



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών (IV)

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

**Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο  
και επεξεργασία για χρήση σε καλλυντικά**

**Διπλωματική εργασία**

Λαμπρινή-Δανάη Κανακίδη



Επιβλέπουσα καθηγήτρια  
Βασιλική Ωραιοπούλου

Αθήνα  
Οκτώβριος 2020



## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Βασιλικής Ωραιοπούλου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας μου κυρία Βασιλική Ωραιοπούλου για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη και την καθοδήγηση κατά την εκπόνησή αυτού. Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην αναπληρώτρια καθηγήτρια κυρία Αναστασία Δέτση για την συνεργασία που είχα με το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας στο οποίο παρασκεύασα τις καλλυντικές συνθέσεις της διπλωματικής μου εργασίας.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ θερμά τον ΕΔΙΠ Δρ. κύριο Δημήτρη Τσιμογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγηση κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ΕΔΙΠ Δρ. Β. Γιάννου, τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Ε. Γώγου, Μ. Τσεβδού καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Γ. Δημόπουλο, Α. Λημναίο, Ι. Πιττερού και Α. Κατωπόδη για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη Σ. Μαλαξιανάκη για την εκμάθηση της μεθόδου ξήρανσης με ψεκασμό (Spray drying).

Κλείνοντας τον πενταετή κύκλο σπουδών μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τις αγαπημένες μου φίλες από το σχολείο και το πανεπιστήμιο για τις υπέροχες στιγμές που έχουμε περάσει μαζί και την υποστήριξη τους: Αλίκη, Βάσια, Γεωργία, Δανάη, Δέσποινα, Ευαγγελία, Ιωάννα, Μαρία Γ., Μαρία Γρ., Μαρία Χ., Ναυσικά, Νικολέτα, και Φωτεινή.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην μητέρα μου και την αδερφή μου για την αγάπη και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν καθημερινά.

## Περίληψη

Τα φυτικά εκχυλίσματα αποτελούν πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών, όπως οι πολυφαινόλες και εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες καλλυντικών, τροφίμων και φαρμάκων. Το δεντρολίβανο είναι αρωματικό φυτό της οικογένειας των Χειλανθών και συγκεκριμένα είναι ένας πολυετής αειθαλής, πράσινος θάμνος. Λόγω των βιοδραστικών συστατικών του (τερπενικά συστατικά, флаβονοειδή και φαινολικά οξέα), τα εκχυλίσματα αυτού διαθέτουν εξαιρετική αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη και χημειοπροστατευτική δράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης φύλλων δεντρολίβανου: της εκχύλισης σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου και της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους. Ακόμη, εξετάστηκε η χρήση διαφορετικών διαλυτών (ακετόνη 100%, νερό 100%, ακετόνη:νερό (80:20) και αιθανόλη:νερό (60:40)) ως παράμετρος αποτελεσματικότητας των εκχυλίσεων. Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες αναλύσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα trolox. Ακόμη, μελετήθηκε η περιεκτικότητά τους σε ολικές φαινολικές ενώσεις, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE). Τέλος, τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC), με σκοπό την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των κυριότερων φαινολικών συστατικών.

Από την δοκιμή DPPH προέκυψε ότι το εκχύλισμα που εμφάνισε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ήταν αυτό της ακετόνης:νερού σε αναλογία 80:20 σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (127,3±4,5 g trolox/kg ξηρού φυτού). Αντίστοιχα, με βάση την δοκιμή Folin-Ciocalteu μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες προέκυψε ότι έχει το εκχύλισμα ακετόνης:νερού (80:20) που έχει παραχθεί με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (64,5±6,0 g GAE/kg ξηρού φυτού). Από την ανάλυση HPLC ταυτοποιήθηκαν τα κυριότερα συστατικά των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου που ήταν το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ με αντίστοιχους μέσους χρόνους έκλουσης: 35,31±0,53 min, 53,14±1,42 min και 55,40±0,31 min. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν και δευτερεύοντα συστατικά και συγκεκριμένα με σειρά έκλουσης τα πολικά флаβονοειδή: νεπιτρίνη, ομοπλανταγενίνη και ισοσκουτελαρεΐνη καθώς και τα πιο άπολα флаβονοειδή: σιρσιμαριτίνη, λαδανειΐνη, γενκβανίνη, σαλβιγενίνη και 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη. Εκτός από το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη, ταυτοποιήθηκε και ένα ακόμη φαινολικό διτερπένιο, ο καρνοσικός μεθυλεστέρας, που εκλύεται μετά το καρνοσικό οξύ. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των συστατικών προέκυψε υψηλότερη συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά διτερπένια (Total phenolic diterpenes, TPD) στα εκχυλίσματα ακετόνης:νερού (80:20) σε σταθερή κλίνη (18,2±0,3 g TPD/kg ξηρού φυτού). Το ροσμαρινικό οξύ (Rosmarinic acid, RA) βρέθηκε επίσης σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα εκχυλίσματα ακετόνης:νερού (80:20) σε σταθερή κλίνη (21,3±1,2 g RA/kg ξηρού φυτού) ενώ η περιεκτικότητα σε флаβονοειδή ήταν μεγαλύτερη στα εκχυλίσματα ίδιας αναλογίας διαλυτών που προέκυψαν όμως με υποβοήθηση από υπερήχους (47,4±4,7 g флаβονοειδών/kg ξηρού φυτού). Σε αυτόν τον τύπο εκχυλισμάτων υπολογίστηκε υψηλότερη συγκέντρωση των πιο πολικών флаβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν ανά kg ξηρού φυτού. Αντίθετα, τα υπόλοιπα πέντε ταυτοποιημένα флаβονοειδή βρίσκονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα σταθερής κλίνης ημιδιαλείποντος έργου.

Στη συνέχεια, τα παραγόμενα εκχυλίσματα υπέστησαν μικροεγκλεισμό μέσω ξήρανσης με ψεκασμό για την παραγωγή ξηρών κόνεων. Η διεργασία αυτή, παρέχει τη δυνατότητα προστασίας και ελεγχόμενης απελευθέρωσης των εγκλεισμένων συστατικών. Οι φορείς εγκλεισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μαλτοδεξτρίνη (MD) και το αραβικό κόμμι (GA). Σκοπός ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής του μίγματος τροφοδοσίας και λειτουργίας του ξηραντήρα με ψεκασμό για τις οποίες επιτυγχάνεται μέγιστη απόδοση (Microencapsulation Yield, MEY (%)) και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού (Microencapsulation Efficiency, MEE (%)) των προς εγκλεισμό συστατικών. Έτσι, οι παράμετροι που εξετάστηκαν σε αυτά τα πειράματα ήταν η θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης (140 °C και 160 °C), η διαφορετική αναλογία εγκλειστικών μέσων MD:GA ((1:0), (4:1) και (2:1)) και η περιεκτικότητα των παραγόμενων μικροκαψουλών σε ενεργά συστατικά (5%, 10% και 20% core). Η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού του RA (MEE $\geq$ 92,40 $\pm$ 0,04%) και των φλαβονοειδών (MEE $\geq$ 90,36 $\pm$ 0,04%) ήταν ιδιαίτερα υψηλή αντίστοιχα σε όλα τα πειράματα. Για τα υδατικά εκχυλίσματα προέκυψε μεγαλύτερη MEY και MEE των βιοδραστικών συστατικών όταν το εγκλειστικό μέσο ήταν MD:GA σε αναλογία 4:1, η θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης 160 °C και η περιεκτικότητα σε core 10%. Συγκεκριμένα, το RA είχε MEY=100,00 $\pm$ 4,40% και τα φλαβονοειδή αντίστοιχα MEY=96,90 $\pm$ 0,01% ενώ οι τιμές που αφορούσαν την MEE υπολογίστηκαν ίσες με 97,93 $\pm$ 0,13% και 97,41 $\pm$ 0,22%. Τα ακετονικά εκχυλίσματα αλλά και τα μίγματα διαλυτών (ακετόνη:νερό και αιθανόλη:νερό) περιέχουν φαινολικά διτερπένια τα οποία είναι άπολα και συγχρόνως ευοξειδωτα συστατικά. Λόγω της απουσίας οργανικών διαλυτών στο τελικό μίγμα τροφοδοσίας, αλλά και λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, ο μικροεγκλεισμός αυτών των συστατικών με την μέθοδο της ξήρανσης με ψεκασμό κρίθηκε δυσχερέστερος. Στην περίπτωση των μιγμάτων, βέλτιστη αναλογία φορέων εγκλεισμού θεωρήθηκε η MD:GA (4:1). Συγκεκριμένα, η MEY και η MEE του συνόλου των βιοδραστικών συστατικών ήταν υψηλότερη όταν τα αρχικά εκχυλίσματα προερχόταν από μίγμα αιθανόλης:νερού. Για το RA, τα φλαβονοειδή και τα TPD οι MEY αντίστοιχα υπολογίστηκαν 99,09 $\pm$ 1,19%, 95,48 $\pm$ 8,03% και 84,79 $\pm$ 1,32%. Οι αντίστοιχες τιμές για την MEE υπολογίστηκαν 97,20 $\pm$ 0,71%, 91,52 $\pm$ 0,86% και 52,59 $\pm$ 0,95%. Στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα η παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η περιεκτικότητα σε πυρήνα (%core) σε σταθερή θερμοκρασία 140 °C και αναλογία φορέων MD:GA (2:1). Από τα πειράματα κρίθηκε βέλτιστη η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πυρήνα (5% core) και συγκεκριμένα όσο αφορά τα TPD, η MEY υπολογίστηκε ίση με 89,70 $\pm$ 1,00% και η MEE=76,35 $\pm$ 0,76%. Επιπρόσθετα, οι κόνεις ελέγχθηκαν ως προς τη διατηρησιμότητα των φαινολικών συστατικών σε διάστημα περίπου ενός ή έξι μηνών. Σε διάστημα 28 ημερών, οι κόνεις που είχαν εγκλεισμένα συστατικά από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας δεν είχαν υποστεί σημαντική υποβάθμιση. Αντίθετα, σε διάστημα εξαμήνου (197 ημέρες), όπου εξετάστηκαν οι κόνεις που παρασκευάστηκαν δοκιμαστικά με το υδατικό εκχύλισμα μεγαλύτερης κλίμακας, διαπιστώθηκε υποβάθμιση ιδιαίτερα των φλαβονοειδών. Σχετικά με την διατηρησιμότητα των φαινολικών διτερπενίων στις κόνεις αναφέρεται ότι ήταν εμφανής η μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη, λόγω οξειδωσης. Συγκεκριμένα, η σκόνη με περιεκτικότητα 5% core συνεχίζει να έχει υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού φαινολικών διτερπενίων αλλά η υποβάθμιση της είναι μεγαλύτερη από την σκόνη υψηλότερης περιεκτικότητας σε ενεργά συστατικά (10% core).

Επιπλέον, μελετήθηκε η διατηρησιμότητα των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου με την ενσωμάτωση ελαιοδιαλύματος αυτών σε γαλακτώματα (o/w) τα οποία αποθηκεύτηκαν σε κλιβάνους των 15 και των 37 °C και αναλύθηκαν στην διάρκεια 21 ημερών. Συγκεκριμένα, το καρνοσικό οξύ αποικοδομήθηκε πλήρως σε διάστημα 15 ημερών στην θερμοκρασία των 37 °C ενώ στους 15 °C δεν επήλθε πλήρης αποικοδόμηση στο διάστημα όπου πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι. Λόγω της οξειδωσης, το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη και άλλα φαινολικά διτερπένια και έτσι μια πιο ασφαλής προσέγγιση για τον

έλεγχο της διατηρησιμότητας των φαινολικών διτερπενίων στα γαλακτώματα είναι η μέτρηση του συνόλου των παραγώγων. Στο διάστημα που γίνεται η μελέτη διατηρησιμότητας των συστατικών στα γαλακτώματα τα TPD ακολουθούν κινητική μηδενικής τάξης με ρυθμό υποβάθμισης στην θερμοκρασία των 37 και των 15 °C αντίστοιχα ίσο με  $k_{37}=60,774 \text{ days}^{-1}$  και  $k_{15}=36,768 \text{ days}^{-1}$ . Αντίστοιχα για το RA, το οποίο ακολουθεί κινητική υποβάθμισης πρώτης τάξης, ο ρυθμός υποβάθμισης στους 37 °C υπολογίστηκε ίσος με  $k_{37}=0,020 \text{ days}^{-1}$  ενώ στους 15 °C ίσος με  $k_{15}=0,016 \text{ days}^{-1}$ . Ίδιας τάξης κινητική ακολουθούν και τα φλαβονοειδή με ρυθμούς υποβάθμισης ίσους με  $k_{37}=0,017 \text{ days}^{-1}$  και  $k_{15}=0,013 \text{ days}^{-1}$ .

