubation))

Επιλέχθηκε πάλι το μοντέλο της μορφής reduced quadratic model (απλοποιημένο τετραγωνικό). Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι B, AB, AC και B². Φαίνεται ότι ο όρος C (αναλογία υγρού/στερεού) είναι ο πιο σημαντικός για το μοντέλο γιατί έχει p-value χαμηλότερο από 0,05. Ο όρος C² είναι σημαντικός στο επίπεδο >90%, ενώ όλοι οι υπόλοιποι όροι έχουν p-values μεγαλύτερα από 0,1. Η F-value του μοντέλου είναι 3,01 και δηλώνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 7,21% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου δείχνει ότι αυτό είναι ασήμαντο μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 45,71% πιθανότητα η F-value να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει τη 2^η απόκριση (τιμή IC₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	78,73	5	15,75	3,01	0,0721	not significant
A-Extraction Time	4,46	1	4,46	0,8508	0,3804	
C-Liquid to Solid ratio	32,16	1	32,16	6,14	0,0351	
BC	4,41	1	4,41	0,8422	0,3827	
A ²	14,00	1	14,00	2,67	0,1365	
C ²	21,06	1	21,06	4,02	0,0759	
Residual	47,13	9	5,24			
Lack of Fit	39,58	7	5,65	1,50	0,4571	not significant
Pure Error	7,55	2	3,77			
Cor Total	125,86	14				

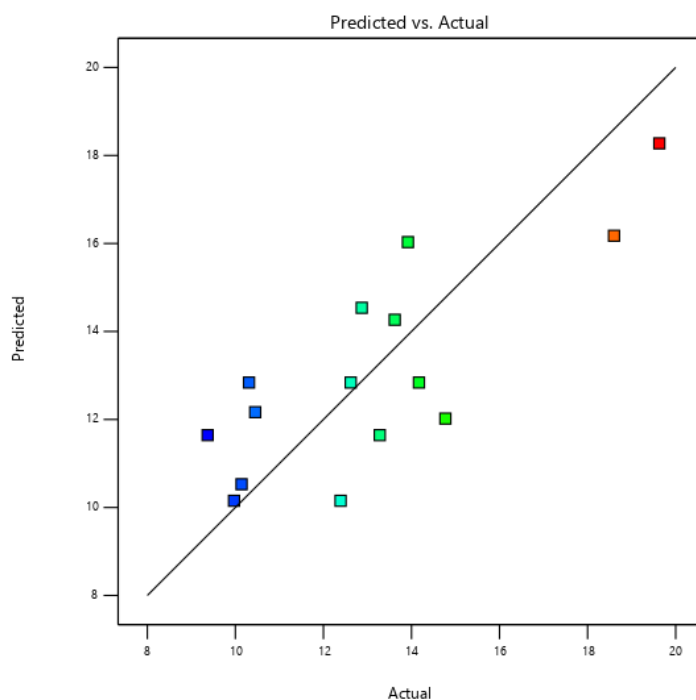
Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα, η τιμή «Predicted R²» αποκλίνει από το «Adjusted R²» περισσότερες από 0,2 μονάδες, οπότε πιθανότατα χρειάζεται περαιτέρω αφαίρεση όρων από το μοντέλο. Η τιμή «Adequate Precision» είναι ικανοποιητική διότι είναι μεγαλύτερη από 4.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει τη 2^η απόκριση (τιμή IC₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).

Std. Dev.	2,29	R²	0,6256
Mean	13,07	Adjusted R²	0,4175
C.V. %	17,50	Predicted R²	-0,1818
		Adeq Precision	5,6133

Ακολουθεί το διάγραμμα συσχέτισης προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών.

Γράφημα 16: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 2^{ης} απόκρισης (τιμής IC₅₀ για χρόνο επώασης 60 min).



Η εξίσωση, λοιπόν, που περιγράφει την απόκριση IC₅₀ εκχυλισμάτων για επώαση 60min, είναι η εξής (κωδικοποιημένη με τη χρήση των συμβόλων A, B, C):

$$IC_{50} (60\text{min incubation})=12,84+0,75A+2,00C-1,05BC-1,94A^2+2,38C^2.$$

3.4.1.3. 3^η απόκριση: Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινολικά (TPC)

Επιλέχθηκε για μία ακόμη φορά το μοντέλο της μορφής reduced quadratic model (απλοποιημένο τετραγωνικό). Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι B, AB, BC και A². Φαίνεται ότι ο όρος C (αναλογία υγρού/στερεού) είναι ξανά ο πιο σημαντικός για το μοντέλο γιατί έχει p-value χαμηλότερο από 0,05. Όλοι οι υπόλοιποι όροι έχουν p-values μεγαλύτερα από 0,1. Η F-value του μοντέλου είναι 2,93 και δηλώνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το θόρυβο, ενώ υπάρχει 7,68% πιθανότητα η υψηλή τιμή F-value να είναι αποτέλεσμα του θορύβου. Η F-value του Lack-of-fit του μοντέλου δείχνει ότι αυτό δεν είναι σημαντικό μπροστά στο γνήσιο σφάλμα και υπάρχει 42,39% πιθανότητα η F-value να έχει αυτήν την τιμή λόγω του θορύβου.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα ANOVA για το επιλεγμένο μοντέλο που περιγράφει τη 3^η απόκριση (περιεκτικότητα σε φαινολικά).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	80,15	5	16,03	2,93	0,0768	not significant
A-Extraction Time	2,82	1	2,82	0,5153	0,4911	
C-Liquid to Solid ratio	42,55	1	42,55	7,77	0,0211	
AC	8,79	1	8,79	1,61	0,2368	
B ²	11,35	1	11,35	2,07	0,1837	
C ²	16,46	1	16,46	3,01	0,1169	
Residual	49,26	9	5,47			
Lack of Fit	42,08	7	6,01	1,67	0,4239	not significant
Pure Error	7,18	2	3,59			
Cor Total	129,41	14				

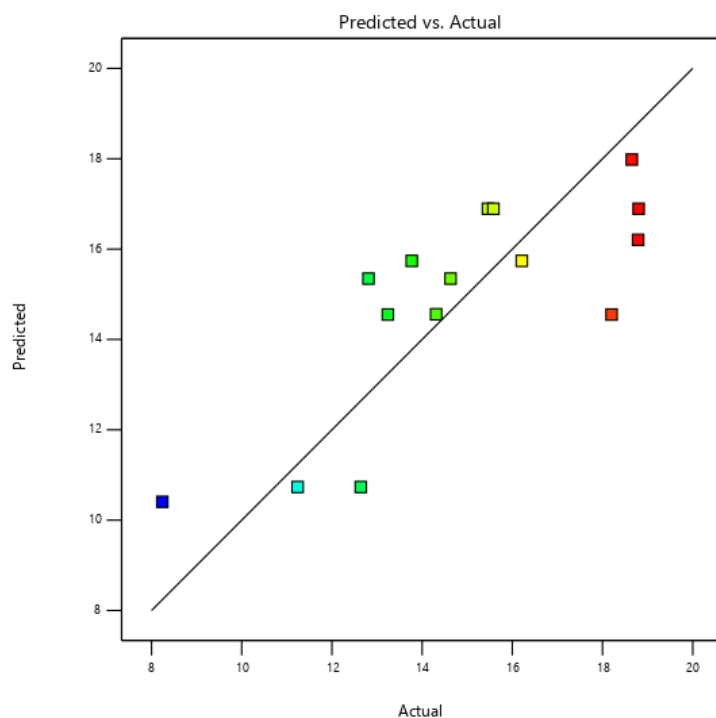
Σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα, η τιμή «Predicted R²» πάλι αποκλίνει από το «Adjusted R²» περισσότερες από 0,2 μονάδες. Η τιμή «Adequate Precision» είναι ικανοποιητική καθώς είναι μεγαλύτερη από 4.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή στο μοντέλο που περιγράφει τη 3^η απόκριση (περιεκτικότητα σε φαινολικά).

Std. Dev.	2,34	R²	0,6194
Mean	14,84	Adjusted R²	0,4079
C.V. %	15,77	Predicted R²	-0,5630
		Adeq Precision	5,1214

Ακολουθεί το διάγραμμα της συσχέτισης προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών.

Γράφημα 17: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της 3ης απόκρισης (περιεκτικότητα σε φαινολικά).



Η εξίσωση, τελικά που περιγράφει απόκριση TPC των εκχυλισμάτων (κωδικοποιημένη με τη χρήση των συμβόλων A, B, C):

$$TPC=16,89-0,59A+2,31C-1,48AC-1,75B^2-2,11C^2.$$

3.4.2. Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης

Πραγματοποιούνται δύο βελτιστοποιήσεις:

- Ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση του IC₅₀ (30min incubation) και μεγιστοποίηση TPC

Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας εκχύλισης για χρόνο επώασης 30min.

Βέλτιστη τιμή χρόνου εκχύλισης (min)	Βέλτιστη περιεκτικότητα του διαλύτη σε DES (g DES/g διαλύτη)	Βέλτιστη αναλογία υγρού/στερεού (ml διαλύτη/g τζίντζερ)	Βέλτιστη τιμή IC ₅₀ (30 min επώαση) (mg εκχ./ml διαλύτη)	Βέλτιστη τιμή TPC (μg gal/g τζίντζερ)
10	0,8	14,546	13,20	17,395

Στη συνέχεια παρατίθενται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσε δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, όπου η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της.

IC50 (30min incubation) (mg extract/ml solution)

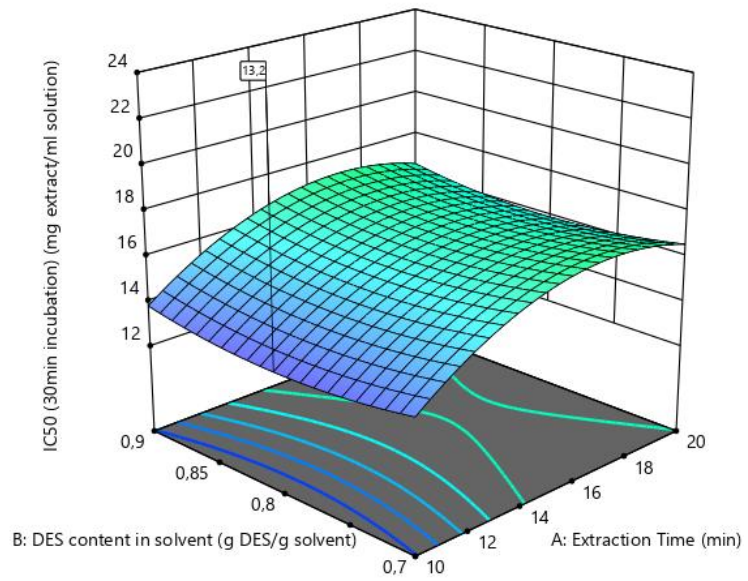
13,2  23,95

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 14,5463



Γράφημα 18: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.

IC50 (30min incubation) (mg extract/ml solution)

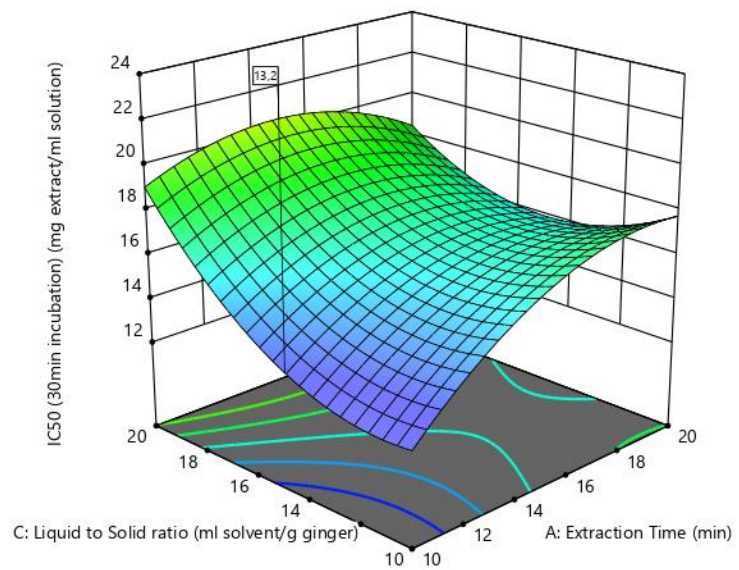
13,2  23,95

X1 = A

X2 = C

Actual Factor

B = 0,799925



Γράφημα 19: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.

IC50 (30min incubation) (mg extract/ml solution)

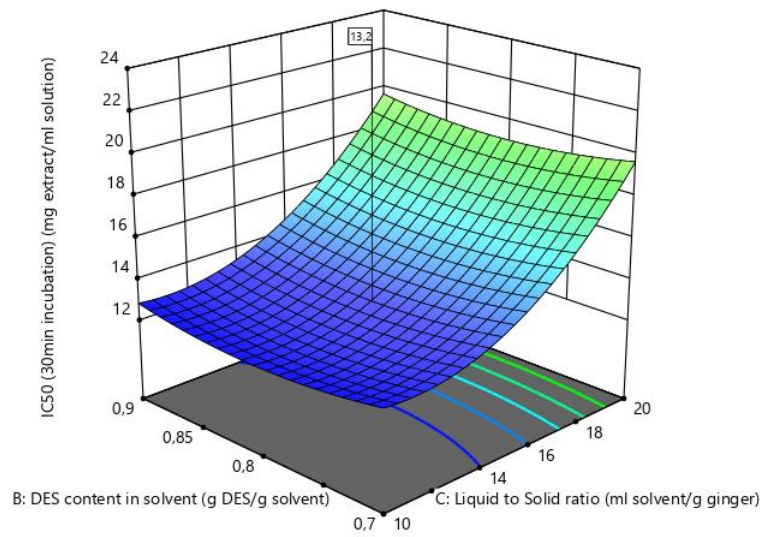
13,2  23,95

X1 = C

X2 = B

Actual Factor

A = 10



Γράφημα 20: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (30 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.