Τέλος, παρασκευάστηκαν τρεις διαφορετικές καλλυντικές κρέμες (w/o) με εμπλουτισμένη την λιπαρή ή/και την υδατική φάση σε βιοδραστικά συστατικά από τα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου με σκοπό τον έλεγχο σταθερότητας αυτών. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε μια κρέμα χωρίς βιοδραστικά συστατικά (κρέμα Blank), μια κρέμα εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια (κρέμα 1), μια με ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή (κρέμα 3) και τέλος μια με το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου (κρέμα 2). Οι κρέμες υποβλήθηκαν σε ταχείες αναλύσεις Folin-Ciocalteu και DPPH αλλά και σε HPLC για την εξέταση του φαινολικού περιεχομένου τους. Υψηλότερες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά επιτεύχθηκαν στην καλλυντική σύνθεση που διέθετε και τις δύο φάσεις εμπλουτισμένες με εκχύλισμα δεντρολίβανου (κρέμα 2). Συγκεκριμένα, συγκριτικά με τις θεωρητικές τιμές συγκέντρωσης με βάση τις οποίες παρασκευάστηκε η συγκεκριμένη σύνθεση, η απόδοση σε TPD ήταν  $98,51 \pm 2,29\%$ , σε RA  $93,59 \pm 0,01\%$  και σε ολικά φλαβονοειδή  $65,97 \pm 0,00\%$ . Η κρέμα αυτή εμφάνισε και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μέσω της ανάλυσης DPPH ( $8,77 \pm 0,32 \text{ g trolox/kg κρέμας}$ ) και το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total phenolic content, TPC) μέσω της ανάλυσης Folin-Ciocalteu ( $\text{TPC}=2,60 \pm 0,14 \text{ g GAE/kg κρέμας}$ ). Όσον αφορά το pH βέλτιστη τιμή διαθέτει η κρέμα 2 ( $\text{pH}=6,58 \pm 0,10$ ) συμπεραίνοντας ότι η προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου αλλά και ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων συμβάλει στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καλλυντικών. Τέλος, ελέγχθηκε η διατηρησιμότητα της αντιοξειδωτικής δράσης και των ολικών φαινολών μετά από 51 ημέρες από την παρασκευή των κρεμών. Στο χρονικό διάστημα αυτό το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώθηκε στις κρέμες 2 και 3 ενώ στην κρέμα 1 διατηρήθηκε πρακτικά σταθερό καθώς η τιμή αυτού ήταν αρχικά  $\text{TPC}_0=0,76 \pm 0,09 \text{ g GAE/kg κρέμας}$  και μεταβλήθηκε σε  $\text{TPC}_{51}=0,76 \pm 0,05 \text{ g GAE/kg κρέμας}$ . Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που αφορούσαν την αντιοξειδωτική δράση με κατακόρυφη μείωση αυτής στην κρέμα 2, αφού από  $8,77 \pm 0,32 \text{ g trolox/kg κρέμας}$  μειώθηκε σε  $4,73 \pm 0,21 \text{ g trolox/kg κρέμας}$ . Αντίθετα, η αντιοξειδωτική δράση της κρέμας 1 διατηρήθηκε ικανοποιητικά καθώς από  $2,20 \pm 0,14 \text{ g trolox/kg κρέμας}$  μειώθηκε μόλις στα  $1,93 \pm 0,03 \text{ g trolox/kg κρέμας}$ . Το παραπάνω αιτιολογείται από το γεγονός ότι τα βιοδραστικά συστατικά σε αυτή την σύνθεση είχαν ενσωματωθεί μέσα σε έλαιο (Medium chain triglyceride, MCT) ενώ στις άλλες δύο συνθέσεις βρίσκονταν σε διασπορά με αποτέλεσμα την ταχύτερη υποβάθμιση τους.

**Λέξεις-κλειδιά:** Δενδρολίβανο, εκχύλιση, ξήρανση με ψεκασμό, γαλακτώματα, κρέμες

# Extraction of bioactive compounds from rosemary and processing for use in cosmetics

Lamprini-Danai Kanakidi, Diploma Thesis

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

## Abstract

Plant extracts are a rich source of bioactive compounds, such as polyphenols, and have remarkable antioxidant activity. For this reason, they are widely used in the cosmetic, food and pharmaceutical industries. Rosemary is an aromatic plant of the family Lamiaceae and specifically a perennial evergreen, green shrub. Due to its bioactive components (terpenes, flavonoids and phenolic acids), its extracts have excellent antioxidant, anti-cancer, antimicrobial, anti-inflammatory and chemoprotective action.

In the present diploma thesis, the effectiveness of two different methods of rosemary leaf extraction was examined. These methods were: semi-batch extraction in a fixed bed reactor and ultrasound-assisted extraction. Also, the use of different solvents (acetone 100%, water 100%, acetone:water (80:20) and ethanol:water (60:40)) was considered as a parameter of extraction efficiency. In order to test the effectiveness of each method, some analyses were performed. Specifically, the DPPH method was used to measure the antioxidant activity of the extracts and the results were expressed in trolox equivalents. Then, their content of total phenolic compounds was studied by the Folin-Ciocalteu method and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAE). Finally, the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify the major phenolic components.

The DPPH test showed that the extract that had the best antioxidant activity was that of acetone:water in a ratio of 80:20 from a semi-batch extraction in a fixed bed reactor ( $127.3 \pm 4.5$  g trolox/kg dried plant). Respectively, based on the Folin-Ciocalteu test, the highest content of total phenols was found to have the acetone:water (80:20) extract produced by ultrasonic-assisted extraction ( $64.5 \pm 6.0$  g GAE/kg dried plant). HPLC analysis identified the main components of rosemary extracts which were rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid with respective average retention times:  $35.31 \pm 0.53$  min,  $53.14 \pm 1.42$  min and  $55.40 \pm 0.31$  min. In addition, secondary components were identified, specifically in elution order the polar flavonoids: nepitrin, homoplantagin and isoscutellarein as well as the non-polar flavonoids: cirsimaritin, ladanein, genkwanin, salvigenin and 4'-Methoxytecto-chrysin. In addition to carnosic acid and carnosol, another phenolic diterpene, methyl carnosate, which elutes after carnosic acid, has been identified. Regarding the quantification of the components, a higher concentration of total phenolic diterpenes (TPD) was obtained in the extracts of acetone:water (80:20) in a fixed bed ( $18.2 \pm 0.3$  g TPD/kg dried plant). Rosmarinic acid (RA) was also found to have a higher content in acetone: water (80:20) extracts ( $21.3 \pm 1.2$  g RA/kg dried plant) while flavonoids were higher in extracts of the same proportion of solvents by ultrasonic-assisted extraction ( $47.4 \pm 4.7$  g flavonoids/kg dried plant). In this type of extract, was calculated the higher concentration of the polar flavonoids that identified. In contrast, the other five identified flavonoids were found in higher concentrations in extracts from the fixed bed reactor.



The produced extracts were then microencapsulated by spray drying in order to produce dry powders. This process enables the protection and controlled release of encapsulated components. Maltodextrin (MD) and gum arabic (GA) were used as wall materials. The aim was to find the optimal production conditions of the feed solution and operation of the spray dryer for which maximum efficiency (microencapsulation yield, MEY (%)) and microencapsulation efficiency, MEE (%) of the components to be encapsulated are achieved. Thus, the parameters examined in these experiments were the inlet air temperature (140 and 160 °C), the different ratio of the wall materials MD:GA ((1:0), (4:1) and (2:1)) and the concentration of the active components (5%, 10% and 20% core). The microencapsulation efficiency of RA (MEE $\geq$  92.40 $\pm$ 0.04%) and flavonoids (MEE $\geq$  90.36 $\pm$ 0.04%) was very high in all experiments. For the aqueous extracts higher MEY and MEE of the bioactive components were obtained in the case that the wall material was MD:GA in a ratio of 4:1, the inlet air temperature was 160 °C and the core content 10%. Specifically, RA had MEY=100.00 $\pm$ 4.40% and flavonoids respectively MEY=96.90 $\pm$ 0.01% while the values for MEE were calculated equal to 97.93 $\pm$ 0.13% and 97.41 $\pm$ 0.22%. Acetone extracts and extracts of mixtures of solvents (acetone:water and ethanol:water) contain phenolic diterpenes which are non-polar and at the same time easily oxidized components. Due to the absence of organic solvents in the final feed mixture but also to the high temperature, the microencapsulation of these components by the spray drying method was considered more difficult. The optimal ratio of wall materials was considered MD:GA (4:1) in the case of mixtures. Specifically, the efficiency and microencapsulation efficiency of all bioactive components was higher when the initial extracts were derived from a mixture of ethanol:water. The MEYs for RA, flavonoids and TPD were calculated at 99.09 $\pm$ 1.19%, 95.48 $\pm$ 8.03% and 84.79 $\pm$ 1.32%, respectively. The corresponding values for the MEE were calculated at 97.20 $\pm$ 0.71%, 91.52 $\pm$ 0.86% and 52.59 $\pm$ 0.95%. In powders from acetone extracts the parameter examined was the core content (% core) with a constant temperature of 140 °C and MD:GA carrier ratio (2:1). From the experiments the lowest core content (5% core) was considered optimal and specifically regarding the TPD, MEY was calculated equal to 89.70 $\pm$ 1.00% and MEE=76.35 $\pm$ 0.76%. In addition, the powders were tested for the shelf life of phenolic components over a period of about one or six months. Within 28 days, the powders contained in the aqueous extracts of the experimental scale had not been significantly degraded. On the contrary, in a period of six months (197 days), when the powders prepared experimentally with the larger scale aqueous extract were examined, degradation of flavonoids in particular was observed. Regarding the shelf life of phenolic diterpenes, it is reported that the conversion of carnosic acid to carnosol due to oxidation in powders was evident. In particular, powder with a 5% core content continues to have higher phenolic diterpene encapsulation yields but its degradation is greater than that of a powder with a higher content of core material (10%).

In addition, the shelf life of rosemary bioactive compounds was studied by incorporating their oil solution into emulsions (o/w) which were stored in 15 and 37 °C ovens and analyzed over 21 days. Specifically, the carnosic acid was completely degraded in a period of 15 days at a temperature of 37 °C while at 15 °C there was no complete degradation in the period where the tests were performed. Due to oxidation, carnosic acid is converted to carnosol and other phenolic diterpenes and thus a safer approach to controlling the retention of phenolic diterpenes in emulsions is to measure all derivatives. During the study of the shelf life of the components in the emulsions, the TPD follow a zero order kinetics with a rate of degradation at a temperature of 37 and 15 °C, respectively equal to  $k_{37}=60.774 \text{ days}^{-1}$  and  $k_{15}=36.768 \text{ days}^{-1}$ . Respectively for RA, which follows first order degradation kinetics, the degradation rate at 37 °C was calculated equal to  $k_{37}=0.020 \text{ days}^{-1}$  while at 15 °C equal to  $k_{15}=0.016 \text{ days}^{-1}$ . Flavonoids with the same degree of kinetics follow with degradation rates equal to  $k_{37}=0.017 \text{ days}^{-1}$  and  $k_{15}=0.013 \text{ days}^{-1}$ .



Finally, three different cosmetic creams (w/o) were prepared enriched with the fatty and/or aqueous phase in bioactive components from rosemary extracts in order to control their stability. Specifically, a cream without bioactive compounds was prepared (Blank cream), a cream enriched with phenolic diterpenes (cream 1), one with rosmarinic acid and flavonoids (cream 3) and finally one with all the bioactive compounds of rosemary (cream 2). The creams were subjected to rapid Folin-Ciocalteu and DPPH analyses as well as HPLC analysis to examine their phenolic content. Higher yields in phenolic components were achieved in the cosmetic formulation that had both phases enriched with rosemary extract (cream 2). Specifically, compared to the theoretical concentration values on the basis of which this composition was prepared, the yield in TPD was  $98.51 \pm 2.29\%$ , in RA  $93.59 \pm 0.01\%$  and in total flavonoids  $65.97 \pm 0.00\%$ . This cream also showed higher antioxidant activity through DPPH analysis ( $8.77 \pm 0.32$  g trolox /kg cream) and higher total phenolic content through Folin-Ciocalteu analysis ( $TPC = 2.60 \pm 0.14$  g GAE/kg cream). Regarding the pH, the cream 2 has the best value ( $pH = 6.58 \pm 0.10$ ) concluding that the addition of aqueous rosemary extract and phenolic diterpene oil solution contributes to the quality characteristics of the cosmetics. Finally, the shelf life of the antioxidant activity and total phenols was tested after 51 days from the production of the creams. During this time the total phenolic content decreased in creams 2 and 3 while in cream 1 it remained practically constant as its value was initially  $TPC_0 = 0.76 \pm 0.09$  g GAE/kg cream and changed to  $TPC_{51} = 0.76 \pm 0.05$  g GAE/kg cream. The results regarding the antioxidant activity were similar with a vertical reduction of it in cream 2, since it decreased from  $8.77 \pm 0.32$  g trolox/kg cream to  $4.73 \pm 0.21$  g trolox/kg cream. In contrast, the antioxidant activity of cream 1 was satisfactorily maintained as it decreased from  $2.20 \pm 0.14$  g trolox/kg cream to just  $1.93 \pm 0.03$  g trolox/kg cream. This is justified by the fact that the bioactive components in this composition were incorporated into a medium chain triglyceride oil (MCT) while in the other two compositions they were dispersed resulting in their faster degradation.