TPC (μg gal/g ginger)

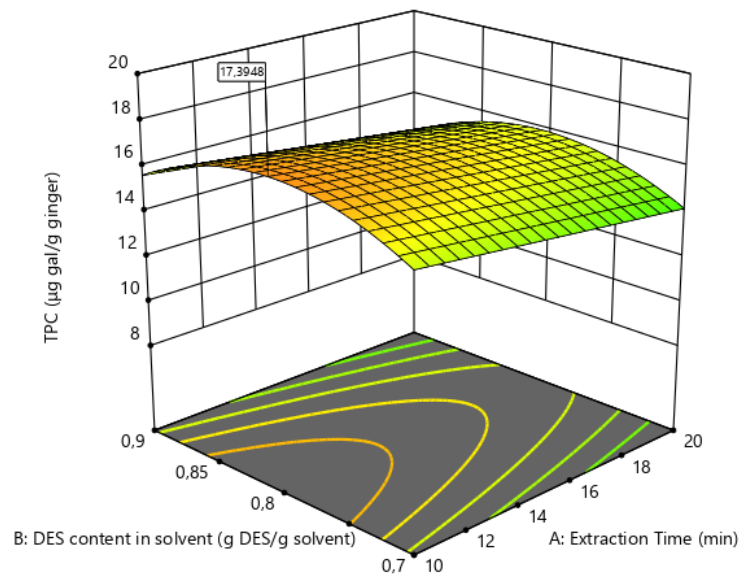
8,24  18,8

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 14,5463

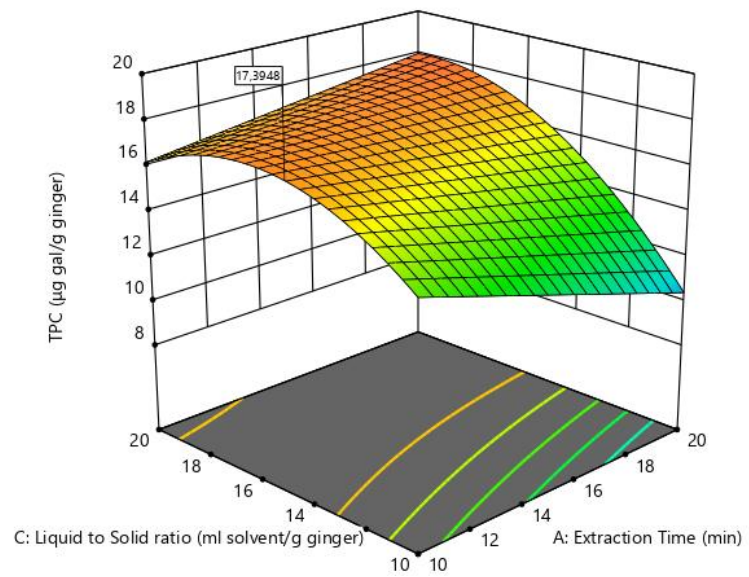


Γράφημα 21: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.

TPC ($\mu\text{g gal/g ginger}$)
8,24 18,8

X1 = A
X2 = C

Actual Factor
B = 0,799925

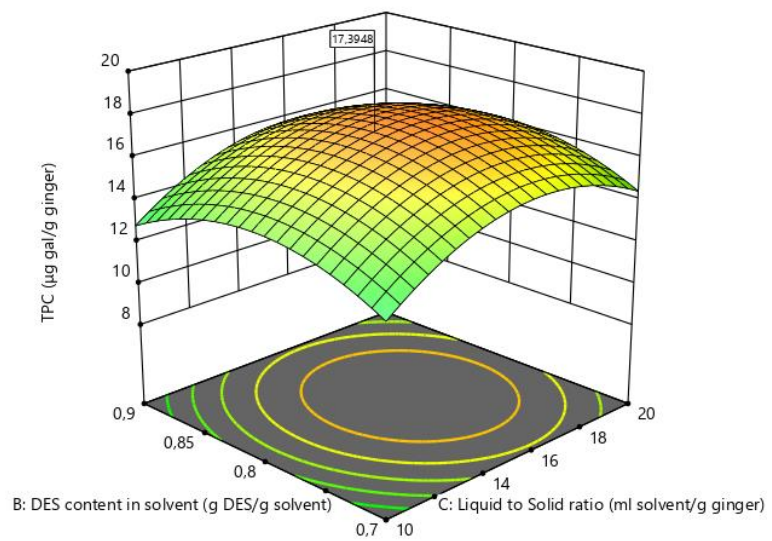


Γράφημα 22: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.

TPC ($\mu\text{g gal/g ginger}$)
8,24 18,8

X1 = C
X2 = B

Actual Factor
A = 10



Γράφημα 23: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.

▪ Ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση του IC₅₀ (60min incubation) και μεγιστοποίηση TPC

Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης διεργασίας εκχύλισης για χρόνο επώασης 60 min.

Βέλτιστη τιμή χρόνου εκχύλισης (min)	Βέλτιστη περιεκτικότητα του διαλύτη σε DES (g DES/g διαλύτη)	Βέλτιστη αναλογία υγρού/στερεού (ml διαλύτη/g τζίντζερ)	Βέλτιστη τιμή IC ₅₀ (60 min επώαση) (mg εκχ./ml διαλύτη)	Βέλτιστη τιμή TPC (μg gal/g τζίντζερ)
10	0,796	14,371	9,933	17,348

Στη συνέχεια παρατίθενται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσε δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, όπου η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της.

IC₅₀ (60min incubation) (mg extract/ml solution)

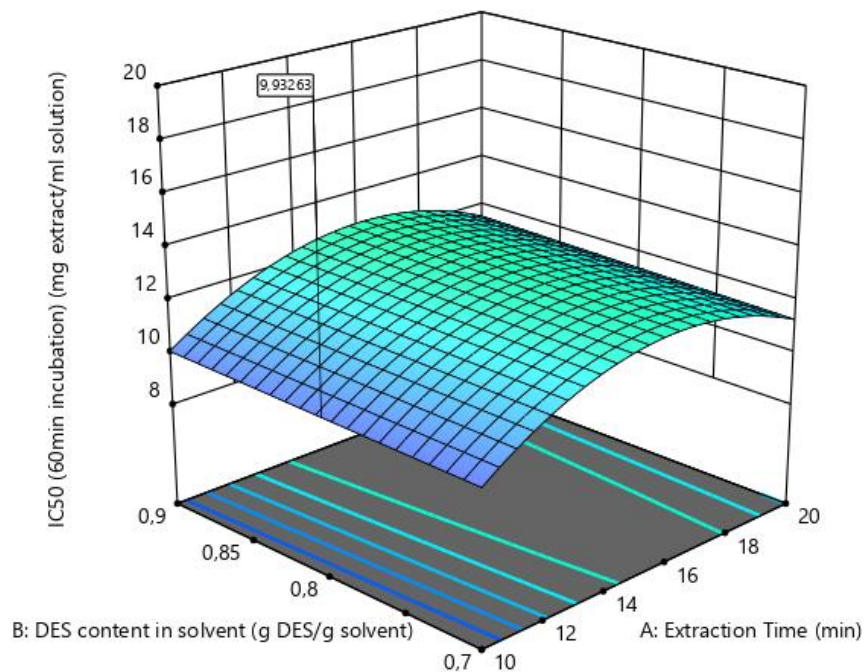
9,37  19,63

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 14,3713



Γράφημα 24: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσε των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.

IC50 (60min incubation) (mg extract/ml solution)

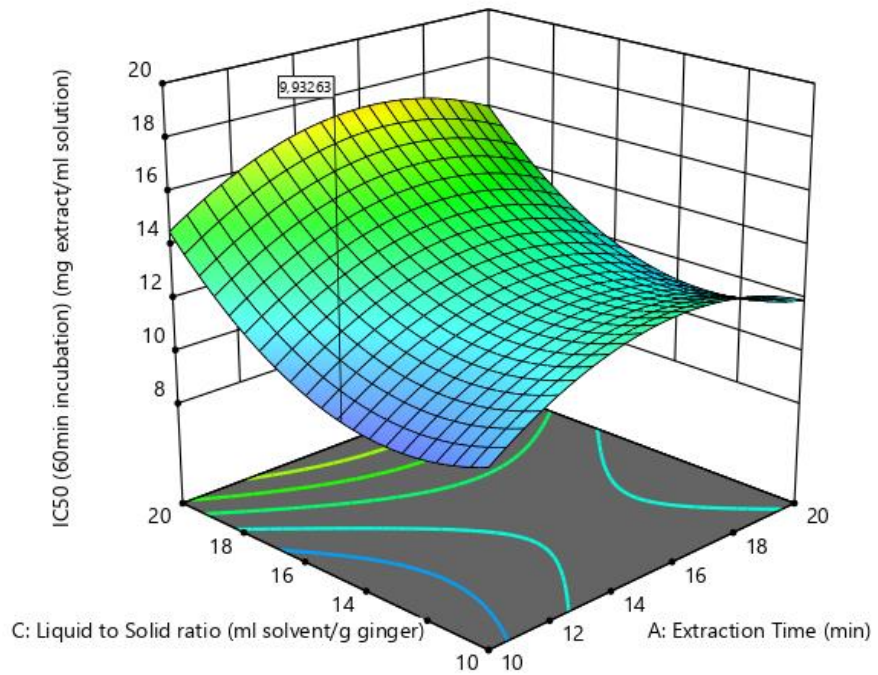
9,37  19,63

X1 = A

X2 = C

Actual Factor

B = 0,7964



Γράφημα 25: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.

IC50 (60min incubation) (mg extract/ml solution)

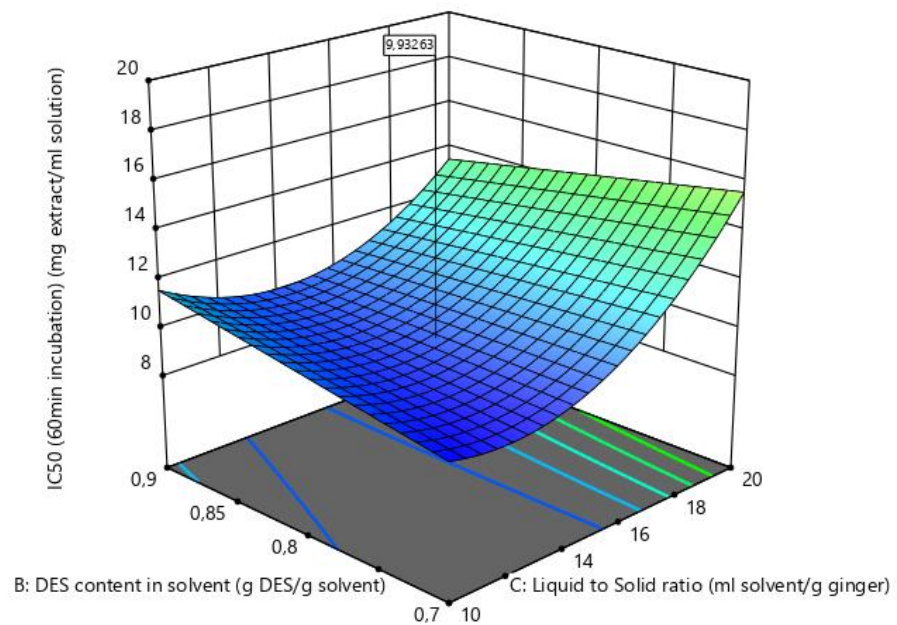
9,37  19,63

X1 = C

X2 = B

Actual Factor

A = 10

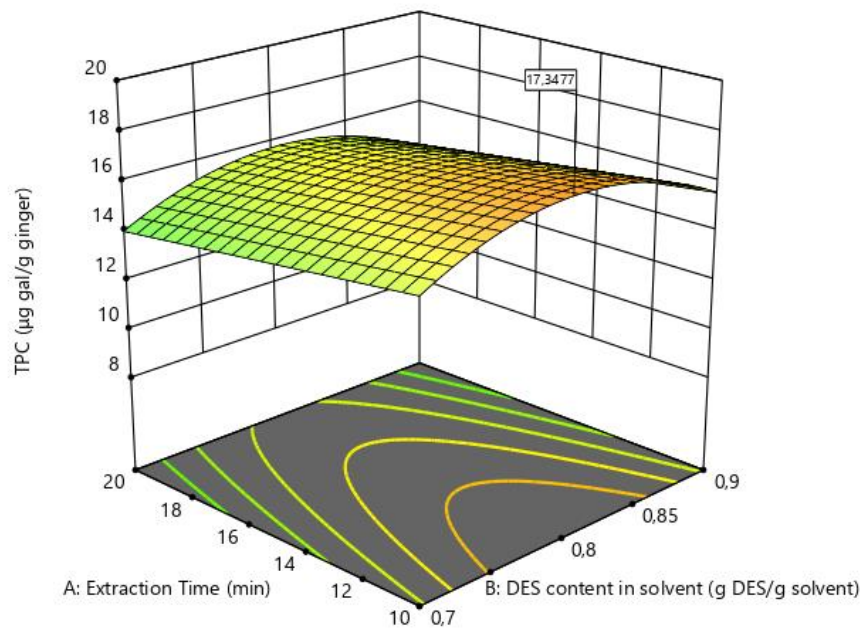


Γράφημα 26: 3D επιφάνεια του IC₅₀ (60 min επώαση) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.

TPC ($\mu\text{g gal/g ginger}$)
8,24  18,8

X1 = B
X2 = A

Actual Factor
C = 14,3713

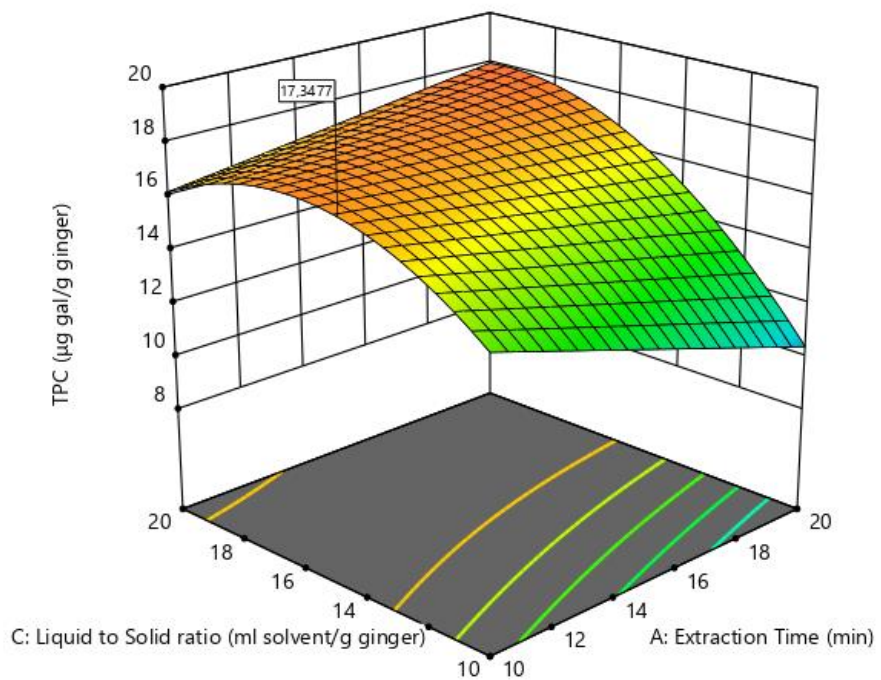


Γράφημα 27: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για βέλτιστο C.

TPC ($\mu\text{g gal/g ginger}$)
8,24  18,8

X1 = A
X2 = C

Actual Factor
B = 0,7964



Γράφημα 28: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για βέλτιστο B.