**Keywords:** Rosemary, extraction, spray drying, emulsions, creams

## Πίνακας περιεχομένων

<b>Ευρετήριο Εικόνων</b> .....	<b>xii</b>
<b>Ευρετήριο Διαγραμμάτων</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Ευρετήριο Πινάκων</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Το δενδρολίβανο, σύσταση, βιολογική δράση</b> .....	<b>2</b>
Γενικά στοιχεία για το δεντρολίβανο .....	2
Συστατικά δενδρολίβανου .....	3
Φαινολικές ενώσεις.....	3
Βιοδραστικά συστατικά-Βιολογική δράση .....	12
Αντικαρκινική δράση .....	13
Αντιοξειδωτική δράση .....	14
Αντιφλεγμονώδης δράση .....	14
Αντιμικροβιακή δράση .....	15
<b>Κεφάλαιο 2: Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών</b> .....	<b>16</b>
<b>Εκχύλιση</b> .....	<b>16</b>
<b>Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης</b> .....	<b>16</b>
Εκχύλιση Soxhlet .....	16
Διαβροχή (maceration).....	18
Απόσταξη με υδρατμούς (Hydrodistillation) .....	18
<b>Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης</b> .....	<b>19</b>
Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction, UAE).....	19
Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave assisted extraction, MAE).....	21
Εκχύλιση με υπεγκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid extraction, SFE) .....	22
Εκχύλιση με ιοντικά υγρά (Extraction with ionic liquids) .....	24
Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (Pressurized liquid extraction, PLE) .....	25
Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed electric field assisted extraction, PEF assisted extraction).....	25
Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme assisted extraction, EAE) .....	26
<b>Διαλύτες εκχύλισης</b> .....	<b>28</b>
Ενεργειακή κατανάλωση .....	30
<b>Κεφάλαιο 3: Μορφοποίηση βιοδραστικών συστατικών</b> .....	<b>31</b>
<b>Ορισμός Μικροεγκλεισμού</b> .....	<b>31</b>
Επικαλυπτόμενο υλικό ή πυρήνας .....	32
Φορείς εγκλεισμού .....	34
<b>Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)</b> .....	<b>37</b>
Ατομοποίηση .....	38
Επαφή σταγονιδίων με θερμό αέρα .....	40
Ξήρανση των σταγονιδίων .....	40
Διαχωρισμός ξηρού προϊόντος από τον αέρα.....	42
Παράμετροι που επιδρούν στο τελικό ξηρό προϊόν .....	43
Εφαρμογές σε εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά .....	43
<b>Κεφάλαιο 4: Χρήση βιοδραστικών συστατικών δενδρολίβανου σε καλλυντικά</b> ....	<b>48</b>
<b>Γαλακτώματα</b> .....	<b>50</b>
Γαλακτωματοποιητές .....	52
<b>Κεφάλαιο 5: Πειραματικό μέρος</b> .....	<b>55</b>
<b>Σχεδιασμός πειραμάτων</b> .....	<b>55</b>
<b>Πρώτες ύλες, αντιδραστήρια και συσκευές</b> .....	<b>57</b>

Πρώτες ύλες .....	57
Αντιδραστήρια.....	57
<b>Πειραματική διαδικασία και πειραματικές τεχνικές.....</b>	<b>64</b>
Εκχύλιση σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου.....	64
Εκχύλιση με υπερήχους.....	65
Ξήρανση με ψεκασμό.....	65
Ελαιοδιαλύματα και Γαλακτώματα .....	68
Καλλυντικές φόρμουλες.....	69
<b>Αναλυτικές μέθοδοι .....</b>	<b>73</b>
Προσδιορισμός υγρασίας δεντρολίβανου .....	73
Προσδιορισμός ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	73
Ανάλυση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) .....	75
Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH .....	76
Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα .....	78
Προσδιορισμός υγρασίας κόνεων.....	78
Προσδιορισμός απόδοσης και αποτελεσματικότητας μικροεγκλεισμού .....	78
Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας εγκλεισμού .....	79
<b>Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα .....</b>	<b>80</b>
<b>Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών δενδρολίβανου .....</b>	<b>80</b>
Απόδοση εκχυλίσεων σε φαινολικά συστατικά .....	80
Ανάλυση DPPH σε εκχυλίσματα .....	81
Στερεό υπόλειμμα στα εκχυλίσματα και εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	82
Ταυτοποίηση συστατικών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	83
<b>Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών μέσω χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης 93</b>	
Ποσοτικοποίηση φαινολικών διτερπενίων .....	93
Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών .....	95
<b>Ενθυλάκωση εκχυλισμάτων δενδρολίβανου. ....</b>	<b>100</b>
Υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας.....	100
Υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας.....	101
Εκχυλίσματα από μίγματα διαλυτών .....	103
Ακετονικά εκχυλίσματα.....	105
<b>Αναλύσεις διατηρησιμότητας βιοδραστικών συστατικών στις κόνεις.....</b>	<b>106</b>
Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας .....	106
Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας .....	109
Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνεων από ακετονικά εκχυλίσματα .....	113
<b>Καλλυντικές συνθέσεις εμπλουτισμένες με εκχυλίσματα δεντρολίβανου .....</b>	<b>119</b>
Μελέτη διατηρησιμότητας φαινολικών ενώσεων σε γαλακτώματα .....	119
Καλλυντικές κρέμες.....	128
<b>Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα .....</b>	<b>136</b>
<b>Βιβλιογραφικές αναφορές.....</b>	<b>141</b>
<b>Συνοπτομογραφίες .....</b>	<b>151</b>
<b>Παράρτημα .....</b>	<b>152</b>

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. Άνθη του φυτού <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	2
Εικόνα 2. Δομή Ροσμαρινικού οξέος .....	5
Εικόνα 3. Γενική μορφή φλαβονοειδών [Balasundram et al., 2006] .....	5
Εικόνα 4. Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών [τροποποίηση από Routray & Orsat, 2011].....	6
Εικόνα 5. Φάσματα UV-Vis κυριότερων φλαβονοειδών του δεντρολίβανου και οι αντίστοιχες δομές τους [Τσιμογιάννης, 2008].....	7
Εικόνα 6. Φαινολικά διτερπένια στα φύλλα του δεντρολίβανου : II ισοροσμανόλη, III ροσμανόλη, IV καρνοσόλη, V 11-12-δι-ο-μεθυλοροσμανόλη, VI καρνοσικό οξύ, VII 12-ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ [Munné-Bosch et al., 2000] .....	9
Εικόνα 7. Χημική δομή καρνοσικού οξέος.....	9
Εικόνα 8. Σχηματισμός διτερπενίων :ροσμανόλη, ισοροσμανόλη, διμέθυλ-ισοροσμανόλη από καρνοσικό οξύ με ενζυμική αφυδρογόνωση [Munné-Bosch et al., 1999].....	10
Εικόνα 9. Χημική δομή καρνοσόλης .....	10
Εικόνα 10. Ποσοστιαία Αναλογία μελετών (%) στις μελετώμενες βιολογικές δραστηριότητες του <i>R. officinalis</i> σύμφωνα με την βιβλιογραφία [Andrade et al., 2018].....	13
Εικόνα 11. Διάταξη Εκχύλισης Soxhlet .....	16
Εικόνα 12. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO <sub>2</sub> και κλασμάτωση εκχυλισμάτων.....	23
Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση μιας μικροκάψουλας.....	31
Εικόνα 14. Ταξινόμηση μικροκαψουλών: Μονοπύρηνες, πολυπύρηνες, ακανόνιστου σχήματος, πολλαπλών τοιχωμάτων, εγκλεισμός μήτρας [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015] .....	33
Εικόνα 15. Συνήθη ενεργά συστατικά σε μικροκάψουλες [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015].....	33
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση ενός ξηραντήρα με ψεκασμό [τροποποίηση από Fraunhofer-Gesellschaft ,2017] .....	38
Εικόνα 17. Παραγόμενη Σκόνη με ξήρανση με ψεκασμό: (α) με περιστροφικό εκνεφωτή (β) με ακροφύσιο πίεσης υπό συγκρίσιμες λειτουργικές συνθήκες .....	39
Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση εκνεφωτών: (Α) περιστροφικός εκνεφωτής, (Β): ακροφύσιο πίεσης, (C): Πνευματική βαλβίδα [Santos et al., 2017].....	40
Εικόνα 19. Εκτίμηση θερμοκρασίας σταγονιδίων κατά την ξήρανση με ψεκασμό .....	41
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των μορφολογικών αλλαγών που υφίστανται τα σταγονίδια κατά την ξήρανση με ψεκασμό .....	41
Εικόνα 21. Τυπικοί συλλέκτες που χρησιμοποιούνται για την ξήρανση με ψεκασμό: (Α) Κυκλώνας, (Β) σακκόφιλτρα, (Γ) Ηλεκτροστατικός κατακρημιστής, (D) Πλυντρίδα Venturi.....	42
Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας .....	46
Εικόνα 23. Σύσταση ημιστερεών σκευασμάτων με εκχύλισμα <i>Melissa Officinalis</i> L. [Stelmakienė et al., 2015].....	49
Εικόνα 24. Διείσδυση ροσμαρινικού οξέος μέσω ημιστερεών σκευασμάτων στην επιδερμίδα και το χόριο .....	49
Εικόνα 25. Τύποι γαλακτώματος .....	50
Εικόνα 26. Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων .....	59
Εικόνα 27. Αναδευτήρας τύπου Vortex.....	59
Εικόνα 28. Σύστημα εκχύλισης με ανοξείδωτο εκχυλιστήρα και αντλία Millipore ογκομετρικό κύλινδρο συλλογής εκχυλίσματος (δεξιά) και το ποτήρι ζέσεως με διαλύτη (αριστερά) .....	60
Εικόνα 29. Διάταξη για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους .....	60
Εικόνα 30. Φωτόμετρο Hitachi U29000 .....	61
Εικόνα 31. Διάταξη περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotary evaporator).....	61
Εικόνα 32. Διάταξη ξήρανσης με ψεκασμό .....	62
Εικόνα 33. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	62
Εικόνα 34. Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας .....	63
Εικόνα 35. Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης .....	63
Εικόνα 36. Διάταξη υπέρηχων Probe .....	64
Εικόνα 37. Πεχάμετρο .....	64
Εικόνα 38. Ελαιοδιάλυμα .....	68
Εικόνα 39. Γαλακτώμα μετά από ταχεία δοκιμή σταθερότητας μέσω φυγοκέντρησης .....	68
Εικόνα 40. Γαλακτώματα πριν την εισαγωγή τους σε κλιβάνους .....	69

Εικόνα 41. Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e <sup>-</sup> .....	73
Εικόνα 42. Δείγματα πριν και μετά την επώαση κατά την δοκιμή Folin-Ciocalteu .....	75
Εικόνα 43. Δομή της ελεύθερης ρίζας DPPH .....	76
Εικόνα 44. Η αρχή της ικανότητας δέσμευσης των ριζών DPPH .....	77
Εικόνα 45. Χρωματογραφήματα α) εκχυλίσματος ακετόνης:νερού (100:0) b) ακετόνης:νερού (0:100) c) ακετόνης:νερού (80:20).....	84
Εικόνα 46. Φάσμα υπεριώδους της σκουτελαρεΐνης (Scutellarein).....	85
Εικόνα 47. Φάσμα υπεριώδους ένωσης α.....	85
Εικόνα 48. Φάσμα υπεριώδους της λαδανειΐνης α) από βιβλιογραφία [Martin-Benlloch et al., 2018] β) προκύπτουν από χρωματογραφική ανάλυση .....	86
Εικόνα 49. Φάσματα σαλβιγενίνης α) από βιβλιογραφία [Moradkhani et al., 2012] β) από την χρωματογραφική ανάλυση .....	86
Εικόνα 50. Φάσμα γενκβανίνης (ένωση c) από την χρωματογραφική ανάλυση .....	87
Εικόνα 51. Φάσμα 4-μεθοξυτεκτοχρυσίνης (ένωση e) από την χρωματογραφική ανάλυση.....	87
Εικόνα 52. Φάσμα φλαβονοειδούς (ένωση 1) .....	88
Εικόνα 53. Φάσμα φλαβονοειδούς (ένωση 2) .....	88
Εικόνα 54. Φάσμα υπεριώδους ένωσης f .....	89
Εικόνα 55. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δεντρολίβανου [Cuvelier et al., 1996].....	89
Εικόνα 56. Απεικόνιση φάσματος UV του σαλβιανολικού οξέος A ( $\lambda_{max}$ 286nm) .....	90
Εικόνα 57. Φάσμα ένωσης x από δείγμα freeze dried .....	90
Εικόνα 58. Φάσμα καφεϊκού οξέος α) από βιβλιογραφία [Τσιμογιάννης, 2008] και β) προκύπτουν από χρωματογραφική ανάλυση .....	90
Εικόνα 59. Φάσματα υπεριώδους καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος από την χρωματογραφική ανάλυση .....	91
Εικόνα 60. Φάσμα υπεριώδους καρνοσικού μεθυλεστέρα α) από βιβλιογραφία [Zabot et al., 2014] και β) προκύπτουν από χρωματογραφική ανάλυση .....	91
Εικόνα 61. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος μεγαλύτερης κλίμακας που έχει υποστεί ξήρανση με κατάψυξη .....	100
Εικόνα 62. Οπτικός έλεγχος σταθερότητας γαλακτώματος σε θερμοκρασία T=15°C α) t=0, b) t=6 days, c) t=10 days, d) t=13 days.....	120
Εικόνα 63. Κρέμα : blank, 1,2 και 3 (από αριστερά προς τα δεξιά) .....	129
Εικόνα 64. Κλίμακα pH όσον αφορά τον τύπο του κάθε δέρματος .....	130
Εικόνα 65. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Flan).....	152
Εικόνα 66. Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Flan).....	152
Εικόνα 67. Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Carnosic) .....	153
Εικόνα 68. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Carnosic) .....	153
Εικόνα 69. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Flan).....	154
Εικόνα 70. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Flan).....	154
Εικόνα 71. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Carnosic).....	155
Εικόνα 72. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Αιθανόλης:νερού (60:40) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Carnosic).....	155
Εικόνα 73. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Αιθανόλης:νερού (60:40) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Flan).....	156

## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής διαδικασίας παραγωγής μίγματος ή γαλακτώματος τροφοδοσίας προς ξήρανση με ψεκασμό .....	67
Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ροής παρασκευής γαλακτώματος .....	69
Διάγραμμα 3. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή των κρεμών Blank και 3 .....	71
Διάγραμμα 4. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή των κρεμών 1 και 2 .....	72
Διάγραμμα 5. Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu.....	75
Διάγραμμα 6. Καμπύλη αναφοράς DPPH.....	78
Διάγραμμα 7. Συγκέντρωση ολικών φαινολών σε g/ kg ξηρού φυτού με βάση τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε εκχυλίσματα παραλαμβανόμενα με διαφορετικούς διαλύτες και μέθοδο εκχύλισης .....	81
Διάγραμμα 8. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg ξηρού φυτού) σε εκχυλίσματα παραλαμβανόμενα με διαφορετικούς διαλύτες και μέθοδο εκχύλισης.....	82
Διάγραμμα 9. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. * .....	107
Διάγραμμα 10. Διατηρησιμότητα φλαβονοειδών σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας.....	108
Διάγραμμα 11. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. * .....	109
Διάγραμμα 12. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φλαβονοειδών σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. * .....	109
Διάγραμμα 13. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. * .....	111
Διάγραμμα 14. Διατηρησιμότητα φλαβονοειδών σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. ....	111
Διάγραμμα 15. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. * .....	112
Διάγραμμα 16. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φλαβονοειδών σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. * .....	113
Διάγραμμα 17. Διατηρησιμότητα καρνοσικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	114
Διάγραμμα 18. Διατηρησιμότητα καρνοσόλης σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	115
Διάγραμμα 19. Διατηρησιμότητα λοιπών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	115
Διάγραμμα 20. Διατηρησιμότητα ολικών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	116
Διάγραμμα 21. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού καρνοσικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας. * .....	116
Διάγραμμα 22. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού καρνοσόλης σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	117



Διάγραμμα 23. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού λοιπών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνειες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	117
Διάγραμμα 24. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ολικών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνειες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.....	118
Διάγραμμα 25. Διατηρησιμότητα φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 20 ημερών στους 37°C.....	123
Διάγραμμα 26. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε διάστημα 21 ημερών στους 37°C.....	124
Διάγραμμα 27. Διατηρησιμότητα φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 20 ημερών στους 15°C.....	124
Διάγραμμα 28. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε διάστημα 21 ημερών στους 15°C.....	125
Διάγραμμα 29. Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 20 ημερών....	125
Διάγραμμα 30. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 20 ημερών.....	126
Διάγραμμα 31. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 21 ημερών	127
Διάγραμμα 32. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 21 ημερών.....	127
Διάγραμμα 33. Διατηρησιμότητα φαινολικών συστατικών σε διάστημα 51 ημερών.....	134
Διάγραμμα 34. Έλεγχος διατηρησιμότητας αντιοξειδωτικής δράσης σε διάστημα 51 ημερών.....	135
Διάγραμμα 35. Διατηρησιμότητα καρνοσικού οξέος στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 1ης τάξης).....	158
Διάγραμμα 36. Διατηρησιμότητα ολικών φαινολικών διτερπενίων στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 1ης τάξης).....	158
Διάγραμμα 37. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 0ης τάξης).....	159
Διάγραμμα 38. Διατηρησιμότητα ολικών φλαβονοειδών στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 0ης τάξης).....	159



## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1.Επιστημονική ταξινόμηση του <i>Rosmarinus officinalis</i> L. [Begum et al., 2013].....	2
Πίνακας 2. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων [Balasundram et al., 2006] .....	4
Πίνακας 3. Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών του δεντρολίβανου .....	11
Πίνακας 4. Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών με διαφορετικούς διαλύτες [Azmir et. al., 2013].....	28
Πίνακας 5. Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος (RA), καρνοσικού οξέος (CA) καρνοσόλης (COH) και περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες σε διαφορετικά εκχυλίσματα [Moreno et al., 2006] .....	29
Πίνακας 6. Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος (RA), καρνοσόλης (COH) και καρνοσικού οξέος (CA) σε εκχυλίσματα από φύλλα, άνθη και κλαδιά δεντρολίβανου με χρωματογραφία HPLC [Moreno et al., 2006].....	29
Πίνακας 7. Μέθοδοι μικροεγκλεισμού : Μέγεθος μικροσωματιδίων, Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί [Carvalho et al., 2016] .....	31
Πίνακας 8. Φορείς μικροεγκλεισμού ανάλογα την προέλευση και το είδος των μακρομορίων [Wandrey et al., 2009; Khanvilkar et al., 2016].....	35
Πίνακας 9. Ταξινόμηση κρεμών και τα χαρακτηριστικά τους [Sharma et al., 2018].....	51
Πίνακας 10. Παράμετροι προς εξέταση στα πειράματα ξήρανσης με ψεκασμό .....	56
Πίνακας 11. Αντιδραστήρια.....	58
Πίνακας 12. Σύσταση κρεμών .....	70
Πίνακας 13. Βιοδραστικά συστατικά κάθε παρασκευασθείσας καλλυντικής σύνθεσης .....	70
Πίνακας 14. Δεδομένα για Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu .....	74
Πίνακας 15. Ποσοτικοποίηση ολικών φαινολών μέσω Folin-Ciocalteu, σε εκχυλίσματα που ελήφθησαν με διάφορες μεθόδους .....	80
Πίνακας 16. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg) για κάθε τύπο εκχυλίσματος .....	81
Πίνακας 17. Εκλεκτικότητα εκχύλισης.....	83
Πίνακας 18. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις δεντρολίβανου και αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης με βάση την μέθοδο “Flan” .....	92
Πίνακας 19. Συγκεντρώσεις φαινολικών διτερπενίων σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος.....	93
Πίνακας 20. Συγκεντρώσεις φαινολικών διτερπενίων εκφρασμένες ως g καρνοσικού οξέος /kg ξηρού φυτού ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος.....	94
Πίνακας 21. Εκλεκτικότητα εκχυλίσεων σε φαινολικά διτερπένια .....	95
Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος .....	95
Πίνακας 23. Συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε g/kg ξηρού φυτού ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος .....	96
Πίνακας 24. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου .....	96
Πίνακας 25. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα νερού σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου .....	97
Πίνακας 26. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης:νερού 80:20 σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου .....	97
Πίνακας 27. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης:νερού 80:20 σε υπερήχους .....	98
Πίνακας 28. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα αιθανόλης:νερού 60:40 σε υπερήχους .....	98
Πίνακας 29. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού φαινολικών συστατικών από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας με φορέα εγκλεισμού μαλτοδεξτρίνη (MD) και αραβικό κόμμι (GA) σε διάφορες αναλογίες, διαφορετική περιεκτικότητα στερεών του εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας (core %), με σταθερή θερμοκρασία αέρα εισόδου 160°C και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%. .....	101
Πίνακας 30. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού βιοδραστικών συστατικών υδατικών εκχυλισμάτων πειραματικής κλίμακας με φορέα εγκλεισμού MD και GA σε διάφορες αναλογίες, διαφορετική θερμοκρασία αέρα εισόδου, σταθερή περιεκτικότητα core 10% και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%.....	102

Πίνακας 31. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού εκχυλισμάτων από μίγματα διαλυτών με φορέα εγκλεισμού MD και GA σε διάφορες αναλογίες, σταθερή θερμοκρασία αέρα εισόδου ίση με 140°C, διαφορετική περιεκτικότητα core και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%.	104
Πίνακας 32. Απόδοση και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού κόνεων από ακετονικά εκχυλίσματα με σταθερή αναλογία φορέα εγκλεισμού MD:GA 2:1, σταθερή θερμοκρασία εισόδου 140°C, διαφορετική περιεκτικότητα ελαιοδιαλύματος (core%) στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας και συνολική περιεκτικότητα στερεών ίση με 30%.	105
Πίνακας 33. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνεις από υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας σε διάστημα 197 ημερών.	107
Πίνακας 34. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή.	110
Πίνακας 35. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή.	113
Πίνακας 36. Θερμητική συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων στο ελαιοδιάλυμα.	120
Πίνακας 37. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων, ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 37°C.	121
Πίνακας 38. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών (ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή) στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων, ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 37°C.	121
Πίνακας 39. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 15°C.	122
Πίνακας 40. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών (ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή) στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 15°C.	122
Πίνακας 41. Ρυθμός υποβάθμισης συστατικών με βάση την θερμοκρασία αποθήκευσης.	128
Πίνακας 42. Ποιοτικά χαρακτηριστικά κρεμών (κρέμα Blank: χωρίς βιοδραστικά συστατικά, κρέμα 1: εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια, κρέμα 3: εμπλουτισμένη με ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή και κρέμα 2: εμπλουτισμένη με το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου).	129
Πίνακας 43. Τιμή pH κάθε είδους κρέμας.	130
Πίνακας 44. Ανάλυση κρέμας 1 μετά την παρασκευή.	131
Πίνακας 45. Ανάλυση κρέμας 2 μετά την παρασκευή.	131
Πίνακας 46. Ανάλυση κρέμας 3 μετά την παρασκευή.	132
Πίνακας 47. Απόδοση σε φαινολικά συστατικά για κάθε τύπο κρέμας.	132
Πίνακας 48. Απόκριση Folin-Ciocalteu και ποσοτικοποίηση πραγματικής συγκέντρωσης ολικών φαινολών από εκχυλίσματα δεντρολίβανου για τις κρέμες (t=0).	133
Πίνακας 49. Ποσοτικοποίηση ολικών φαινολών από εκχυλίσματα δεντρολίβανου μέσω Folin-Ciocalteu (t=0 και t=51days).	133
Πίνακας 50. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg κρέμας) για κάθε τύπο κρέμας (t=0 και 51 days).	134
Πίνακας 51. Απόδοση εγκλεισμού κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας σε διάστημα 197 ημερών από την παρασκευή.	156
Πίνακας 52. Απόδοση εγκλεισμού κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή.	157
Πίνακας 53. Απόδοση εγκλεισμού ακετονικών εκχυλισμάτων μετά από διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή.	157



## Εισαγωγή

Τα φυτά και τα βότανα αποτελούν φυσικές πηγές βιοδραστικών συστατικών και έχουν ποικίλες ευεργετικές δράσεις για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι βιομηχανίες καλλυντικών κατακλύζονται από προϊόντα που αποτελούνται ως επί το πλείστον από συνθετικές πρώτες ύλες, οι οποίες συχνά ενοχοποιούνται για πλήθος προβλημάτων στους ανθρώπους αλλά και στο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες να στρέψει το ενδιαφέρον της στην χρήση περισσότερων φυτικών συστατικών στα προϊόντα καθημερινής περιποίησης. Το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.) είναι από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βότανα στις καλλυντικές συνθέσεις. Ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) και τα σημαντικότερα εκ των βιοδραστικών συστατικών του είναι το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη, το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή. Αναφέρεται ότι λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης το εκχύλισμα δεντρολίβανου ανήκει στα εγκεκριμένα συντηρητικά (E392) που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα. Άλλες δράσεις που θεωρείται ότι έχει το συγκεκριμένο φυτό είναι η αντιμικροβιακή, η αντικαρκινική και η αντιφλεγμονώδης. Ως αποτέλεσμα, το δεντρολίβανο αποτελεί ένα φυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Ειδικότερα στις βιομηχανίες καλλυντικών χρησιμοποιούνται και τα εκχυλίσματα αυτού αλλά και το αιθέριο έλαιο του.

Με βάση τα προαναφερθέντα, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάκτηση των βιοενεργών συστατικών του δεντρολίβανου μέσω εκχύλισης, η διαπίστωση της παρουσίας φαινολικών ενώσεων, η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης και η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση αυτών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Συγκεκριμένα, διερευνώνται διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, όπως η εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, με σκοπό την επίτευξη της ανάκτησης, όσο το δυνατόν, περισσότερων βιοενεργών ενώσεων. Μάλιστα, ελέγχεται και μια επιπλέον παράμετρος και συγκεκριμένα η επιλογή του διαλύτη, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση αυτής στη σύσταση των εκχυλισμάτων.

Σε δεύτερο στάδιο, τα προκύπτοντα εκχυλίσματα υποβάλλονται σε ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) για την μετατροπή τους σε κόνεις οι οποίες διαχειρίζονται πιο εύκολα και προτιμώνται ως πρώτες ύλες σε μια βιομηχανία καλλυντικών. Συγκεκριμένα ελέγχεται η απόδοση και η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των φαινολικών ενώσεων αλλά και η διατηρησιμότητα αυτών με τον χρόνο. Ακόμη, ακετονικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου ενσωματώνονται σε λιπαρό φορέα και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτωμάτων (o/w) που επίσης δύναται να αποτελέσουν συστατικά καλλυντικών συνθέσεων. Στα γαλακτώματα ελέγχεται η σταθερότητα και η διατηρησιμότητα των συστατικών με τον χρόνο. Τέλος, παρασκευάζονται καλλυντικές κρέμες (w/o) που περιέχουν υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου ή/και συστατικά του ακετονικού εκχυλίσματος που έχουν ενσωματωθεί σε ελαιώδη φορέα. Οι κρέμες υποβάλλονται σε αναλύσεις για τον προσδιορισμό του φαινολικού τους περιεχομένου και τη διατηρησιμότητα αυτού.

# Κεφάλαιο 1: Το δεντρολίβανο, σύσταση, βιολογική δράση

## Γενικά στοιχεία για το δεντρολίβανο

Το δεντρολίβανο ή ροζμαρί (*Rosmarinus officinalis* L.) είναι αρωματικό φυτό της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae) και έχει προέλευση από τις παραμεσόγειες χώρες. Η ονομασία του στην λατινική γλώσσα ήταν *rosmarinus* και θεωρείται από πολλούς ότι αυτή προέρχεται από τις λέξεις “ros” (δρόσος) και “marinus” (ανήκει στη θάλασσα). Γεγονός είναι ότι το δεντρολίβανο αναπτύσσεται σε χαμηλά υψόμετρα, άρα και κοντά στη θάλασσα, όπου φτάνουν οι ψιχάλες από το κύμα της και αυτό προσφέρει μια εξήγηση για την ονομασία του. Υπάρχει και η ελληνική εκδοχή της προέλευσης του ονόματος, όπου αυτό προέρχεται από τις λέξεις «ρωψ» (θάμνος) και «μύρον». Στην Ελλάδα η κοινή ονομασία δεντρολίβανο είναι χαρακτηριστική λόγω των δύο συνδετικών της «λιβάνι» και «δέντρο» [Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2010].



Εικόνα 1. Άνθη του φυτού *Rosmarinus officinalis* L.

Το δεντρολίβανο είναι ένας πολυετής αειθαλής, πράσινος θάμνος με ξυλώδη κορμό που μπορεί να φτάσει σε ύψος το 1.5 έως και τα 2 m. Τα φύλλα του είναι άκαμπτα, ευθύγραμμα, βελονοειδή και έχουν σκούρα πράσινη χρώση. Τα άνθη του είναι μικρά, χρώματος θαλασσοιώδους ή πιο σπάνια ροζ, εμφανίζονται πρόωρα στο τέλος του χειμώνα και η άνθιση τους διαρκεί όλο το καλοκαίρι [Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2010].

Στον πίνακα 1 γίνεται η επιστημονική ταξινόμηση του φυτού σύμφωνα με τους Begum et al. (2013).

Πίνακας 1. Επιστημονική ταξινόμηση του *Rosmarinus officinalis* L. [Begum et al., 2013]

<b>Βασίλειο</b>	Plantae
<b>Υπό βασίλειο</b>	Tracheobionta
<b>Τμήμα</b>	Spermatophyte
<b>Διαίρεση</b>	Magnoliophyte
<b>Τάξη</b>	Magnoliopsida
<b>Υποκατηγορία</b>	Asteridae
<b>Σειρά</b>	Lamiales
<b>Οικογένεια</b>	Lamiaceae
<b>Γένος</b>	<i>Rosmarinus</i> L.
<b>Είδος</b>	<i>Officinalis</i>
<b>Ονομασία</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

## Συστατικά δεντρολίβανου

Τα κυριότερα χημικά συστατικά του δεντρολίβανου είναι τα ακόλουθα:

- Αρωματικά συστατικά του αιθέριου ελαίου
- Φαινολικά οξέα: Καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ
- Φλαβονοειδή: παράγωγα της φλαβόνης (λουτεολίνη, απιγενίνη, διοσμετίνη)
- Τερπενικά συστατικά:
  - Μονοτερπένια (πινένια, βερμπενόνη, 1,8 κινεόλη, τερπινεόλη)
  - Διτερπένια-διτερπενικές λακτόνες και κινόνες (καρνοσόλη, ροσμανόλη, ροσμαδιάλη, καρνοσικό οξύ)
  - Τριτερπένια (ουρσολικό οξύ)
- Οργανικά οξέα
- Άλλα συστατικά (τανίνες, κόμμεα, υδρογονάνθρακες).

Το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου είναι ένα λεπτόρευστο, διαυγές υγρό του οποίου το χρώμα μεταβάλλεται ανάλογα την προέλευση του και μπορεί να είναι από άχρωμο έως κιτρινωπό ή πρασινοκίτρινο. Τα κύρια συστατικά του είναι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες (α-πινένιο, β-πινένιο, καμφένιο, μυρκένιο, α- και γ-τερπινένιο, λιμονένιο κ.ά.), μονοτερπενικές αλκοόλες (λιναλοόλη, βορνεόλη, τερπινεν-4-όλη), εστέρες (οξικός βορνυλ-εστέρας, οξικός φενχυλ-εστέρας), οξείδια (1,8 κινεόλη), κετόνες (καμφορά, βερμπενόνη, καρβόνη κ.ά.) και σεσκιτερπένια (β-καρνοφυλλένιο). Η χαρακτηριστική μυρωδιά του οφείλεται κυρίως στην βορνεόλη, τον οξικό βορνυλ-εστέρα και τη βερμπενόνη, συστατικά που είναι ιδιαίτερα επιθυμητά στην βιομηχανία της Αρωματοποιίας.

Οι πιο ενδιαφέροντες χημειότυποι του δεντρολίβανου, διακρίνονται με βάση τη σύσταση του αιθέριου ελαίου, και είναι τρεις. Ο χημειότυπος της 1,8 κινεόλης, δηλαδή αιθέριο έλαιο με υψηλή περιεκτικότητα σε 1,8 κινεόλη, της καμφοράς με ποσοστιαία περιεκτικότητα σε αυτή >20% και τέλος της βερμπενόνης με ποσοστιαία περιεκτικότητα >15% σε βερμπενόνη. Ανάλογα τον χημειότυπο το αιθέριο έλαιο παρουσιάζει διαφορετικές ευεργετικές ιδιότητες. Για παράδειγμα το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου, του οποίου η καμφορώδης οσμή είναι έντονη, αποτελεί συστατικό κρεμών κατά των μυϊκών πόνων και των ρευματισμών και είναι επίσης γνωστό για τις αποχρεμπτικές του ιδιότητες. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο αξιοποιείται στην παραγωγή καλλυντικών (κρέμες, λοσιόν κ.ά.), προϊόντων για την προσωπική υγιεινή (σαπούνια, σαμπουάν) και σε αρώματα όπως η φημισμένη κολόνια «Eau de la Reine de Hongrie» αλλά και τα περισσότερα αρώματα της κατηγορίας «Eau de Cologne» των διάφορων οίκων αρωματοποιίας [Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2010].

Επιπλέον, κάποια από τα συστατικά που είναι παρόντα στο αιθέριο έλαιο όπως η 1,8 κινεόλη, η καμφορά, το α-πινένιο και η βορνεόλη, σχετίζονται με μερικές βιοδραστικές ιδιότητες κυρίως αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές, οι οποίες αναλύονται σε επόμενα υποκεφάλαια [Sánchez-Camargo et al., 2017].

## Φαινολικές ενώσεις

Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο, με έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου, και κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως πολύ πολυμερισμένες ενώσεις. Παρά τη δομική ποικιλομορφία, η ομάδα των ενώσεων αυτών αναφέρεται συχνά ως πολυφαινόλες. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων [Balasundram et al., 2006].

Πίνακας 2. Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων [Balasundram et al., 2006]

Κατηγορία	Χημική Δομή
Απλές φαινόλες, βενζοκινόνες	$C_6$
Υδροξυβενζοϊκά οξέα	$C_6 - C_1$
Ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα	$C_6 - C_2$
Υδροξυκινναμωμικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή (π.χ. κουμαρίνες, χρωμόνες)	$C_6 - C_3$
Ναφθοκινόνες	$C_6 - C_4$
Ξανθόνες	$C_6 - C_1 - C_6$
Στιλβένια, ανθρακινόνες	$C_6 - C_2 - C_6$
Φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή	$C_6 - C_3 - C_6$
Λιγνάνες, νεολιγνάνες	$(C_6 - C_3)_2$
Διφλαβονοειδή	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Λιγνίνες	$(C_6 - C_3)_n$
Συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανίνες ή φλαβολάνες)	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Οι πολυφαινόλες είναι αντιοξειδωτικές χημικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά και στα φυτικά τρόφιμα και είναι κυρίως υπεύθυνες για τον χρωματισμό των φρούτων. Αυτού του είδους οι φυτοχημικές ουσίες προστατεύουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι μικροβιακές εισβολές και μπορούν να ταξινομηθούν και σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή [Doughari, 2012].

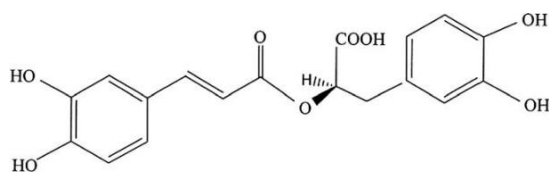
Αναφέρεται ότι οι κύριες φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι τανίνες [Balasundram et al., 2006]. Συγκεκριμένα στο δεντρολίβανο οι πιο συχνά απαντώμενες πολυφαινόλες είναι τα φλαβονοειδή: απιγενίνη, διοσμίνη και λουτεολίνη και τα φαινολικά οξέα: ροσμαρινικό οξύ, χλωρογενικό και καφεϊκό οξύ, τα οποία βρίσκονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 3% στο φυτό [Wagstaff et al., 1998; Al-Sereiti et al., 1999].

#### Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από δύο υποομάδες: τα υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμωμικά οξέα. Σημαντικά φαινολικά οξέα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία είναι το βανιλικό οξύ (vanillic acid) και το συριγγικό οξύ (syringic acid). Στην δεύτερη κατηγορία ανήκει αντίστοιχα το φερουλικό οξύ καθώς και το καφεϊκό οξύ, του οποίου παράγωγο είναι το ροσμαρινικό οξύ, το κύριο φαινολικό οξύ του δεντρολίβανου [Balasundram et al., 2006]. Σε έρευνα των Borrás-Linares et al. (2014) εκτός από ροσμαρινικό οξύ ανιχνεύτηκε σε φύλλα δεντρολίβανου και ο 3-O-γλυκοζίτης του ροσμαρινικού οξέος (Rosmarinic acid-3-O-glucoside).