TPC ($\mu\text{g gal/g ginger}$)

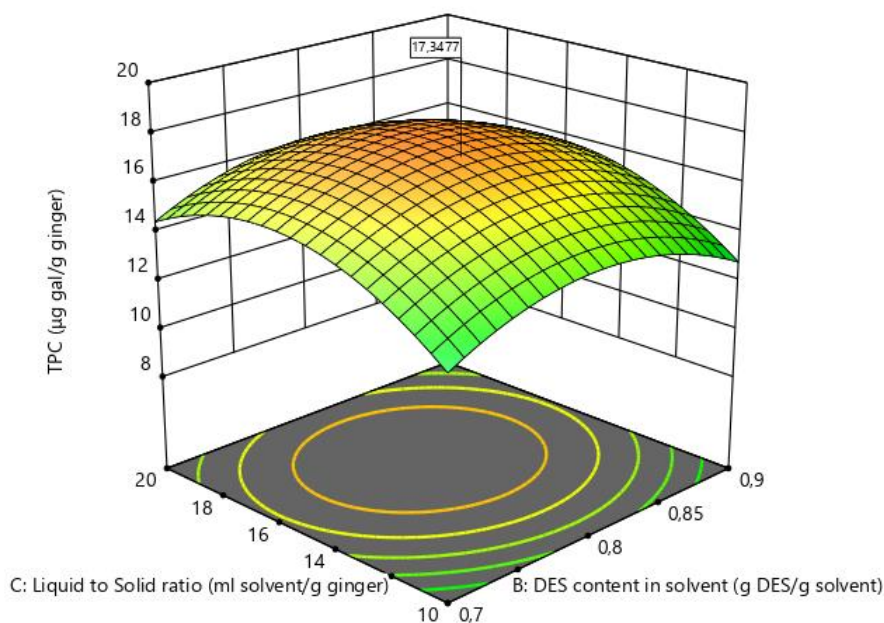
8,24  18,8

X1 = B

X2 = C

Actual Factor

A = 10



Γράφημα 29: 3D επιφάνεια του TPC συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για βέλτιστο A.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης και τα παραπάνω τρισδιάστατα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης, γίνεται αντιληπτό ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ευνοείται για χαμηλούς χρόνους εκχύλισης. Με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης αυξάνεται η τιμή της απόκρισης IC_{50} και επομένως η αντιοξειδωτική δράση περιορίζεται. Η κατά βάρος περιεκτικότητα του διαλύτη σε DES δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ η αναλογία του όγκου του διαλύτη προς τη μάζα του στερεού τζίντζερ βελτιώνει την αντιοξειδωτική δράση όταν είναι ελαττωμένη. Η επίδραση του τελευταίου αυτού παράγοντα στην τιμή IC_{50} είναι καθοριστική.

Από την άλλη, παρατηρείται ότι ο παράγοντας του χρόνου δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές στην τιμή της απόκρισης του ολικού φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων. Παρατηρείται μία τάση μείωσης του TPC με την αύξηση του χρόνου αλλά δεν είναι ουσιαστική, ειδικά εάν ληφθεί υπόψη η υψηλή τιμή p των όρων όπου περιέχεται αυτός ο παράγοντας. Η ελάττωση αυτή του φαινολικού φορτίου με την παράταση της εκχύλισης, όπως και η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρατηρήθηκε παραπάνω, είναι πιθανό να οφείλονται στην υποβάθμιση των τζιντζερολών του δείγματος τζίντζερ, φαινόμενο για το οποίο έχει γίνει λόγος στο Θεωρητικό Μέρος. Η αναλογία DES/νερού για μία ακόμα φορά δεν επηρεάζει έντονα την απόκριση, μολονότι διακρίνεται μία τάση ελάττωσης του φαινολικού φορτίου από μία μεσαία τιμή της αναλογίας και πάνω. Τέλος, πάλι ο σημαντικότερος παράγοντας είναι ο λόγος του υγρού προς τη στερεή πρώτη ύλη, για τον οποίο γίνεται κατανοητό ότι οι μεσαίες τιμές του είναι οι καταλληλότερες για να παραληφθούν εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις.

Τα αποτελέσματα των δύο βελτιστοποιήσεων (για τους δύο χρόνους επώασης) δε διαφέρουν πολύ μεταξύ τους, και είναι φανερό πως για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και της περιεκτικότητάς τους σε φαινολικά, απαιτείται ελάχιστος χρόνος εκχύλισης και μεσαίες τιμές των αναλογιών DES/νερού και διαλύτη/στερεού.

4. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τον αρχικό στόχο της παρούσας εργασίας, επετεύχθη η ανάπτυξη σε εργαστηριακή κλίμακα μίας πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυσικές πρώτες ύλες, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο πρώτης ύλης το τζίντζερ. Στη διεργασία χρησιμοποιήθηκε ως πράσινο διαλυτικό μέσο ένας βαθέως ευτηκτικός διαλύτης, το NaDES βεταΐνης-γαλακτικού οξέος (Bet-La), ο οποίος χαρακτηρίστηκε δομικά με φασματοσκοπία NMR (^1H , ^{13}C 1D NMR και 2D NMR) και έγινε χρήση υπερήχων.

Ο χαρακτηρισμός της διεργασίας ως «πράσινης» προκύπτει (α) αφενός από τη χρήση ανανεώσιμης πρώτης ύλης και φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, αντικαθιστώντας τους συμβατικούς οργανικούς (και συχνά επιβλαβείς ή τοξικούς) διαλύτες που απαντώνται στη βιβλιογραφία για την εκχύλιση από το τζίντζερ, (β) αφετέρου από τη χρήση τεχνικής υψηλής ενέργειας (UAE) η οποία απαιτεί σημαντικά χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης. Επιπλέον, (γ) η παραγωγή αποβλήτων από τη διεργασία είναι σχεδόν αμελητέα και (δ) τα τελικά προϊόντα (εκχυλίσματα) αναμένεται να είναι βιοσυμβατά και μη τοξικά, όπως η πρώτη ύλη και ο χρησιμοποιούμενος στοχευμένα επιλεγμένος διαλύτης. Σημαντικό είναι ακόμη το ότι (ε) τα NaDESs που δεν απομακρύνονται από τα εκχυλίσματα δρουν ως αποθηκευτικά μέσα για τις ουσίες που έχουν εκχυλιστεί και τις προστατεύουν από ανεπιθύμητες αντιδράσεις οξειδωσης.

Επομένως, με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως τα NaDESs όπως αυτό της βεταΐνης-γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δύνανται να χρησιμοποιηθούν σε πολυάριθμες εφαρμογές, χωρίς να θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

Με βάση τα αποτελέσματα της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) του NaDES που χρησιμοποιήθηκε, το επιλεγμένο σύστημα NaDES/H₂O μπορεί να βρει εφαρμογή με ασφάλεια στη συγκεκριμένη διεργασία, χωρίς τον κίνδυνο αποσύνθεσης και σχηματισμού παραπροϊόντων.

Επιπρόσθετα, από τη συμβατική εκχύλιση του τζίντζερ που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο (με χρήση οργανικών διαλυτών), επετεύχθη η απομόνωση δύο ενώσεων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρότυπα για την περαιτέρω αξιολόγηση των εκχυλισμάτων από τη νέα προτεινόμενη διεργασία. Αυτές οι ενώσεις είναι η 6-τζίντζερόλη και η 6-σογκαόλη, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν δομικά με φασματοσκοπικές μεθόδους.

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από την προτεινόμενη πράσινη μέθοδο με τη χρήση του NaDES, αξιολογήθηκαν με βάση δύο παραμέτρους, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά, με την εφαρμογή των μεθόδων DPPH και Folin-Ciocalteu, αντιστοίχως. Χρησιμοποιώντας αυτές τις δύο παραμέτρους ως αποκρίσεις, πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός τύπου Box-Behnken με ανεξάρτητες μεταβλητές το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία μαζών του NaDES και του νερού στο διαλύτη εκχύλισης και την αναλογία του όγκου του υγρού διαλύτη προς τη μάζα της στερεής πρώτης ύλης. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων, εξήχθησαν τα μοντέλα:

- Αντιοξειδωτική δράση (όπως προέκυψε από την εκτίμηση της δέσμησης του DPPH):

$$IC_{50} (30\text{min incubation})=16,49+1,25A+1,89C-1,54AC-1,75A^2+0,62B^2+2,14C^2,$$

$$IC_{50} (60\text{min incubation})=12,84+0,75A+2,00C-1,05BC-1,94A^2+2,38C^2 \text{ και}$$

- Περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις:

$$\text{TPC}=16,89-0,59A+2,31C-1,48AC-1,75B^2-2,11C^2.$$

Σε κάθε περίπτωση, ο πιο σημαντικός όρος για το μοντέλο είναι ο λόγος υγρού προς στερεό (παράγοντας C).

Από τη μελέτη του πειραματικού σχεδιασμού προέκυψε πως οι συνθήκες που εξασφαλίζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (ελάχιστη τιμή IC_{50}) των εκχυλισμάτων και το μέγιστο ολικό φαινολικό φορτίο, είναι:

(α) ο ελάχιστος εξεταζόμενος χρόνος εκχύλισης (10min),

(β) η μεσαία εξεταζόμενη τιμή του λόγου w/w DES/νερού (περίπου 0,8g DES/g διαλύτη) και

(γ) η μεσαία εξεταζόμενη τιμή του λόγου υγρού προς στερεό (περίπου 15ml διαλύτη/g τζίντζερ).

5. Προτάσεις για το μέλλον

Η παραπάνω μελέτη έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την εκχύλιση βιοενεργών συστατικών από το τζίντζερ με τη χρήση του φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Bet-La και υπερήχων. Ωστόσο, πάντα θα υπάρχουν προοπτικές εξέλιξης της έρευνας, για τις οποίες μπορούν να προταθούν διάφορες ιδέες. Για παράδειγμα, η δοκιμή άλλων βαθέως ευτηκτικών διαλυτών υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης θα μπορούσαν να αναδείξουν και άλλα DESs ως ικανά εκχυλιστικά μέσα των βιοδραστικών του τζίντζερ. Από την άλλη, δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος ένας μικρός μόνο αριθμός αναφορών που εξετάζουν τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη (Bet-La) ως εκχυλιστικού μέσου, και ειδικά με πρώτη ύλη το τζίντζερ, είναι σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα πάνω σε αυτό το σύστημα NaDES και να πραγματοποιηθεί πειραματισμός με διαφορετικές συνθήκες (π. χ. διεύρυνση του φάσματος των χρόνων εκχύλισης και των λόγων DES/νερού, αύξηση της ισχύος των υπερήχων στο σύστημα probe κ. ά.) και στατιστική επεξεργασία ακολούθως των αποτελεσμάτων και βελτιστοποίηση της διεργασίας μέσω πειραματικού σχεδιασμού. Στην περίπτωση της μελέτης μεγαλύτερων χρόνων εκχύλισης, προκειμένου να αποφευχθεί η θερμική υποβάθμιση των βιοδραστικών ενώσεων του τζίντζερ, προτείνεται η ρύθμιση σε παλμική λειτουργία της συσκευής των υπερήχων και η συνεχής ανανέωση του παγόλουτρου για την αποτροπή της υπερθέρμανσης. Επιπλέον, προτείνεται ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων και με άλλες μεθόδους εκτός από τη δοκιμή DPPH. Τέλος, είναι χρήσιμος ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων αναφοράς (6-τζιντζερόλη, 6-σογκαόλη) στα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τη χρήση DES, μέσω της LC-MS ανάλυσης, ενώ ιδιαίτερα βοηθητική είναι η πλήρης ταυτοποίηση του φυτοχημικού προφίλ των παραλαμβανόμενων εκχυλισμάτων με κάποια μέθοδο χρωματογραφίας (π. χ. HPLC), ώστε να καθίσταται δυνατή η σύγκριση διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης αλλά και διαφορετικών πειραματικών συνθηκών για την ίδια τεχνική (χρόνος, χρησιμοποιούμενο DES κτλ.), μέσω της παρατήρησης της σύστασης των εκχυλισμάτων που προκύπτουν σε κάθε περίπτωση.

6. Βιβλιογραφία

- 1) Panda, D., & Manickam, S. (2019). Cavitation Technology—The Future of Greener Extraction Method: A Review on the Extraction of Natural Products and Process Intensification Mechanism and Perspectives. *Applied Sciences*, 9 (4), 766-786.
- 2) Strieder, M. M., Silva, E. K., & Meireles, M. A. (2019). Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-assisted Extraction of Natural Colorants. *Food and Public Health*, 9 (2), 45-52.
- 3) Camargo, J. d., Bertan, A. S., Vivian de Almeida, I., Vicentini, V. E., Dusman, E., & Tonin, L. T. (2020). Antitumoral activity, antioxidant capacity and bioactive. *Acta Scientiarum*, 42 (1).
- 4) Boly, R., Lamkami, T., Lompo, M., Dubois, J., & Guissou, I. P. (2016). DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from *Agelanthus dodoneifolius* (Loranthaceae) Leaves. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9 (1), 29-34.
- 5) Wijayanti, I. I., Budiharjo, A., Pangastuti, A., Prihapsara, F., & Artanti, A. N. (2018). Total phenolic content and antioxidant activity of ginger extract and SNEDDS with eel fish bone oil (*Anguilla* spp.). *Nusantara Bioscience*, 10 (3), 164-169.
- 6) Iara, Q., Maysam, S., & Zaid, A. (2013). Comparative Study of Natural Antioxidant Activity for Ginger - Oregano and Syrian Thyme. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22 (1), 56-58.
- 7) Rajan, M., Prabhavathy, A., & Ramesh, U. (2015). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for *Zingiber officinale* Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. *The Natural Products Journal*, 5 (1), 3-13.
- 8) Singletary, K. (2010). Ginger - An Overview of Health Benefits. *Nutrition Today*, 45 (4), 171-183.
- 9) Saranya, K. K., Ramalakshmi, K., & Jagan Mohan Rao, L. (2018). Microwave Assisted Extraction of Non-Volatiles from Ginger using Ionic Liquids. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)*, 8 (2), 157-162.
- 10) Ali, A. M., El-Nour, M. E., & Yagi, S. M. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 (2), 677-682.
- 11) Lee, S., Khoo, C., Wade Halstead, C., Huynh, T., & Bensoussan, A. (2007). Liquid Chromatographic Determination of 6-, 8-, 10-Gingerol, and 6-Shogaol in Ginger (*Zingiber officinale*) as the Raw Herb and Dried Aqueous Extract. *Journal of AOAC International*, 90 (5), 1219-1226.
- 12) Mohammadi, G., Rashidian, G., Hoseinifar, S. H., Naserabad, S. S., & Doan, H. V. (2020). Ginger (*Zingiber officinale*) extract affects growth performance, body composition, haematology, serum and mucosal immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 99, 267-273.
- 13) Alsherbiny, M. A., Abd-Elsalam, W. H., El badawy, S. A., Taher, E., Fares, M., Torres, A., et al. (2019). Ameliorative and protective effects of ginger and its main constituents against natural, chemical and radiation-induced toxicities: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 72-97.