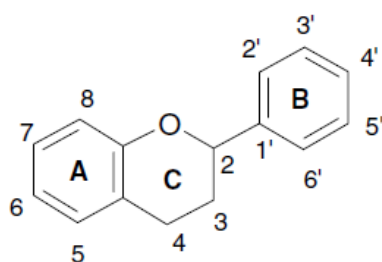
## Ροσμαρινικό οξύ



Εικόνα 2. Δομή Ροσμαρινικού οξέος

Το ροσμαρινικό οξύ (rosmarinic acid - RA) απαντάται συνήθως σε σημαντικές ποσότητες στην οικογένεια Lamiaceae. Τα πιο σημαντικά είδη αυτής είναι η ρίγανη (*Origanum vulgare*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), τα οποία απαντώνται στην διατροφή αλλά έχουν και φαρμακευτικές και καλλυντικές εφαρμογές. Το RA έχει χημικό τύπο  $C_{18}H_{16}O_8$  και είναι ένας εστέρας του καφεϊκού οξέος [Shetty, 2006]. Από το 1961 θεωρούνταν ότι συμβάλλει στην δράση του δεντρολίβανου [Herrmann, 1961].

## Φλαβονοειδή



Εικόνα 3. Γενική μορφή φλαβονοειδών [Balasundram et al., 2006]

Κύριες πηγές φλαβονοειδών είναι τα φυτά, καθώς αυτά αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες τους [Routray & Orsat, 2011]. Για την ακρίβεια, τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φαινολικών ουσιών στα φυτά. Όλα τα φλαβονοειδή περιέχουν στο βασικό μόριο τους δεκαπέντε άτομα άνθρακα, τα οποία είναι διατεταγμένα με την μορφή ( $C_6-C_3-C_6$ ). Ουσιαστικά σχηματίζουν δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B δακτύλιοι στην Εικόνα 3) οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μία γέφυρα από τρία άτομα άνθρακα, η οποία μπορεί είτε να σχηματίζει είτε όχι ένα τρίτο δακτύλιο (C δακτύλιος στην Εικόνα 3). Παραλλαγές στην υποκατάσταση στον δακτύλιο C οδηγούν στις κύριες κατηγοριοποιήσεις των φλαβονοειδών. [Balasundram et al., 2006]. Τα Φλαβονοειδή, είναι μια μεγάλη κατηγορία αντιοξειδωτικών ουσιών που κατατάσσονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, κατεχίνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανίνες, ανθοκυανιδίνες, προανθοκυανιδίνες και χαλκόνες. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η χημική δομή των υποκατηγοριών των φλαβονοειδών [Routray & Orsat, 2011].

Τάξεις Φλαβονοειδών	Βασική Χημική Δομή
Φλαβονόλες	
Φλαβόνες	
Κατεχίνες	
Ισοφλαβόνες	
Φλαβανόνες	
Ανθοκυανίνες	
Προανθοκυανιδίνες	
Ανθοκυανιδίνες	
Χαλκόνες	

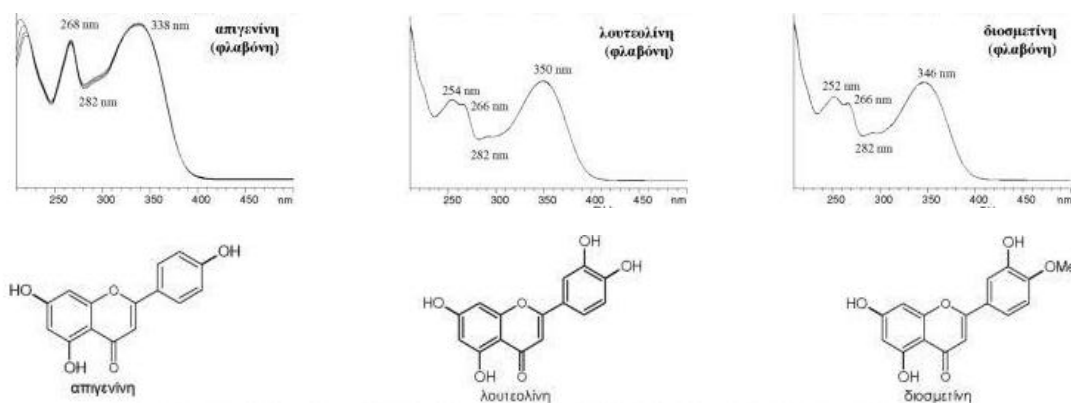
Εικόνα 4. Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών [τροποποίηση από Routray & Orsat, 2011]

Αυτή η δομική τους διαφοροποίηση οφείλεται εν μέρει στο βαθμό και στο μοντέλο υδροξυλίωσης, μεθοξυλίωσης, πρενυλίωσης ή γλυκοζυλίωσης. Έτσι τα φλαβονοειδή στα φυτά απαντώνται είτε με τη μορφή άγλυκου είτε με τη μορφή γλυκοζιτών (π.χ. 7-O-β-γλυκοζίτης της λουτεολίνης). Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι οι πιο συχνά απαντώμενες από τις κατηγορίες των φλαβονοειδών [Balasundram et al., 2006].

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται απαραίτητα συστατικά της διατροφής, αλλά επίσης υπάρχουν και σε πολλά φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα. Η ευρεία χρήση τους αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητές τους σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να ρυθμίζουν την λειτουργία πολλών ενζύμων [Ranche et al., 2016]. Ακόμη, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή εμφανίζουν βιολογικές δράσεις, όπως αντιαλλεργικές, αντικές και αγγειοδιασταλτικές [Pieta, 2000]. Επίσης είναι

γνωστό ότι είναι ευεργετικές ουσίες για πολλές χρόνιες ασθένειες όπως οι καρδιαγγειακές διαταραχές [Routray & Orsat, 2011]. Η σημαντικότερη όμως από τις δράσεις των φλαβονοειδών είναι η αντιοξειδωτική. Τα φλαβονοειδή μειώνουν σημαντικά τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες φλαβονοειδών. Με αυτόν τον τρόπο αποτρέπουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, μια από τις σημαντικότερες δράσεις των ελευθέρων ριζών [Pieta, 2000]. Αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης έχει παρατηρηθεί στις ακόλουθες περιπτώσεις: α) παρουσία υδροξυλομάδων στις θέσεις 3',4' και 5' του Β-δακτυλίου β) παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ του C-2 και C-3 στο δακτύλιο C και γ) υποκατάσταση των υδροξυλομάδων στο δακτύλιο Β από μεθοξυ-ομάδες [Balasundram et al., 2006]. Ωστόσο κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων επεξεργασίας (π.χ. εκχύλιση), αξιοσημείωτες ποσότητες φλαβονοειδών χάνονται [Routray & Orsat, 2011].

Όσον αφορά την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών, η φασματοσκοπία UV-Vis αποτελεί την παλαιότερη μέθοδο. Τα φάσματα των φλαβονοειδών εμφανίζουν δύο ζώνες απορρόφησης I και II. Η ζώνη I βρίσκεται στην περιοχή των 300-370 nm και οφείλεται στην δομή των δακτυλίων Β και C ενώ η ζώνη II βρίσκεται στην περιοχή των 250-300 nm και οφείλεται στον Α-δακτύλιο. Συγκεκριμένα, η Ζώνη I των φλαβονών κυμαίνεται μεταξύ 310 και 350 nm ενώ στις φλαβονόλες αυτή η περιοχή είναι 350-385 nm. Η Ζώνη II εκτείνεται και για τις δύο κατηγορίες από 250 έως και 280 nm [Τσιμογιάννης, 2008].



Εικόνα 5. Φάσματα UV-Vis κυριότερων φλαβονοειδών του δεντρολίβανου και οι αντίστοιχες δομές τους [Τσιμογιάννης, 2008]

Τα φλαβονοειδή που είναι παρόντα στο δεντρολίβανο ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των φλαβονών και προσδίδουν την κιτρινωπή χρώση στην σκόνη του [Bai et al., 2010]. Η σύσταση του δεντρολίβανου σε φλαβονοειδή ποικίλει ανάλογα την καλλιέργεια και για τον λόγο αυτό παρατίθενται αναλύσεις όσον αφορά τη σύσταση του φυτού από διαφορετικούς ερευνητές.

Σε ανάλυση των Borrás-Linares et al. (2014) ανιχνεύτηκαν τα εξής φλαβονοειδή σε εκχυλίσματα από φύλλα δεντρολίβανου: η ομοπλανταγενίνη (homoplantagin), η σιρσιμαριτίνη (cirsimaritin), η γενκβανίνη (genkwain), η γαλλοκατεχίνη (gallocatechin), η νεπιτρίνη (nepitritin), η εσπεριδίνη (hesperidin), ο 7-γλυκοζίτης της 6-υδροξυλουτεολίνης (6-hydroxyluteolin-7-glucoside), το 3'-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (luteolin-3'-glucuronide), και δύο ισομερή του γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης (luteolin-3'-O-(O-acetyl)-β-D-glucuronide).

Σε μελέτη των Bai et al. (2010) απομονώθηκαν από εκχυλίσματα φύλλων δεντρολίβανου τα εξής φλαβονοειδή: η 6''-O-(E)-φερουλοϋλ-νεπιτρίνη (6''-O-(E)-feruloylnepitritin), η 6''-O-(E)-p-κουμαροϋλ-νεπιτρίνη (6''-O-(E)-p-coumaroylnepitritin), το 7-O-γλυκουρονίδιο της 6-μεθοξυλουτεολίνης (6-methoxyluteolin 7-glucopyranoside) που είναι μια γλυκοζυλιωμένη φλαβόνη, και δύο ισομερή του γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης (luteolin 3'-O-β-D-glucuronide και luteolin 3'-O-(3''-O-acetyl)-β-D-glucuronide), η καμπφερόλη (kaempferol), η

λουτεολίνη, η γενκβανίνη (genkwanin) και η λαδανεΐνη (Ladanein). Επίσης, το φλαβονοειδές 6''-Ο-(Ε)-φερουλοϋλ-ομοπλανταγινίνη (6''-Ο-(Ε)-feruloylhomoplantagin) απομονώθηκε για πρώτη φορά στην συγκεκριμένη μελέτη.

Σε άλλη έρευνα στα φλαβονοειδή του δεντρολίβανου συγκαταλέγονται οι ενώσεις: 6-μεθόξυ γενκβανίνη (6-methoxygenkwanin), διοσμίνη (diosmine) η οποία είναι γλυκοζίτης φλαβόνης της διοσμετίνης, η γενκβανίνη (genkwanin), η ισπιδουλίνη (hispiduline) και η σινενσετίνη (Sinensetine) [Begum, 2013].

#### Τερπενικά συστατικά

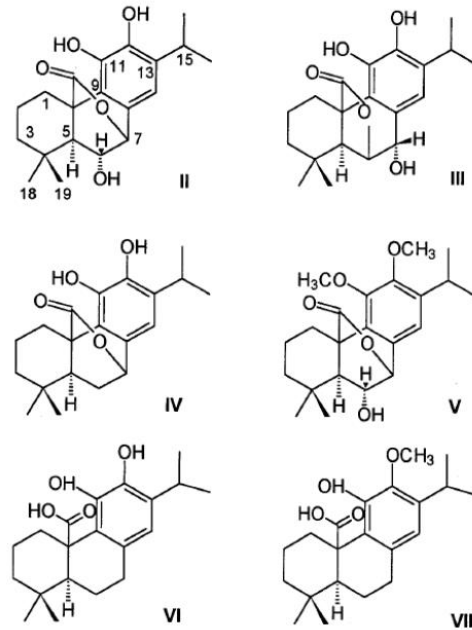
Άλλες σημαντικές ενώσεις κοινές στο δεντρολίβανο είναι τα τερπένια. Αυτά είναι συνήθως παρόντα σε αιθέρια έλαια και ρητίνες. Περιλαμβάνουν πάνω από 10.000 ενώσεις και διαιρούνται σε μονο-, δι-, τρι- και σεσκιτερπένια, ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και των ομάδων ισοπρενίου ( $C_5H_8$ ) [Lonkova, 2001; Doughari, 2012]. Τα κυριότερα τερπένια που βρίσκονται στο δεντρολίβανο είναι η καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ (τρικυκλικά διτερπένια), το ουρσολικό οξύ και το ολεανολικό οξύ (τριτερπένια) [Begum et al., 2013; Ulbricht et al., 2010].

#### Φαινολικά διτερπένια

Τα φαινολικά διτερπένια είναι παρόντα σε υψηλά ποσοστά στα είδη *Rosmarinus officinalis*, όπως προαναφέρθηκε, αλλά και σε ορισμένα είδη του γένους *Salvia*. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά διτερπένια είναι μια ομάδα ενώσεων με 20 άτομα άνθρακα, δηλαδή τέσσερις μονάδες  $C_5H_8$ . Τα κύρια φαινολικά διτερπένια του *R. officinalis* είναι το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη και βρίσκονται κυρίως στα φύλλα του και όχι στο αιθέριο έλαιο του [Schwarz, 2000].

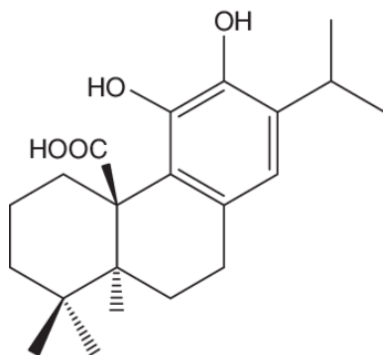
Ανάλογα τη γεωγραφική περιοχή η σύσταση του φυτού ποικίλει. Για είκοσι είδη δεντρολίβανου, τα οποία συλλέχθηκαν από διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες της Σερβίας, έγινε μελέτη προκειμένου να προσδιοριστεί η σύνθεση τους σε βιοδραστικά συστατικά. Τα εκχυλίσματα φύλλων των διαφόρων ειδών δεντρολίβανου όσον αφορά τα φαινολικά διτερπένια ήταν πλούσια σε: καρνοσικό οξύ (carnosic acid), καρνοσόλη (carnosol) και ροσμανόλη (rosmanol), τα οποία κυρίως προσδίδουν τις ευεργετικές του ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές κ.α). Επιπρόσθετα, ανιχνεύτηκαν ισομερή της ροσμανόλης όπως η επισοροσμανόλη (epiisorosmanol), η επιροσμανόλη (epirosmanol), η ροσμαδιάλη (rosmadial) αλλά και άλλες παράγωγες ενώσεις όπως ο καρνοσικός μεθυλεστέρας (methylcarnosate), 12-μεθοξυκαρνοσικό οξύ (12-methoxycarnosic acid), ο μεθυλαιθέρας της επιροσμανόλης (epirosmanolmethylether) και η 6,7,10-τετραϋδρο-7-υδροξυροσμακινόνη (6,7,10-tetrahydro-7-hydroxyrosmaquinone) [Borrás-Linares et al., 2014].

Επιπλέον, ανάλογα τους μήνες καλλιέργειας οι περιεκτικότητες στα συστατικά διαφέρουν. Βάσει έρευνας των Munné-Bosch et al. (2000) οι υψηλότερες περιεκτικότητες σε διτερπένια, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, βρέθηκαν κατά την διάρκεια του χειμώνα, από τον Οκτώβρη έως τον Φεβρουάριο. Οι χαμηλότερες εντοπίστηκαν σε καλλιέργειες των καλοκαιρινών μηνών (Μάιος-Αύγουστος), πιθανότατα λόγω ενζυμικής μετατροπής παρουσία οξυγόνου. Σε αυτή την έρευνα πρώτη φορά εντοπίστηκε το συστατικό 11-12-δι-ο-μεθυλοροσμανόλη στα φύλλα του δεντρολίβανου.



Εικόνα 6. Φαινολικά διτερπένια στα φύλλα του δεντρολίβανου : II ισοροσμανόλη, III ροσμανόλη, IV καρνοσόλη, V 11-12-δι-ο-μεθυλοροσμανόλη, VI καρνοσικό οξύ, VII 12-ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ [Munné-Bosch et al., 2000]

#### Καρνοσικό οξύ

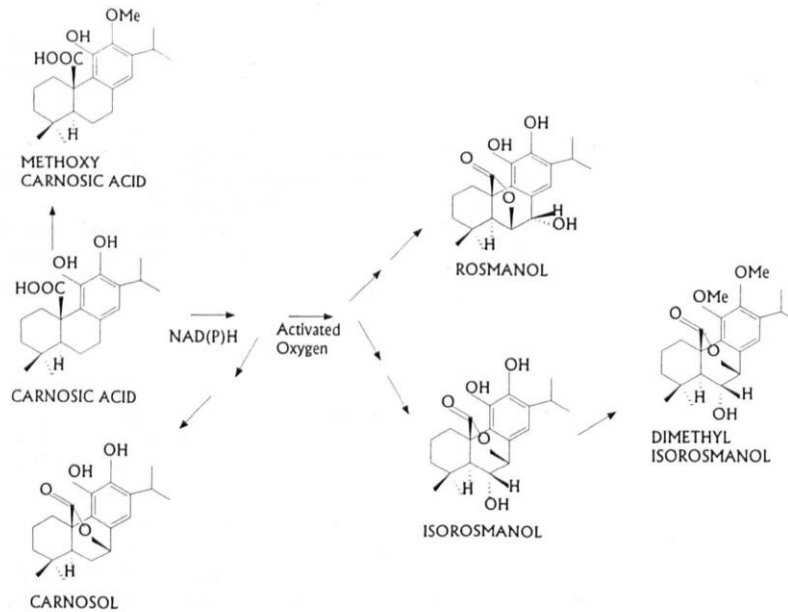


Εικόνα 7. Χημική δομή καρνοσικού οξέος

Το καρνοσικό οξύ (Carnosic acid- CA) είναι ένα φυσικό διτερπένιο αβιτανικής βενζολοδιόλης που βρίσκεται στο δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) και στο φασκόμηλο (*Salvia officinalis*) [Schwarz et al., 1992]. Σύμφωνα με τους Richheimer et al. (1996), η συγκέντρωση καρνοσικού οξέος στην φυτόμαζα του δεντρολίβανου κυμαίνεται από 1.7 έως 5.5 % ανάλογα τη γεωγραφική περιοχή. Με άλλα λόγια, η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος επηρεάζεται από το νερό, το φως και τη θερμοκρασία που επικρατεί στον τόπο καλλιέργειας του. Σε εκχυλίσματα μεσογειακού

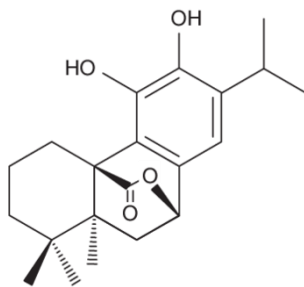
δεντρολίβανου η περιεκτικότητα σε καρνοσικό οξύ, βάσει μεταγενέστερων ερευνών, έχει βρεθεί έως και 6% ενώ σε πειραματικά φυτά στην Αργεντινή αυτή έφτανε το 30% [Munné-Bosch, 1999; Munne-Bosch and Alegre, 2000].

Πιο αναλυτικά, η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος αυξάνεται με αύξηση της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό και μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας. Παρουσία οξυγόνου το καρνοσικό οξύ αποικοδομείται σε μερικές ημέρες σε καρνοσόλη και ροσμανόλες όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 [Munné-Bosch et al., 1999]. Τέλος, ανάλογα την εποχή του χρόνου, εφόσον η θερμοκρασία μεταβάλλεται, η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος κυμαίνεται από 2.8 mg/g τον Αύγουστο έως 4.8 mg/g τον Δεκέμβριο [Munné-Bosch et al., 2000].



Εικόνα 8. Σχηματισμός διτερπενίων :ροσμανόλη, ισοροσμανόλη, διμέθυλ-ισοροσμανόλη από καρνοσικό οξύ με ενζυμική αφυδρογόνωση [Munné-Bosch et al., 1999]

### Καρνοσόλη



Εικόνα 9. Χημική δομή καρνοσόλης

Η καρνοσόλη (carnosol-COH) είναι ένα από τα φαινολικά διτερπένια που περιέχονται στο δεντρολίβανο και έχει χημικό τύπο  $C_{20}H_{26}O_4$ . Η υψηλότερη συγκέντρωση καρνοσόλης εντοπίζεται βάσει ερευνών τον Οκτώβριο (1.25 mg/g) και η χαμηλότερη τέλη Αυγούστου (0.5 mg/g) [Munné-Bosch et al., 2000]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καρνοσόλη, αλλά και άλλα συστατικά του δεντρολίβανου όπως η ροσμανόλη και η επιροσμανόλη αποτελούν παράγωγα του καρνοσικού οξέος (CA), και εμφανίζονται όταν το φυτό υποστεί κάποιου είδους κατεργασία (π.χ. η εκχύλιση με πολικούς διαλύτες ή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία).

### Φαινολικά Τριτερπένια

Μια άλλη ομάδα υποσχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών που βρίσκονται στο δεντρολίβανο είναι τα τριτερπένια, τα οποία παρουσιάζουν έντονη βιοδραστικότητα, ειδικά για τη θεραπεία του καρκίνου. Αναλυτικότερα, επισημαίνονται ενώσεις όπως το ολεανολικό οξύ, το βετουλινικό και το ουρσολικό οξύ, τα οποία είναι πεντακυκλικά τριτερπενοειδή με αντικαρκινικές ιδιότητες και είναι παρόντα στο δεντρολίβανο [Laszczyk, 2009]. Σε ανάλυση των Borrás-Linares et al. (2014) σε εκχυλίσματα φύλλων δεντρολίβανου ανιχνεύθηκαν τα παρακάτω τριτερπένια: ουρσολικό οξύ (ursolic acid), βετουλινικό οξύ (betulinic acid), μικρομερικό οξύ (micromeric acid) και 23-υδροξύβετουλινικό οξύ (23-Hydroxybetulinic acid ή anemosaropenin).

Στον πίνακα 3 έχουν συγκεντρωθεί οι περιεκτικότητες του δεντρολίβανου σε φαινολικά συστατικά από διαφορετικά πειράματα με βάση διάφορους ερευνητές.

Πίνακας 3. Περιεκτικότητες φαινολικών συστατικών του δεντρολίβανου

Ενώσεις	Μονάδες μέτρησης	Περιεκτικότητα	Βιβλιογραφική αναφορά
Καρνοσικό οξύ Καρνοσόλη	mg/100g ξηρών φύλλων	4205 387	<a href="#">Okamura, Fujimoto, Kuwabara &amp; Yagi, 1994</a>
Καρνοσικό οξύ Καρνοσόλη	mg/100g νωπών φύλλων	2279 238	<a href="#">Okamura, Fujimoto, Kuwabara, &amp; Yagi, 1994</a>
Ροσμαρινικό οξύ	mg/100g ξηρού βάρους	700	<a href="#">Zgórka &amp; Głowniak, 2001</a>
Καρνοσικό οξύ Ροσμανόλη Ροσμαρινικό οξύ Ναρινγίνη Σιρσιμαριτίνη Ισπιδουλίνη Καφεϊκό οξύ Βανιλικό οξύ Απιγενίνη	mg/100g νωπού βάρους	126.60 124.10 32.80 53.10 24.40 19.70 2.95 1.73 1.10	<a href="#">Zheng &amp; Wang, 2001</a>
Ροσμαρινικό οξύ Καφεϊκό οξύ	mg/100 g ξηρών φύλλων	1000-1100 10-20	<a href="#">Wang, Provan &amp; Helliwell, 2004</a>
Ροσμαρινικό οξύ Χλωρογενικό οξύ Καφεϊκό οξύ Φερουλικό οξύ Βανιλικό οξύ	mg/100g ξηρού βάρους	916 12 8 <5 <5	<a href="#">Kivilompolo &amp; Hyotylainen, 2007</a>
Λουτεολίνη Καφεϊκό οξύ Απιγενίνη Φερουλικό οξύ	mg/100g ξηρού βάρους	616.0 406.0 43.8 36.2	<a href="#">Wojdylo, Oszmianski &amp; Czemerzys, 2007</a>
Καρνοσικό οξύ Ροσμαρινικό οξύ Καρνοσόλη Ναρινγίνη Σιρσιμαριτίνη	mg/100g νωπού βάρους	1218.0 208.0 58.0 57.0 8.0	<a href="#">Luis, Perez &amp; Gonzalez, 2007</a>