- 14) Kravchenko, I., Eberle, L., Nesterkina, M., & Kobernik, A. (2019). Anti-inflammatory and analgesic activity of ointment based on dense ginger extract (*Zingiber officinale*). *Journal of Herbmед Pharmacology*, 8 (2), 126-132.
- 15) Peng, L.-Q., Cao, J., Du, L.-J., Zhang, Q.-D., Xu, J.-J., Chen, Y.-B., et al. (2017). Rapid ultrasonic and microwave-assisted micellar extraction of zingiberone, shogaol and gingerols from gingers using biosurfactants. *Journal of Chromatography A*, 1515, 37-44.
- 16) Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., et al. (2019). Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104915.
- 17) Rafie, R., Hosseini, S. A., Hajiani, E., Malehi, A. S., & Mard, S. A. (2020). Effect of Ginger Powder Supplementation in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Clinical Trial. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 13, 35-45.
- 18) Fazelan, Z., Anatolyevich Vatnikov, Y., Vladimirovich Kulikov, E., Gennadievich Plushikov, V., & Yousefi, M. (2020). Effects of dietary ginger (*Zingiber officinale*) administration on growth performance and stress, immunological, and antioxidant responses of common carp (*Cyprinus carpio*) reared under high stocking density. *Aquaculture*, 518, 734833.
- 19) Di Ottavio, F., Gauglitz, J. M., Ernst, M., Panitchpakdi, M. W., Fanti, F., Compagnone, D., et al. (2020). A UHPLC-HRMS based metabolomics and chemoinformatics approach to chemically distinguish "super foods" from a variety of plant-based foods. *Food Chemistry*, 313, 126071.
- 20) Mansingh, D. P., Pradhan, S., Biswas, D., Barathidasan, R., & Vasanthi, H. R. (2019). Palliative Role of Aqueous Ginger Extract on N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Gastric Cancer. *Nutrition and Cancer*, 72 (1), 1-13.
- 21) Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7 (3), 47-65.
- 22) Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.-E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (2), 243-249.
- 23) El Kantar, S., N. Rajha, H., Boussetta, N., Vorobiev, E., G. Maroun, R., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. *Food Chemistry*, 295, 165-171.
- 24) Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384.
- 25) Kou, X., Ke, Y., Wang, X., Rahman, M. R., Xie, Y., Chen, S., et al. (2018). Simultaneous extraction of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chemistry*, 257, 223-229.
- 26) Tao, Y., Li, W., Liang, W., & Van Breemen, R. B. (2009). Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High-Performance Liquid

Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21), 10014-10021.

27) Sueishi, Y., Masamoto, H., & Kotake, Y. (2019). Heat treatments of ginger root modify but not diminish its antioxidant activity as measured with multiple free radical scavenging (MULTIS) method. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 64 (2), 143-147.

28) Ok, S., & Jeong, W.-S. (2012). Optimization of Extraction Conditions for the 6-Shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Preventive Nutrition and Food Science*, 17 (2), 166-171.

29) Murugesan, S., Venkateswaran, M. R., Jayabal, S., & Periyasamy, S. (2020). Evaluation of the antioxidant and anti-arthritic potential of *Zingiber officinale* Rosc. by in vitro and in silico analysis. *South African Journal of Botany*, 130, 45-53.

30) Aulia, M. P., Pradhita, F., Kumoro, A. C., Christwardana, M., & Hargono, H. (2018). Kinetic Study and Optimization of the Most Influential Factor on Batch-Extraction of Gingerol from Fresh Ginger (*Zingiber officinale*) Rhizomes by Using n-Hexane as a Solvent. *Reaktor*, 18 (3), 141-147.

31) Han, H. S., Kim, K. B., Jung, J. H., An, I. S., Kim, Y. J., & An, S. (2018). Anti-apoptotic, antioxidant and anti-aging effects of 6-shogaol on human dermal fibroblasts. *Biomedical Dermatology*, 2 (27).

32) Mao, Q.-Q., Xu, X.-Y., Cao, S.-Y., Gan, R.-Y., Corke, H., Beta, T., et al. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8 (6), 185-205.

33) Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Applied Sciences*, 9, 4169.

34) Passos, H., Coutinho, J. A., & Freire, M. G. (2014). Ionic liquids solutions as extractive solvents of value-added compounds from biomass. *Green Chemistry*, 46 (5), 4786-4815.

35) Chen, X., Chen, G., Wang, Z., & Kan, J. (2020). A comparison of a polysaccharide extracted from ginger (*Zingiber officinale*) stems and leaves using different methods: preparation, structure characteristics, and biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 635-649.

36) Prasanna, K. D., Gunathilake, P., & Rupasinghe, H. P. (2014). Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation In Vitro by Ginger Extracts. *Journal of Medicinal Food*, 17 (4), 424-431.

37) Mankanjuola, S. A., & Enujiugha, V. N. (2018). Modelling and prediction of selected antioxidant properties of ethanolic ginger extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1413-1419.

38) Mohammed, E. T., Hashem, K. S., Ahmed, A. E., Aly, M. T., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Ginger extract ameliorates bisphenol A (BPA)-induced disruption in thyroid hormones synthesis and metabolism: Involvement of Nrf-2/HO-1 pathway. *Science of the Total Environment*, 703, 134664.

39) Wen, C., Liu, Y., Ye, Y., Tao, Z., Cheng, Z., Wang, T., et al. (2020). Effects of gingerols-rich extract of ginger on growth performance, serum metabolites, meat quality and antioxidant activity of heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, 89, 102544.

40) Škulcová, A., & Jablonský, M. (n.d.). Properties and Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents Based on Lactic Acid. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 25, 75-80.

- 41) Wang, X., Wu, Y., Li, J., Wang, A., Li, G., Ren, X., et al. (2020). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Industrial Crops & Products*, 151, 112442.
- 42) Erythropel, H. C., Zimmerman, J. B., de Winter, T. M., Petitjean, L., Melnikov, F., Ho Lam, C., et al. (2018). The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry*, 20 (9), 1929-1961.
- 43) Yang, Z. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 168, 31-59.
- 44) Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., et al. (2019). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-29.
- 45) Anastas, P. T., & Warner, J. C. (2007). *Πράσινη Χημεία - Θεωρία και Πράξη*. (Κ. Αμπελιώτης, Μ. Καπασσά, & Π. Α. Σίσκος, Trans.) Ηράκλειο Κρήτης: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- 46) Senrayan, J., & Venkatachalam, S. (2020). Ultrasonic acoustic-cavitation as a novel and emerging energy efficient technique for oil extraction from kapok seeds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 62, 102347.
- 47) Chandrapala, J., Oliver, C. M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2013). Use of Power Ultrasound to Improve Extraction and Modify Phase Transitions in Food Processing. *Food Reviews International*, 29 (1), 67-91.
- 48) Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.
- 49) Yang, B., Zhang, M., Weng, H., Xu, Y., & Zeng, L. (2020). Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Ginsenoside Compound from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl by Response Surface Methodology (RSM). *Molecules*, 25 (1), 193-206.
- 50) Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- 51) Silva, E. O., Borges, L. L., Conceição, E. C., & Bara, M. T. (2017). Box–Behnken experimental design for extraction of artemisinin from *Artemisia annua* and validation of the assay method. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27 (4), 519-524.
- 52) Balachandran, M., Stanly, L. P., Mulaleekrishnan, R., & Bhagawan, S. S. (2010). Modeling NBR-Layered Silicate Nanocomposites: A DoE Approach. *Journal of Applied Polymer Science*, 118 (6), 3300–3310.
- 53) Rambo, D. F., Biegelmeier, R., Toson, N. S., Dresch, R. R., Moreno, P. R., & Henriques, A. T. (2019). Box–Behnken experimental design for extraction optimization of alkaloids from *Erythrina verna* Vell. trunk barks and LC Method Validation. *Industrial Crops & Products*, 133, 250-258.
- 54) Santos, M. K., Borille, B. T., Cruz, G. N., Coppe, B. C., Comiran, E., Kaiser, S., et al. (2014). Extraction optimization using Box–Behnken design and method validation for ethanol in oral fluid. *Analytical Methods*, 6 (15), 6095-6104.

55) Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J. M., Brandão, G. C., et al. (2007). Review: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597, 179-186.

56) Mushtaq, Z., Nadeem, M. T., Arshad, M. U., Saeed, F., Ahmed, M. H., Ain, H. B., et al. (2019). Exploring the biochemical and antioxidant potential of ginger (Adric) and turmeric (Haldi). *International Journal of Food Properties*, 22 (1), 1642-1651.

57) Endo, K., Kanno, E., & Oshima, Y. (1990). Structures of antifungal diarylheptenones, gingerenones A, B, C and isogingerenone B, isolated from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry*, 29 (3), 797-799.

58) Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

▪ **Βιβλιογραφία εικόνων και σχημάτων:**

Εικόνα 1: Rehman, R., Akram, M., Akhtar, N., Jabeen, Q., Saeed, T., Ali Shah, S. M., et al. (2011). *Zingiber officinale* Roscoe (pharmacological activity). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (3), 344-348.

Εικόνες 2 και 3: Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.

Εικόνα 4: Senrayan, J., & Venkatachalam, S. (2020). Ultrasonic acoustic-cavitation as a novel and emerging energy efficient technique for oil extraction from kapok seeds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 62, 102347.

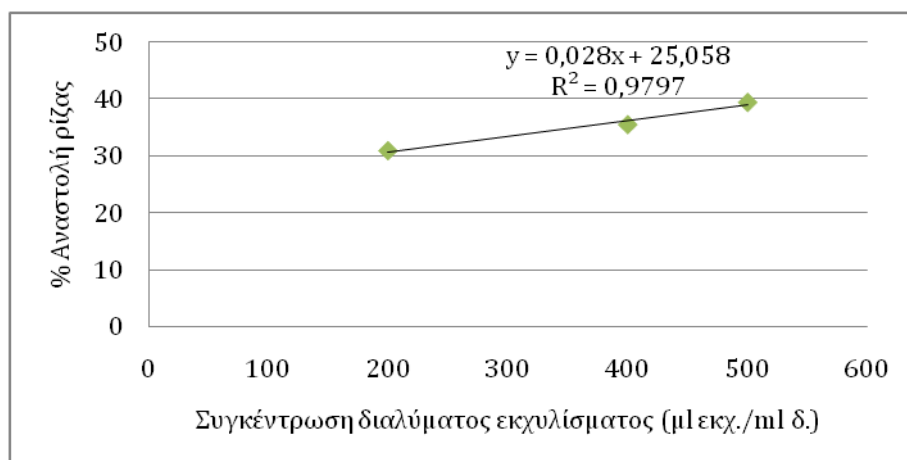
Σχήμα 2: Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., & Danet, A. F. (2009). Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14 (1), 480-493.

Σχήμα 5: Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J. M., Brandão, G. C., et al. (2007). Review: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597, 179-186.

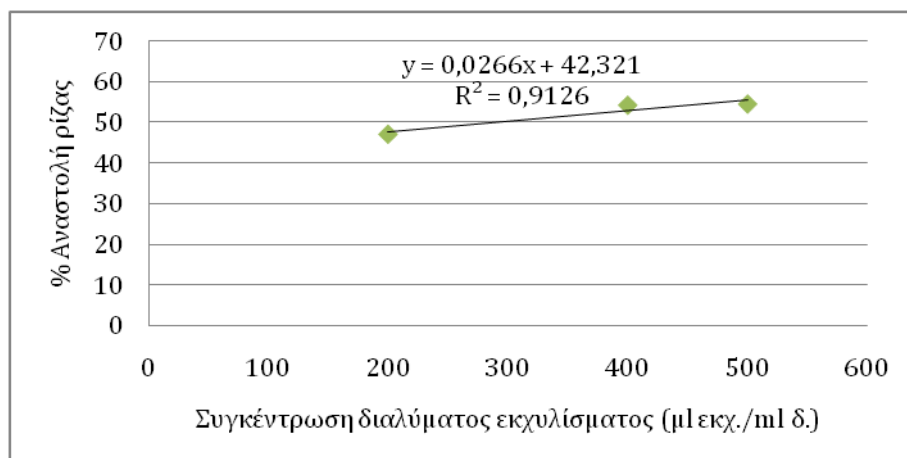
Οι συντακτικοί τύποι των ενώσεων σχεδιάστηκαν με την online έκδοση του Chemdraw (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>).

Παράρτημα Ι

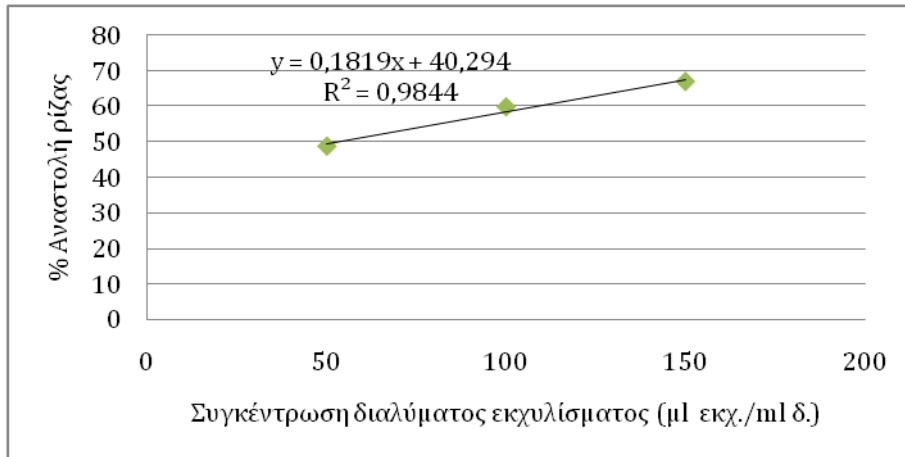
Γράφημα 30: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 30 min.



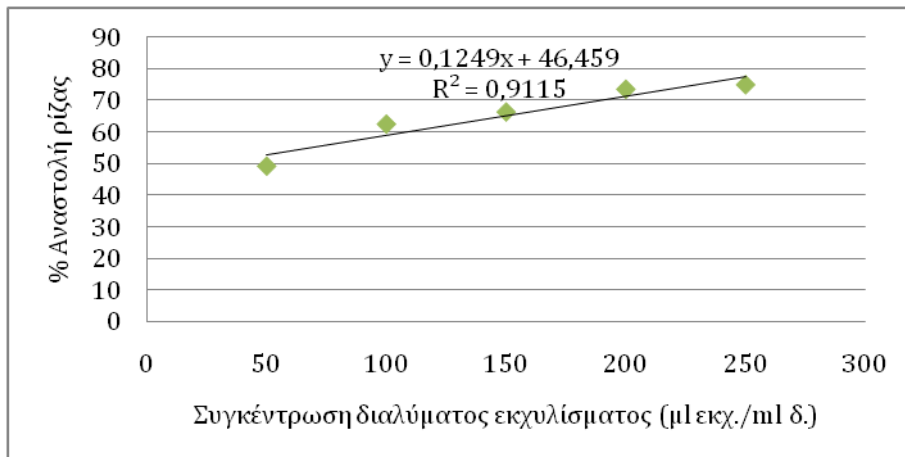
Γράφημα 31: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 60 min.



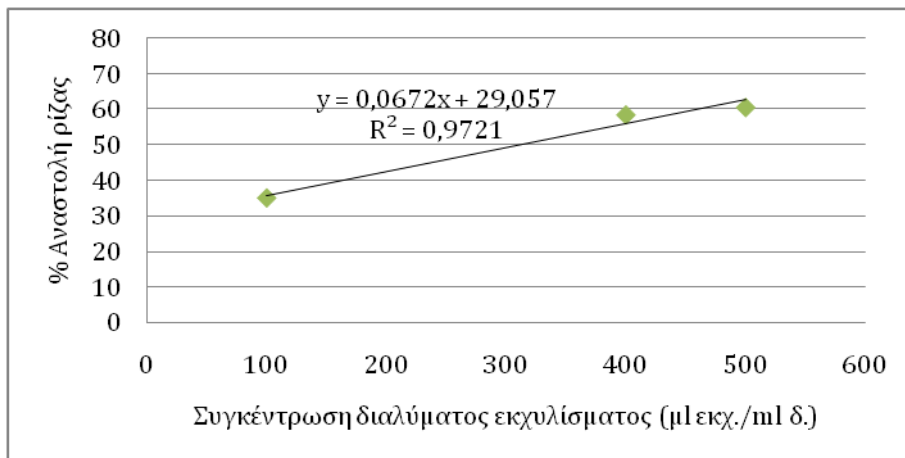
Γράφημα 32: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK4a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



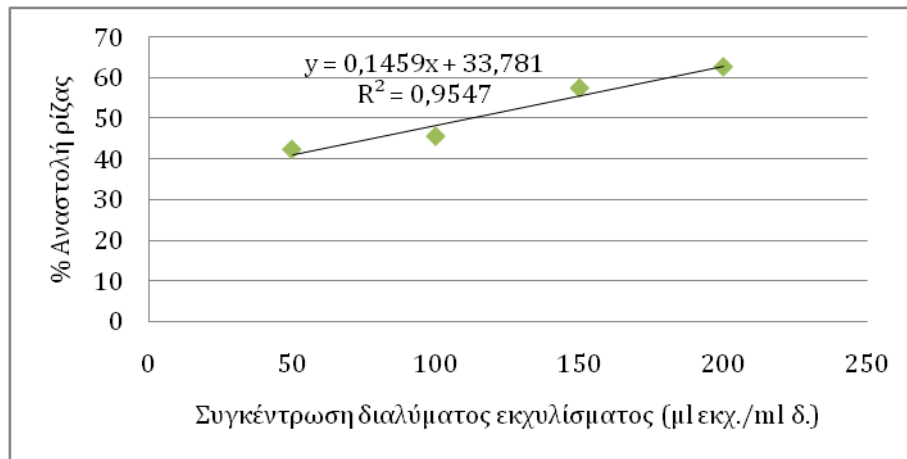
Γράφημα 33: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK5, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



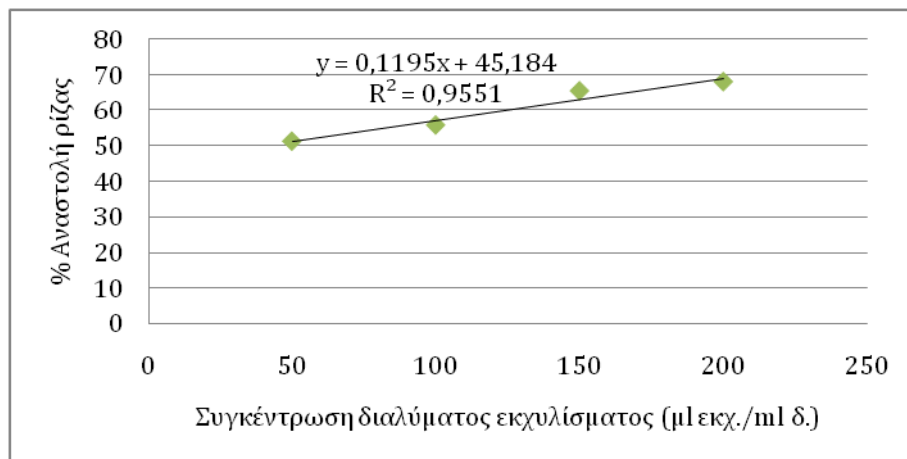
Γράφημα 34: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK7, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 30 min.



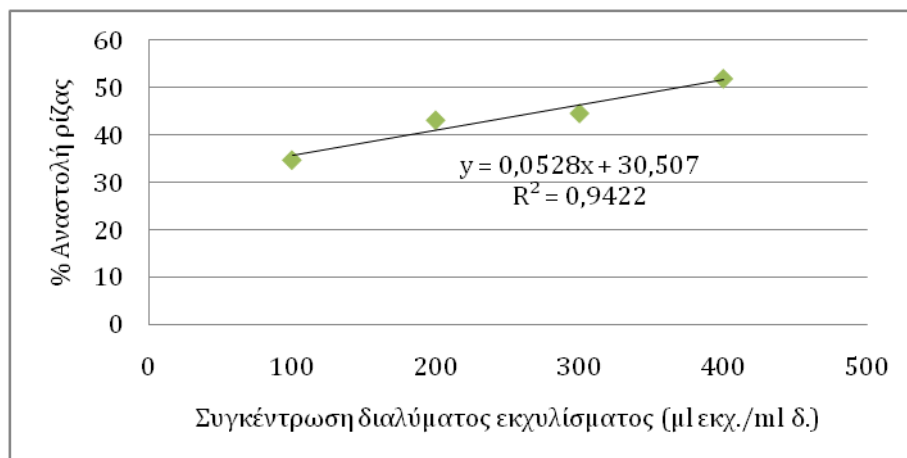
Γράφημα 35: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



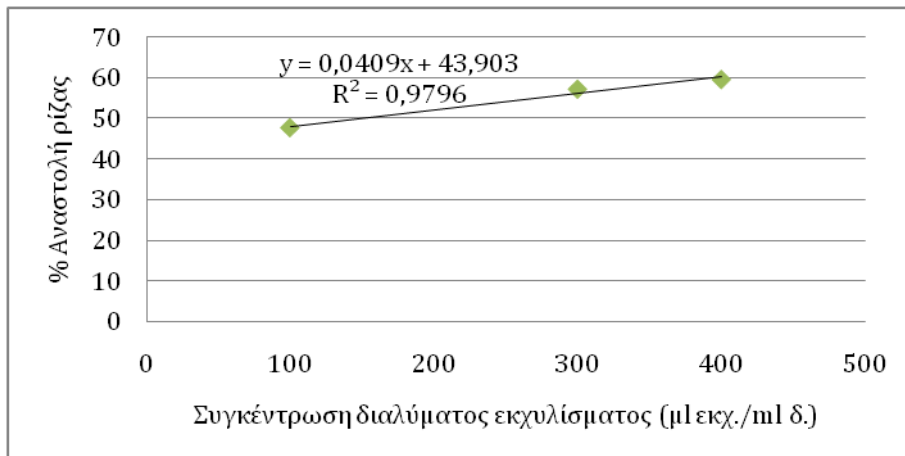
Γράφημα 36: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



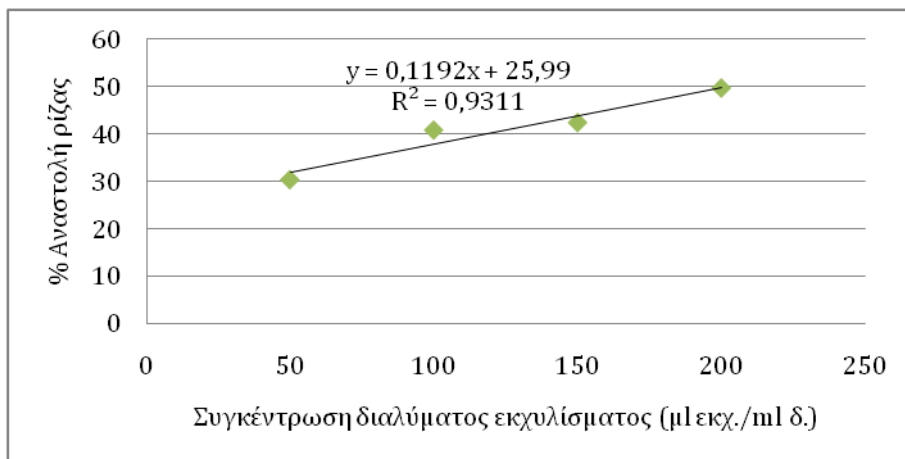
Γράφημα 37: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK8, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 30 min.



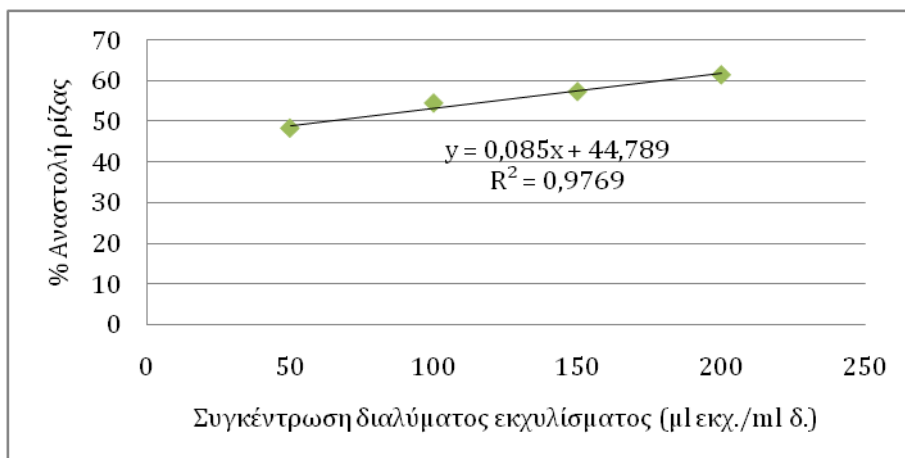
Γράφημα 38: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK8, για μη αραιωμένο εκχύλισμα και χρόνο επώασης 60 min.



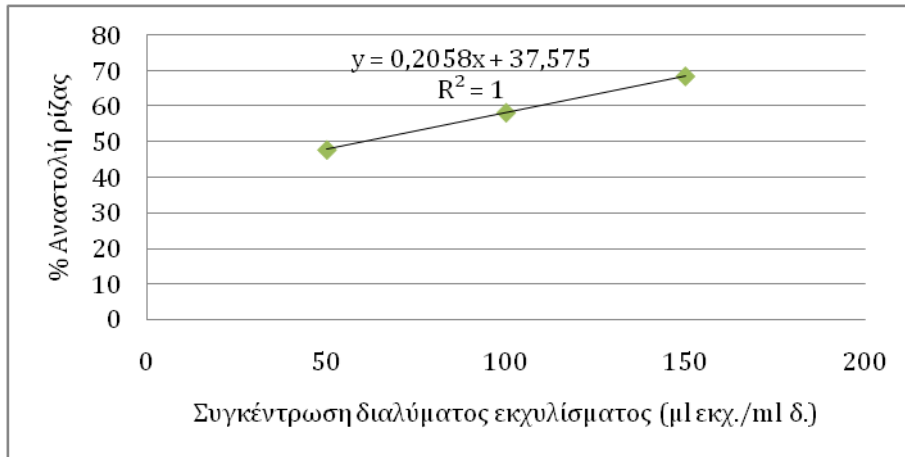
Γράφημα 39: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK8, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



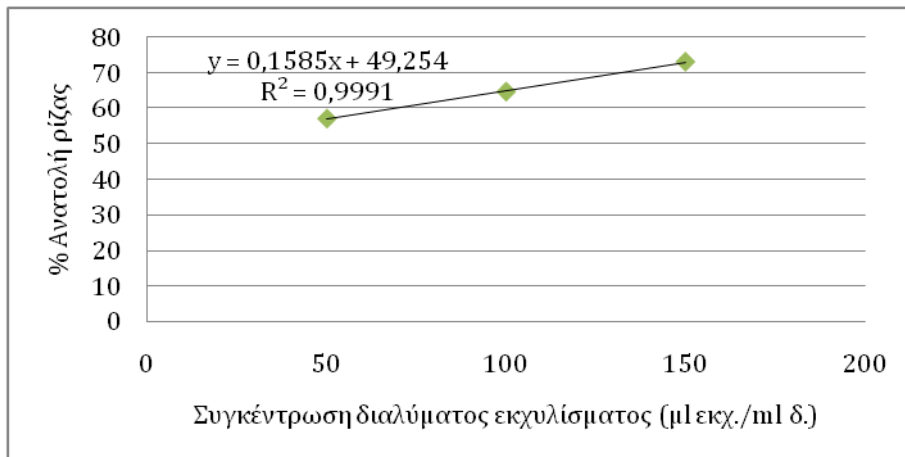
Γράφημα 40: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK8, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



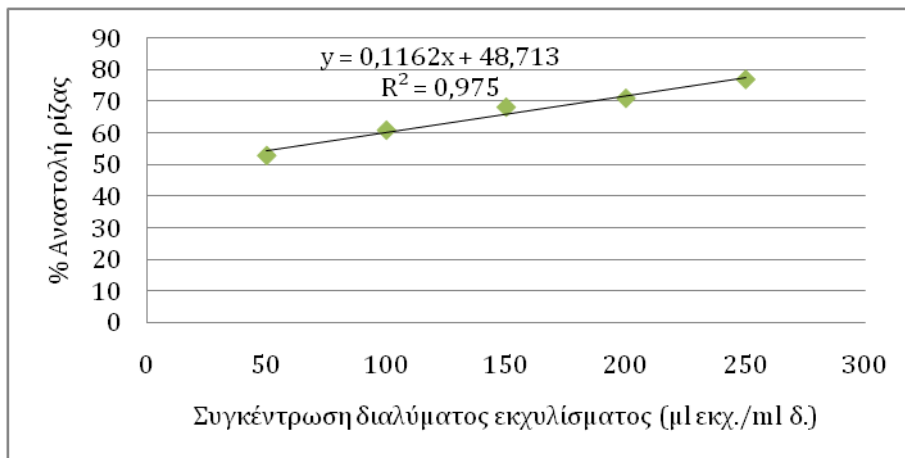
Γράφημα 41: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK10a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



Γράφημα 42: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK10a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.

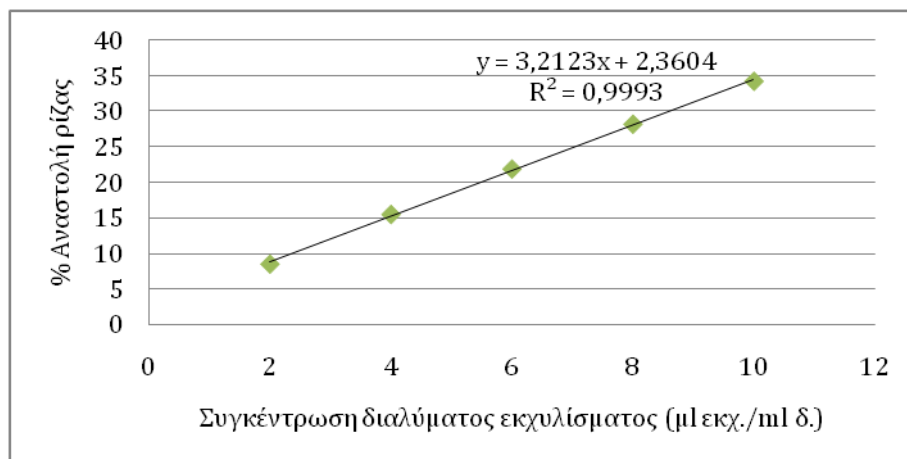


Γράφημα 43: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK10b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,5 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.

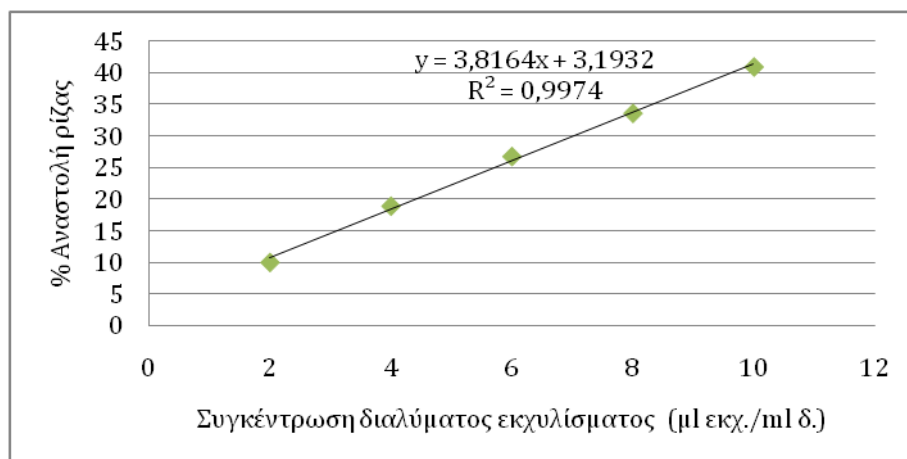


Παράρτημα II

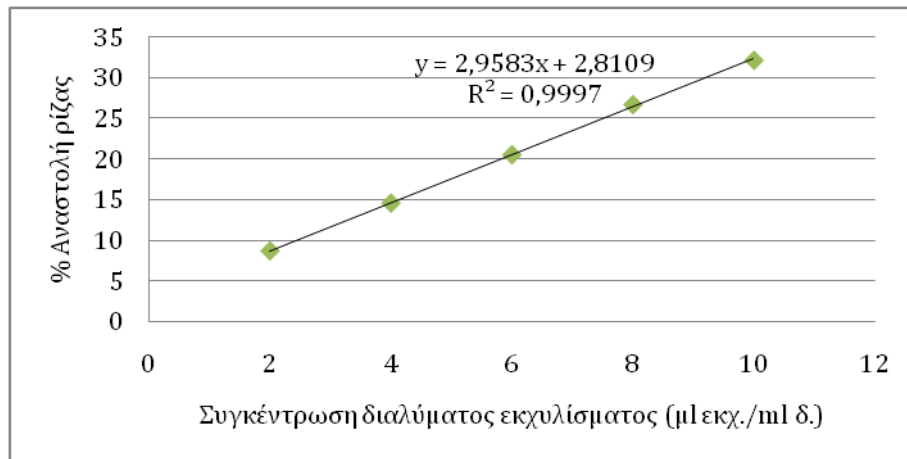
Γράφημα 44: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK12a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



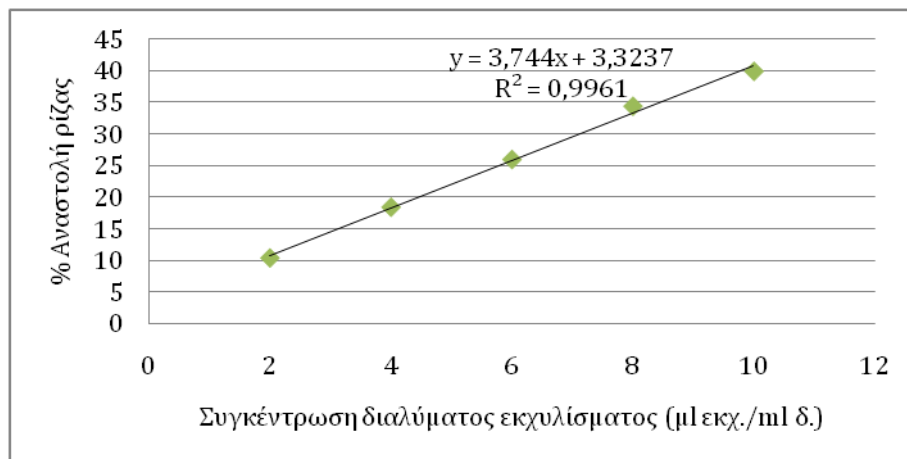
Γράφημα 45: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK12a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



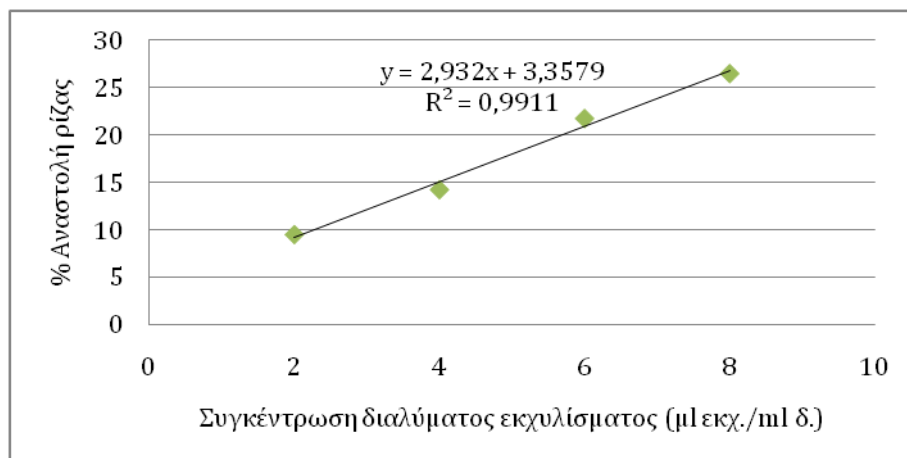
Γράφημα 46: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK12b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



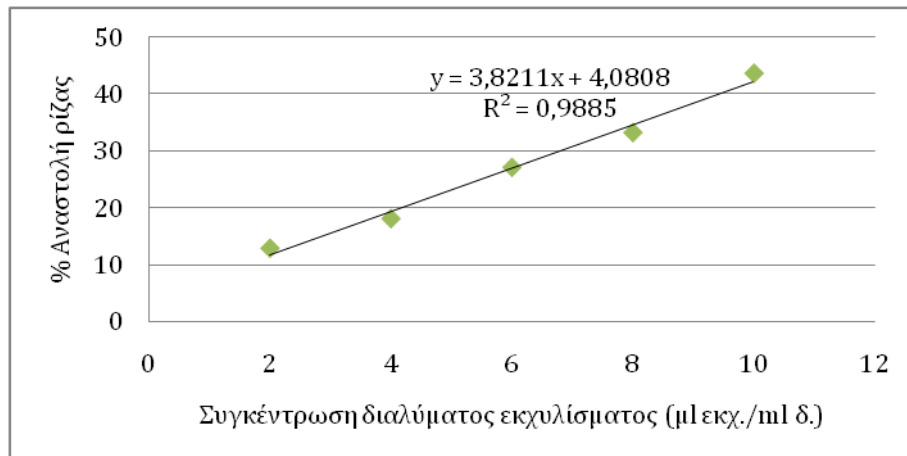
Γράφημα 47: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK12b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



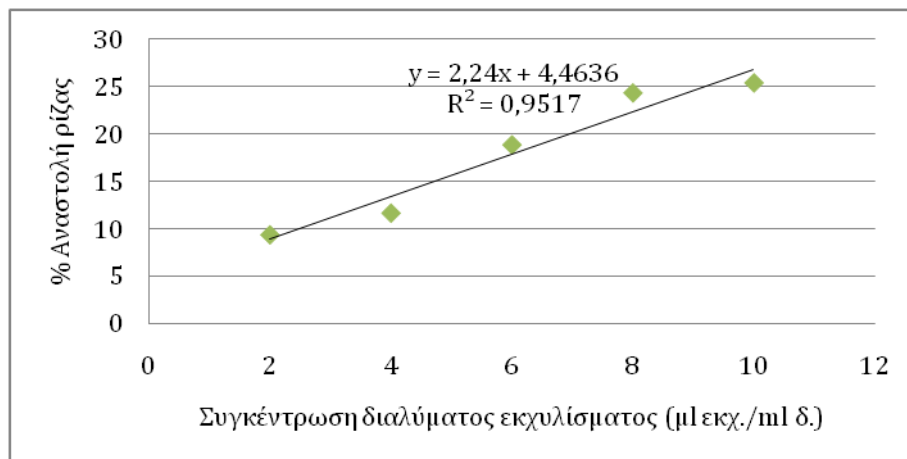
Γράφημα 48: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK13a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



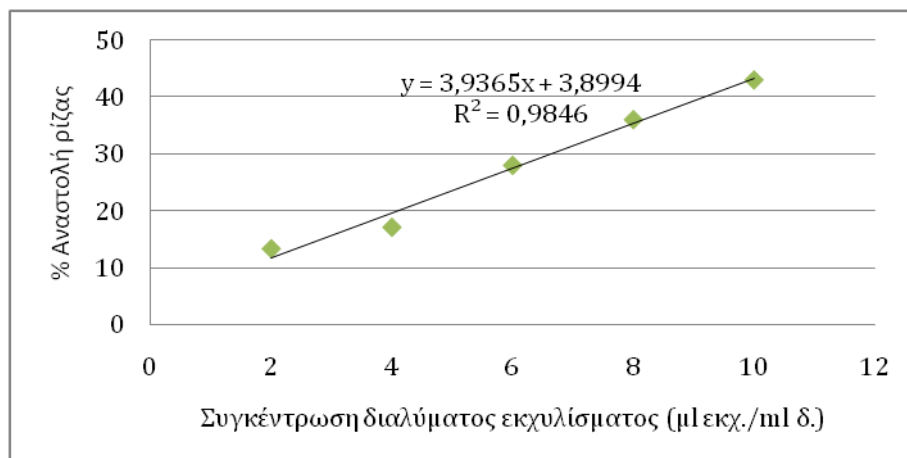
Γράφημα 49: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK13a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



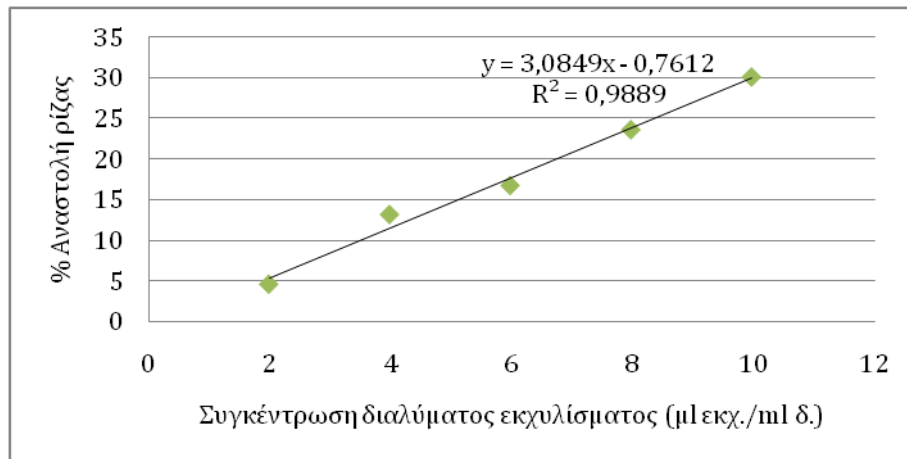
Γράφημα 50: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK13b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



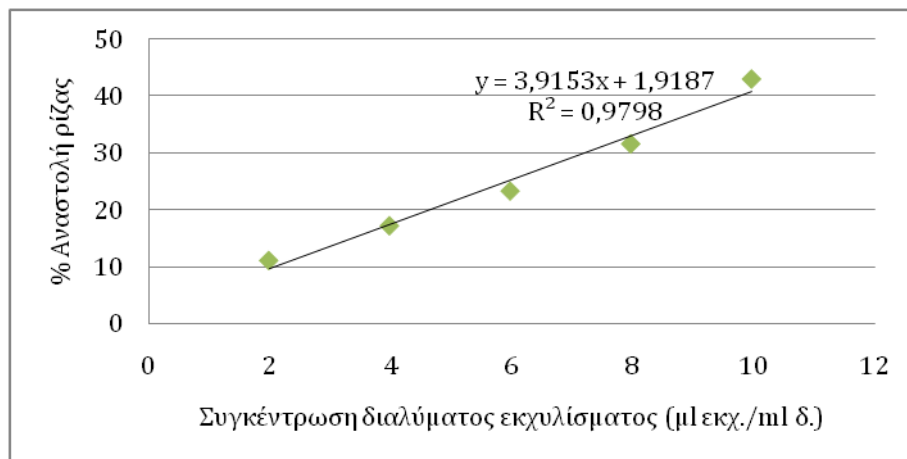
Γράφημα 51: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK13b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



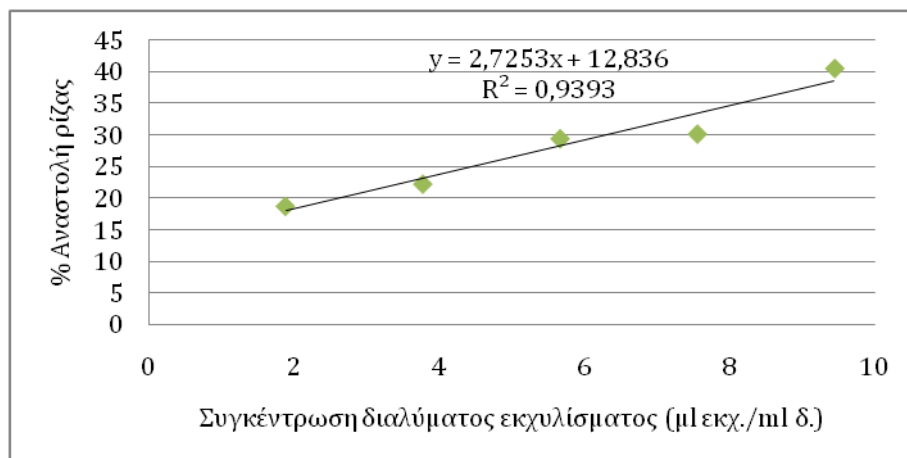
Γράφημα 52: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK15, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



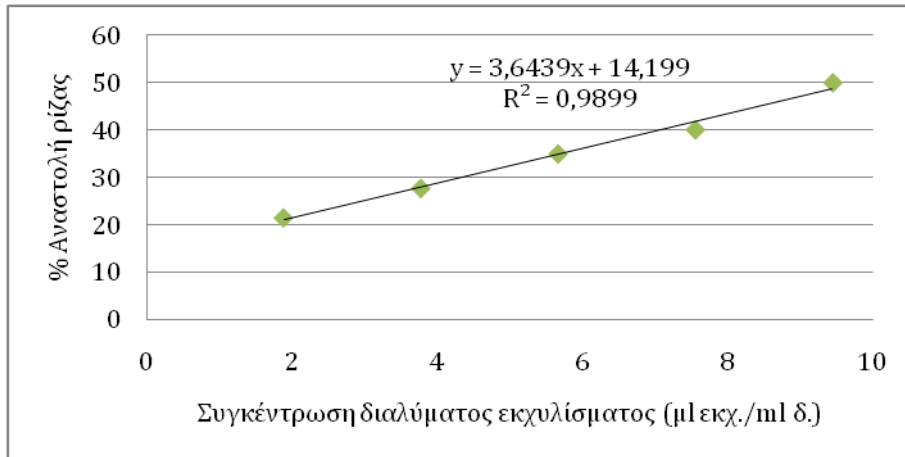
Γράφημα 53: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK15, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



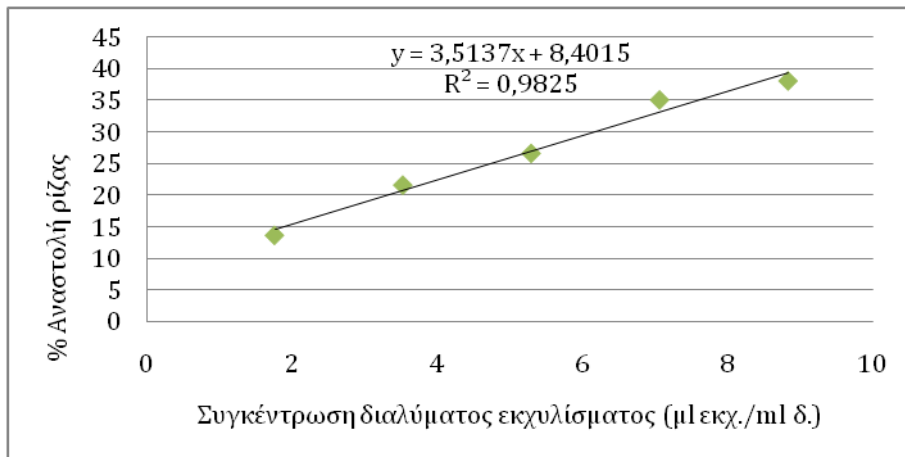
Γράφημα 54: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



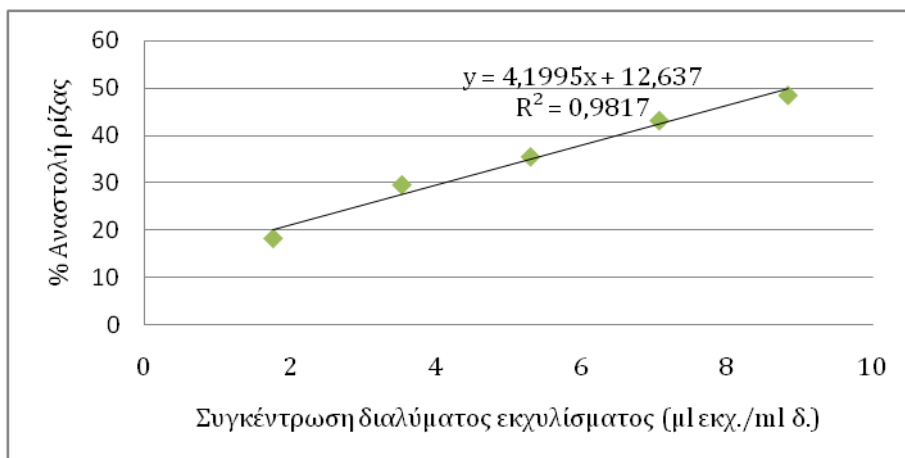
Γράφημα 55: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



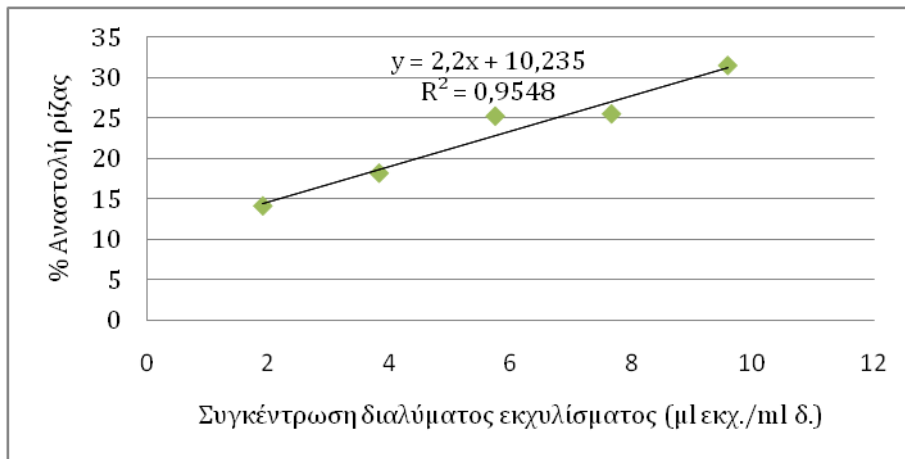
Γράφημα 56: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



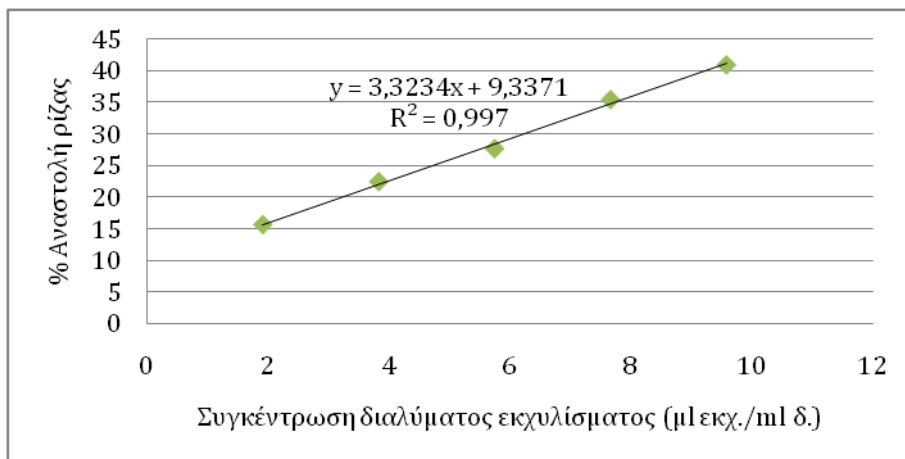
Γράφημα 57: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18a, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



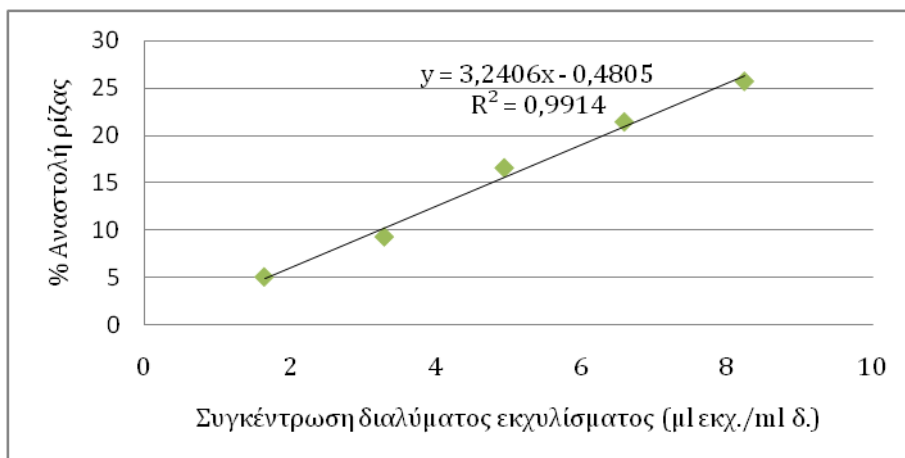
Γράφημα 58: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



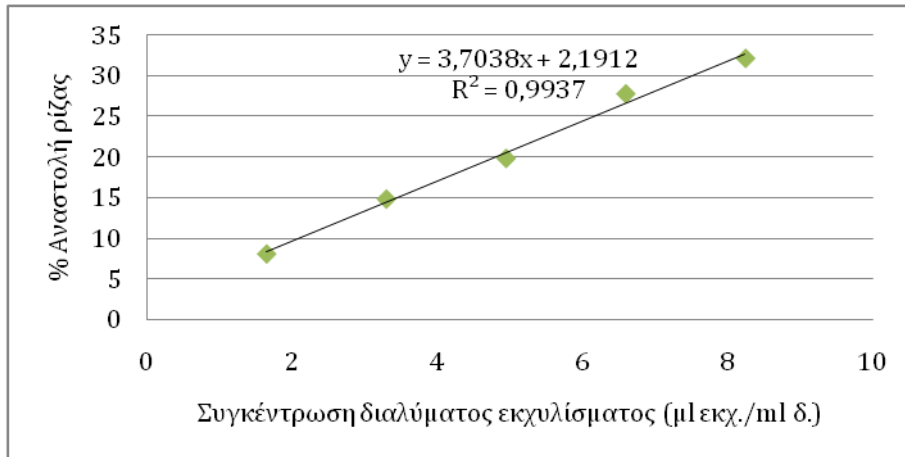
Γράφημα 59: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18b, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



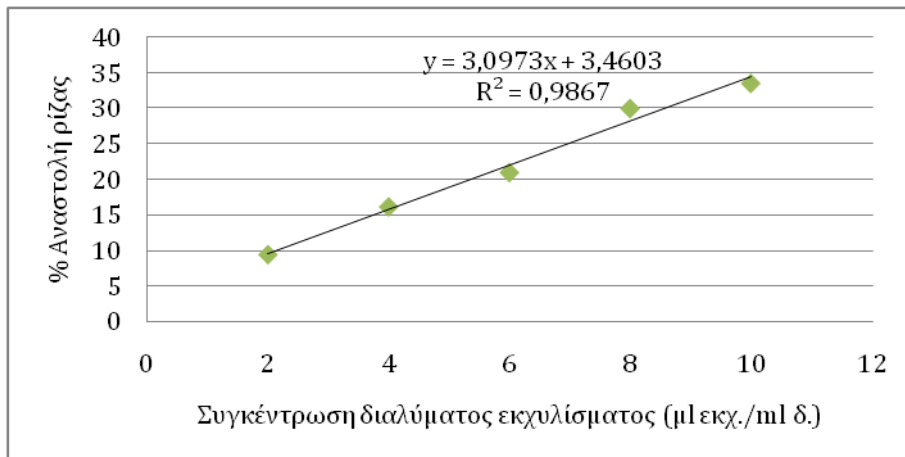
Γράφημα 60: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18c, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



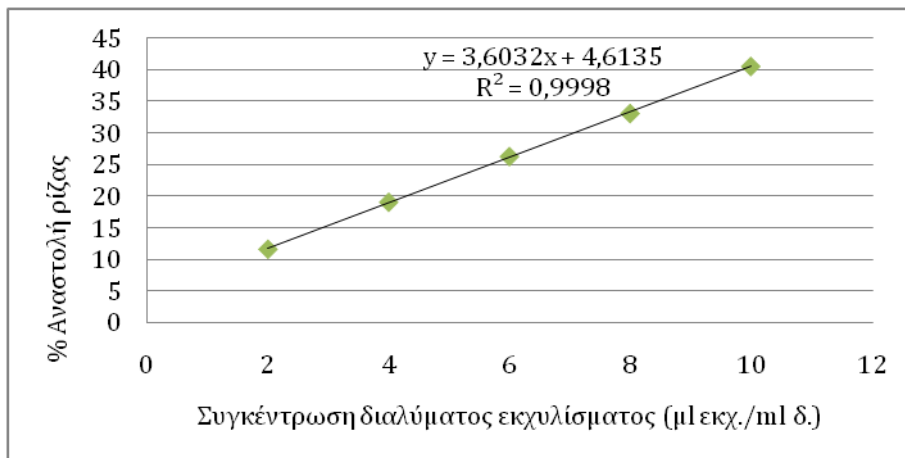
Γράφημα 61: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK18c, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



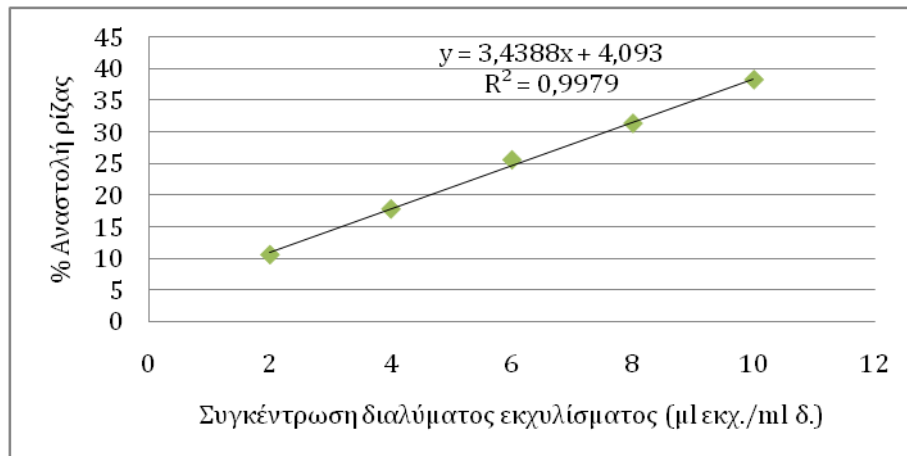
Γράφημα 62: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK20, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



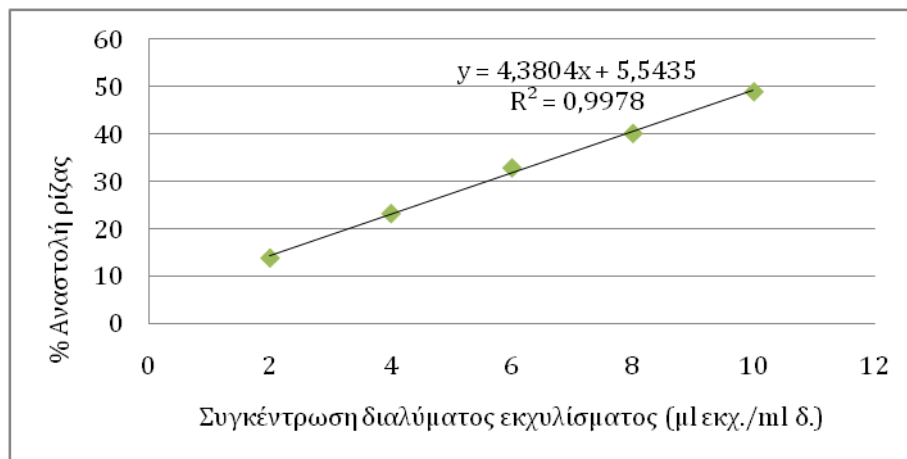
Γράφημα 63: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK20, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



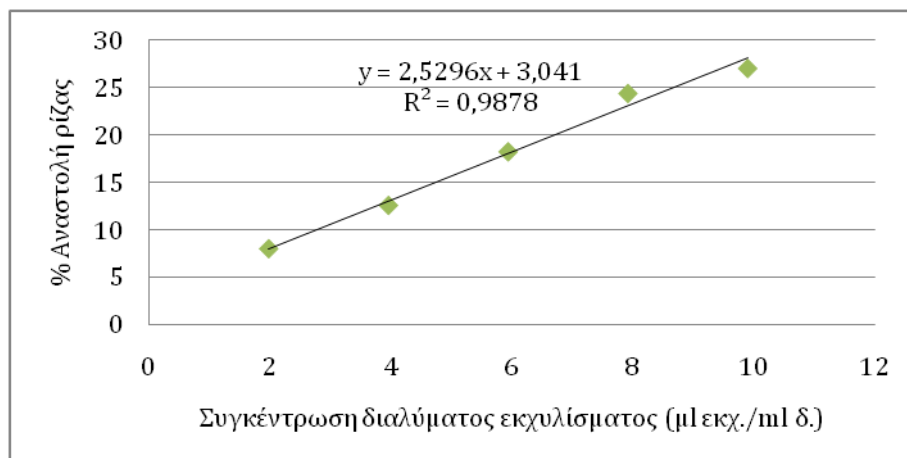
Γράφημα 64: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



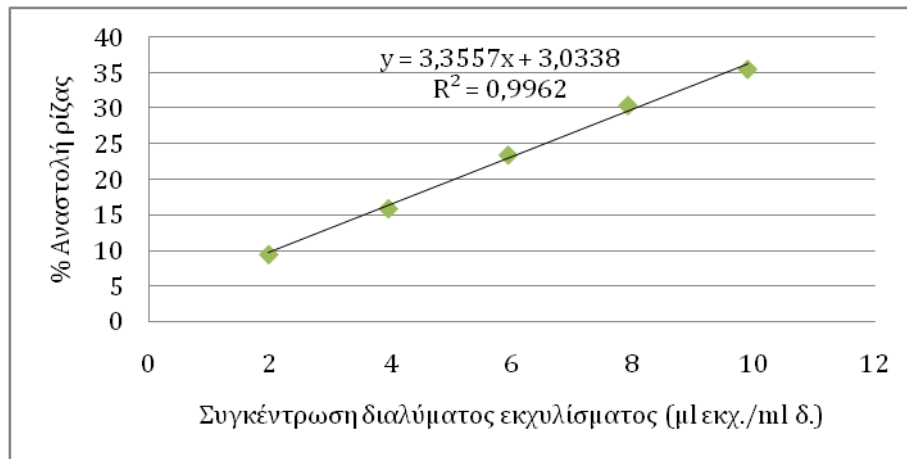
Γράφημα 65: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



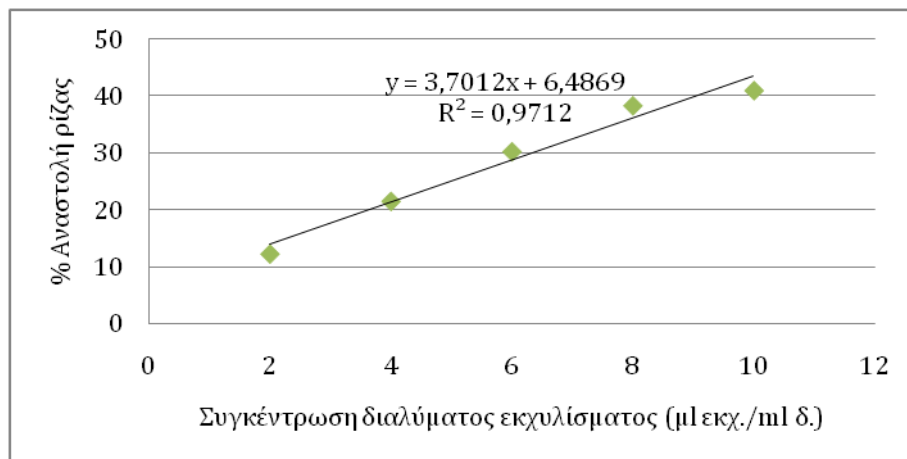
Γράφημα 66: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK22, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



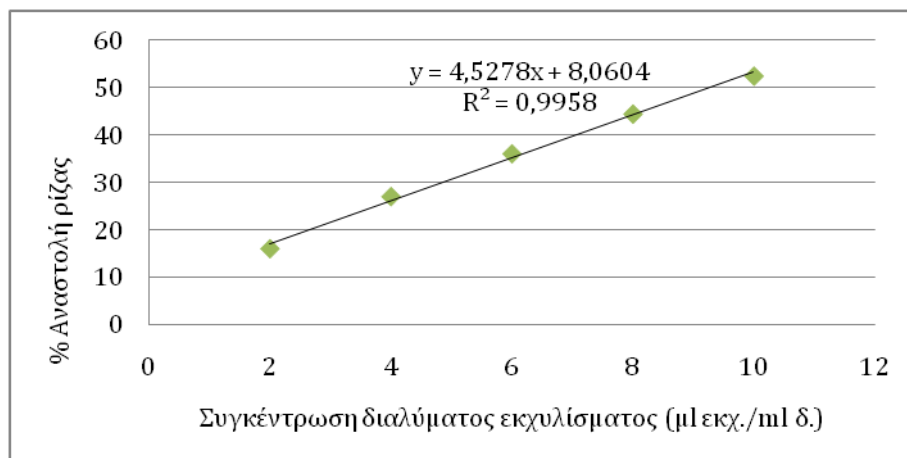
Γράφημα 67: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK22, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



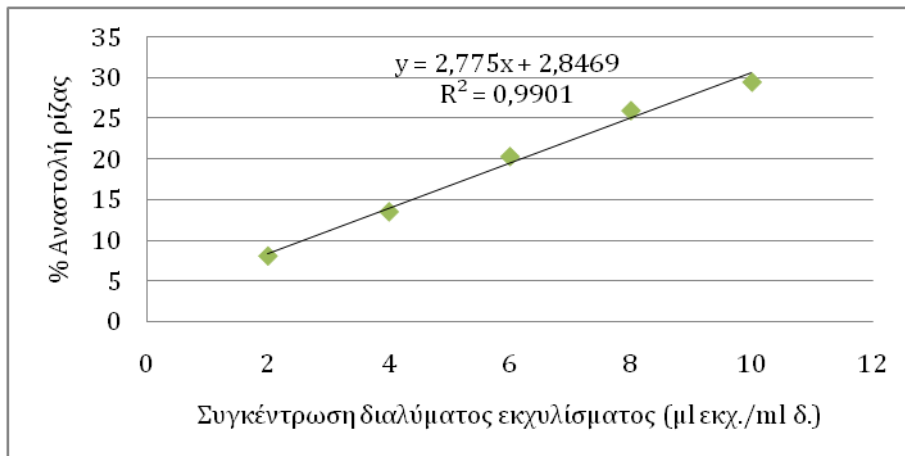
Γράφημα 68: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK23, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



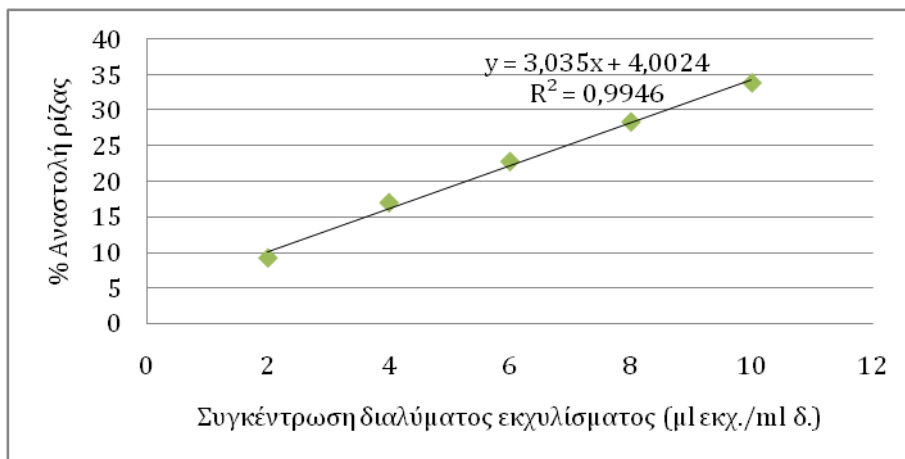
Γράφημα 69: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK23, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



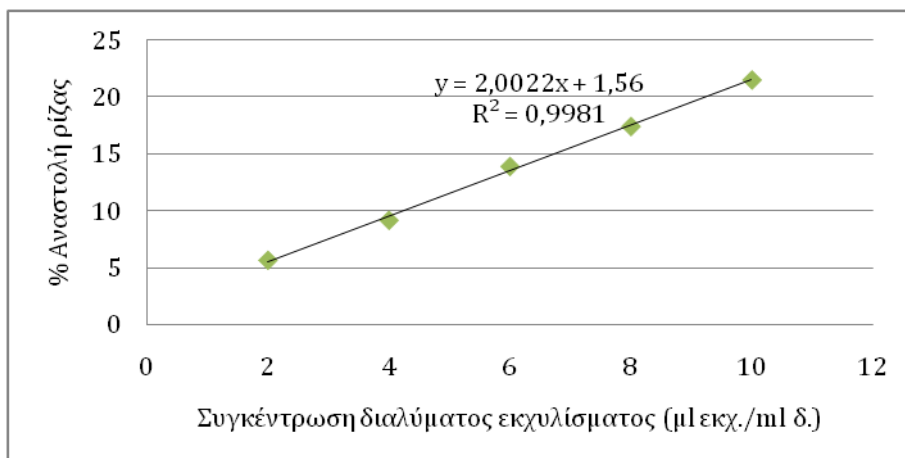
Γράφημα 70: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK24, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.



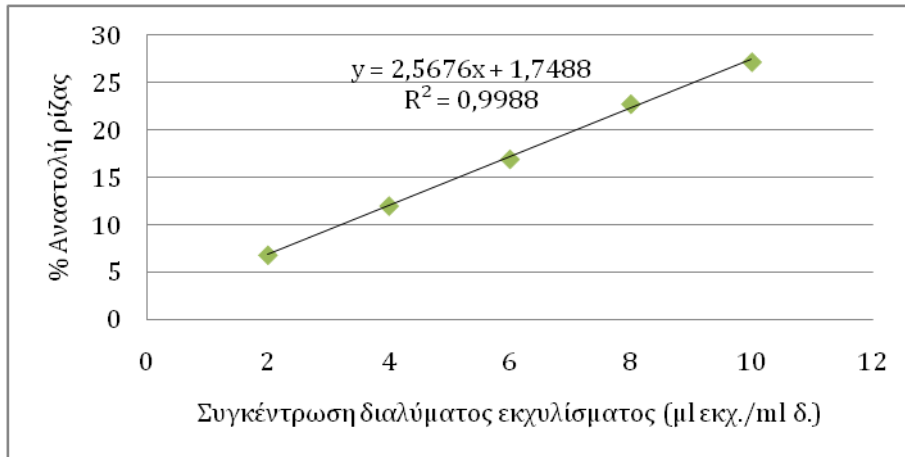
Γράφημα 71: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK24, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.



Γράφημα 72: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK25, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.

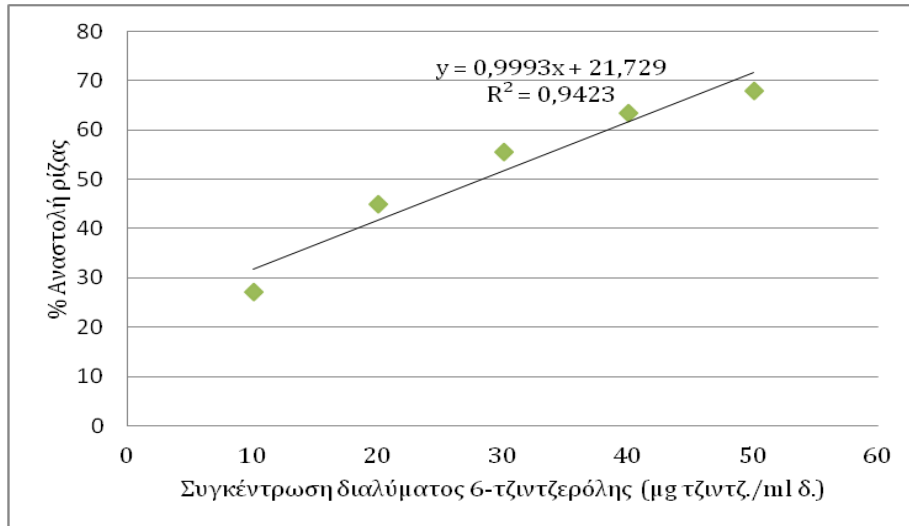


Γράφημα 73: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος STK25, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,02 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.

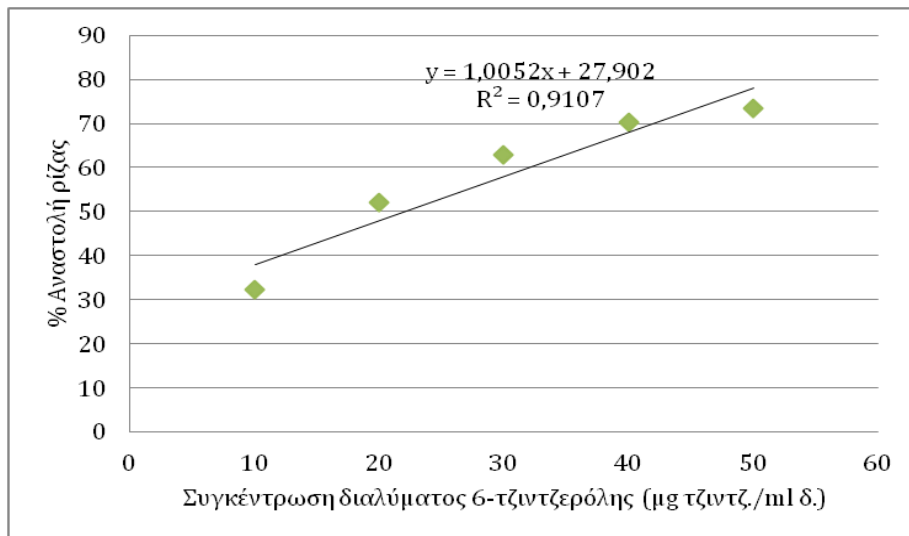


Παράρτημα III

Γράφημα 74: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μg/μl και χρόνο επώασης 30 min.



Γράφημα 75: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος συμβατικά εκχυλισμένης 6-τζιντζερόλης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μg/μl και χρόνο επώασης 60 min.



Γράφημα 76: Διάγραμμα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος κουρκουμίνης, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,01mg/ml.