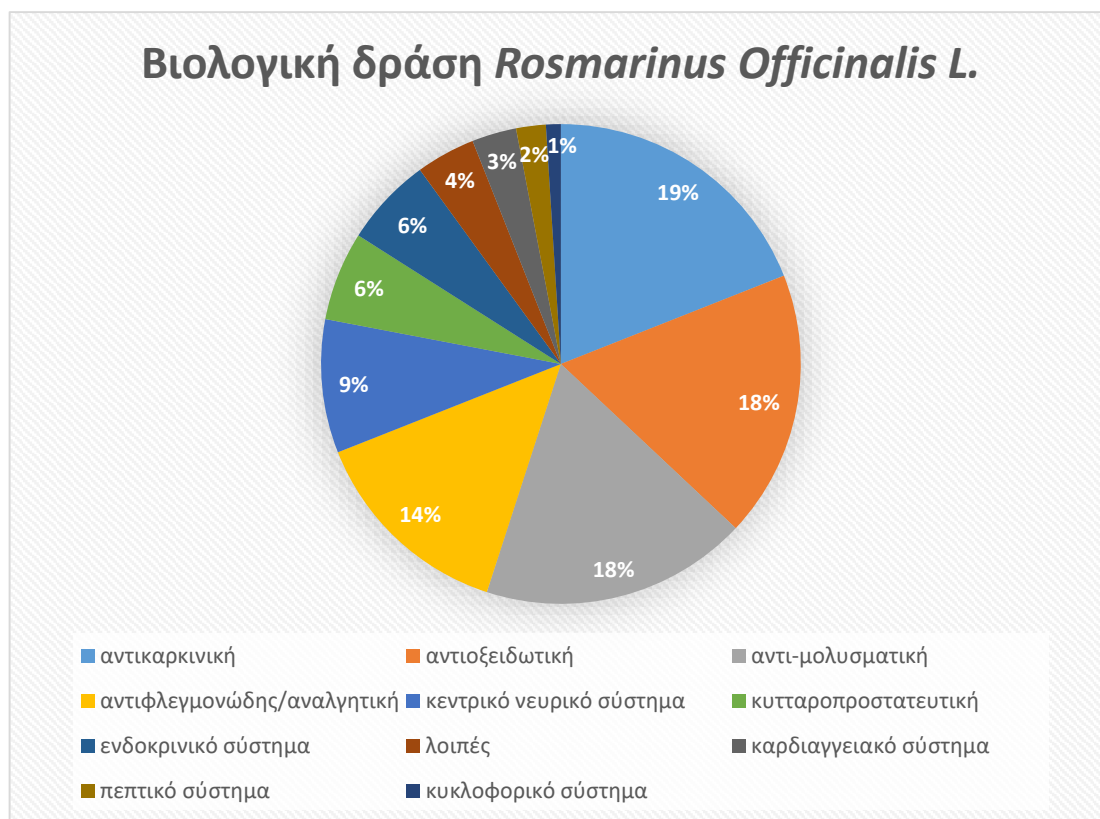
Ισπιδουλίνη		2.0	
Καφεϊκό οξύ		1.2	
Βανιλικό οξύ		0.4	
Ροσμαρινικό οξύ	mg/100g αιθανολικού εκχυλίσματος	38.5	<a href="#">Amaral et al., 2013</a>
Καρνοσικό οξύ		26.4	
Χλωρογενικό οξύ		11.2	
Καφεϊκό οξύ		7.63	
Κερκετίνη		5.10	
Ρουτίνη		3.07	
Καμπφερόλη		2.53	
Ουρσολικό οξύ		mg/100g ξηρού βάρους	190.1
Καρνοσικό οξύ	177.3		
Ολεανολικό οξύ	89.7		
βετουλινικό οξύ	46.9		
Καρνοσόλη	21.5		
Ροσμαρινικό οξύ	11.6		
Ροσμαδιάλη	8.7		
Καρνοσικός μεθυλεστέρας	7.9		
Γενκβανίνη	2.0		
Ομοπλανταγενίνη	1.5		

### Βιοδραστικά συστατικά-Βιολογική δράση

Η βιολογική δράση του *R. officinalis* L. αποδίδεται σε δύο κατηγορίες ενώσεων. Αυτές που ανήκουν στο πτητικό κλάσμα, δηλαδή το αιθέριο έλαιο, και στις φαινολικές ενώσεις [Andrade, 2018]. Αυτή η τελευταία ομάδα, όπως προαναφέρθηκε, περιέχει κυρίως ένα κλάσμα φλαβονοειδών, ροσμαρινικού οξέος και μερικών διτερπενίων που προέρχονται δομικά από το καρνοσικό οξύ, την καρνοσόλη και τη ροσμανόλη [Sánchez-Camargo et al., 2017].

Οι κυριότερες δράσεις που σχετίζονται με το δεντρολίβανο είναι η αντικαρκινική, η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή, η αντιφλεγμονώδης, η προστασία έναντι νευρολογικών διαταραχών, η χημειοπροστατευτική, η μείωση της παχυσαρκίας [Vaquero et al., 2012], του διαβήτη και της πιθανότητας ανάπτυξης μεταβολικού σύνδρομου [Sánchez-Camargo et al., 2017]. Βάσει στατιστικής έρευνας, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα 10,

βρέθηκαν τα ποσοστά των μελετών που αναφέρονται στις διάφορες βιολογικές δράσεις του δεντρολίβανου [Andrade et al., 2018].



Εικόνα 10. Ποσοστιαία Αναλογία μελετών (%) στις μελετώμενες βιολογικές δραστηριότητες του *R. officinalis* σύμφωνα με την βιβλιογραφία [Andrade et al., 2018]

Οι πολυφαινόλες του δεντρολίβανου όπως το ροσμαρινικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η λουτεολίνη φαίνεται να έχουν επιπλέον δυνατότητα έναντι των νευροεκφυλιστικών ασθενειών [El Omri, 2012]. Από έρευνες διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού είχε χολινεργικά και νευροπροστατευτικά αποτελέσματα και ανέστειλε την ακετυλοχολινεστεράση. Επιπλέον, βοηθάει στην βελτίωση της εξασθένησης της μνήμης με βάση πειράματα που έγιναν σε αρουραίους [Ozarowski, 2013].

### Αντικαρκινική δράση

Οι πολυφαινόλες είναι ενώσεις ικανές να ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση και έτσι είναι δυνατή η παρέμβαση τους στην ανάπτυξη του όγκου και την εξέλιξη του [Kar et al., 2012]. Δεδομένου ότι το δεντρολίβανο είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, πολλές μελέτες έχουν στοχεύσει στην αντικαρκινική δραστηριότητα [Tai et al., 2012; Huang et al., 1994; Dörrie et al., 2001; Tsai et al., 2011; Barni et al., 2012]. Τέτοιες μελέτες των Danilenko et al. (2004) και Huang et al. (1994) σχετικά με το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη είχαν καλά αποτελέσματα όσον αφορά την αντικαρκινική δράση. Επίσης πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την ογκογένεση στους μαστούς που προκαλείται από το 7,12-διμεθυλοβενζ[α]ανθρακένιο (DMBA) έγιναν πειράματα *in vivo* σε αρουραίους και η θεραπευτική αγωγή με εκχύλισμα δεντρολίβανου είχε χημειοπροστατευτική δράση [Singletary et al., 1996]. Με βάση τους Tai et al. (2012) το εκχύλισμα του δεντρολίβανου

αποτελεί ένα ασφαλές συμπλήρωμα για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των τυπικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων.

### Αντιοξειδωτική δράση

Τα αντιοξειδωτικά (ΑΟΧ) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αποφυγή της υποβάθμισης των τροφίμων. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη μιας ποικιλίας ασθενειών (καρκίνος, καρδιακές παθήσεις, καταρράκτης κ.α.), επειδή καθυστερούν και πολλές φορές αναστέλλουν τη διαδικασία οξείδωσης παρεμποδίζοντας την διάδοση των οξειδωτικών αλυσωτών αντιδράσεων [Ames, 1993; Storz, 2005]. Η οικογένεια Lamiaceae φαίνεται να είναι μια πλούσια πηγή φυτικών ειδών που περιέχει μεγάλες ποσότητες φαινολικών οξέων, επομένως θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη πηγή φυσικών ΑΟΧ [Couladis et al., 2003]. Οι κυριότερες ενώσεις που περιέχονται στο δεντρολίβανο και έχουν αντιοξειδωτική δράση είναι το καρνοσικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του όπως το ροσμαρινικό οξύ. Έχουν περιγραφεί πολλαπλές βιολογικές δράσεις για το ροσμαρινικό οξύ και βάσει αυτών χαρακτηρίζεται αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες [Osakabe et al., 2004].

Το δεντρολίβανο έχει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα βότανα και μπαχαρικά που έχουν διερευνηθεί και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα ως συντηρητικό τροφίμων αλλά και στα καλλυντικά και στη φυτοθεραπεία [Couto et al., 2012]. Η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα βότανα αναγνωρίστηκε σύμφωνα με τους Chirault et al. το 1952. Οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες σχετίζονται ιδιαίτερα με τα φαινολικά διτερπένια κάτι το οποίο επιβεβαίωσαν και οι Brieskorn & Dömling (1969) οι οποίοι θεώρησαν ότι τα φαινολικά διτερπένια, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, είναι κυρίως υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση του φυτού. Το 1992, οι Schwarz et al. απέδειξαν την σχέση των φαινολικών διτερπενίων του δεντρολίβανου με την αντιοξειδωτική δράση που αυτό έχει.

### Αντιφλεγμονώδης δράση

Ορισμένες πειραματικές μελέτες έχουν αναφέρει τις αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές δράσεις του αιθέριου ελαίου του δεντρολίβανου και βιολογικά ενεργών ενώσεων του εκχύλισματος όπως: το καρνοσικό οξύ [Danilenko et al., 2004], η καρνοσόλη, το ουρσολικό οξύ, το βετουλινικό οξύ καθώς και το ροσμαρινικό οξύ, η ροσμανόλη και το ολεανολικό οξύ [Benincá et al., 2011]. Έχει αναφερθεί ότι αυτές οι ενώσεις έχουν δράση κατά του πόνου και ότι κάθε μεμονωμένο τριτερπένιο έδειξε παρόμοια ισχύ με εκείνη που παρατηρήθηκε με το ketorolac, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο. [Benincá et al., 2011 ; Martínez AL et al., 2012].

Σε προκλινικά στάδια, το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου χρησιμοποιήθηκε τοπικά για μυϊκούς και ρευματικούς πόνους. Η αξιολόγηση έγινε με χρήση καρραγενάνης και προσομοιάσθηκε η πλευρίτιδα και το οίδημα του ποδιού σε αρουραίους. Αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι το αιθέριο έλαιο θα μπορούσε να μειώσει αξιοσημείωτα το επαγόμενο οίδημα σε 1-4 ώρες [Takaki et al., 2008; Lucarini et al., 2013].

Τέλος σχετικά με μελέτες πειραματικών φαρμάκων που περιέχουν εκχύλισμα δεντρολίβανου, οι Lukaczer et al. (2005) ανέφεραν την αποτελεσματικότητα του «Meta050» (συνδυασμός μειωμένων ισο-αλφα-οξέων από λυκίσκο, εκχύλισμα δεντρολίβανου και ολεανολικό οξύ) σε ασθενείς με ρευματοειδή νόσο. Οι ασθενείς με πόνο που προκλήθηκε από οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και ινομυαλγία έλαβαν 440 mg «Meta050», δόση η οποία διπλασιάστηκε μετά από 4 εβδομάδες στην πλειοψηφία των ασθενών. Αυτή η εργασία αναφέρει μια σημαντική μείωση του πόνου στους ασθενείς με αρθρίτιδα κατά 40-

50%, αλλά όχι στους ασθενείς με ινομυαλγία. Επιπλέον, σε μελέτη των Minich et al. (2007) χρησιμοποιήθηκε παρόμοιο σκεύασμα με το «Meta050» με το όνομα NG440 και εξετάστηκε η κλινική ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά του. Σύμφωνα με αυτή το NG440 είναι ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση και η τοξικότητά του στα ζώα δεν είχε δυσμενείς επιπτώσεις σε ημερήσιες δόσεις  $\leq 250$  mg /kg.

### Αντιμικροβιακή δράση

Σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση του δεντρολίβανου αυτή εξετάζεται σε μελέτη των Bozin et al. (2007) και από τα αποτελέσματα της διαπιστώθηκε ότι το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών μικροοργανισμών αλλοίωσης των τροφίμων όπως οι *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis* και *Shigella sonnei*. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο αυτού έδειξε και αντιμυκητιακή δράση. Εκτός από τις αντιβακτηριακές ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια έχουν επίσης, αντιπαρασιτικές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες, οι οποίες είναι σημαντικές για τον έλεγχο των ανθρώπινων ασθενειών μικροβιακής προέλευσης [Luqman et al., 2007]. Ακόμη, σύμφωνα με μελέτη των Jiang et al. (2011), το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου έδειξε την υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με τις μεμονωμένες ενώσεις 1,8-κινεόλη και  $\alpha$ -πινένιο.

Από έρευνα των Silvia Moreno et al. (2006) ανάλογα τον διαλύτη εκχύλισης παρατηρείται διαφορετική αποτελεσματικότητα κατά των μικροβίων κάτι το οποίο σημαίνει ότι αυτή σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες. Πιο συγκεκριμένα, μεθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματα περιείχαν 30% καρνοσικό οξύ, 16% καρνοσόλη και 5% ροσμαρινικό οξύ και ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Bacillus megaterium* PV447, *Bacillus subtilis* GSY1604 και *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) με ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC) 2-15  $\mu\text{g/mL}$ , των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (*Escherichia coli* XL1Blue, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Klebsiella pneumoniae* και *Proteus mirabilis* ) με MIC 2-60  $\mu\text{g/mL}$  και των ζυμομυκήτων (*Saccharomyces cerevisiae* PRY225, *Candida albicans*, *Picchia pastoris* X33) με MIC 4  $\mu\text{g/mL}$ . Σε αντίθεση, τα υδατικά εκχυλίσματα περιείχαν μόνο 15% ροσμαρινικό οξύ και έδειξαν χαμηλή αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση των μικροβίων.

Το καρνοσικό και το ροσμαρινικό οξύ είναι οι κύριοι βιοδραστικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες που υπάρχουν στα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου. Έτσι βάσει των παραπάνω, το καρνοσικό οξύ χρησιμοποιείται ως συντηρητικό ή αντιοξειδωτικό στα τρόφιμα (E392) αλλά και σε μη εδώδιμα προϊόντα (π.χ. οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα και τσίχλες) λόγω των ισχυρών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του.

## Κεφάλαιο 2: Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών

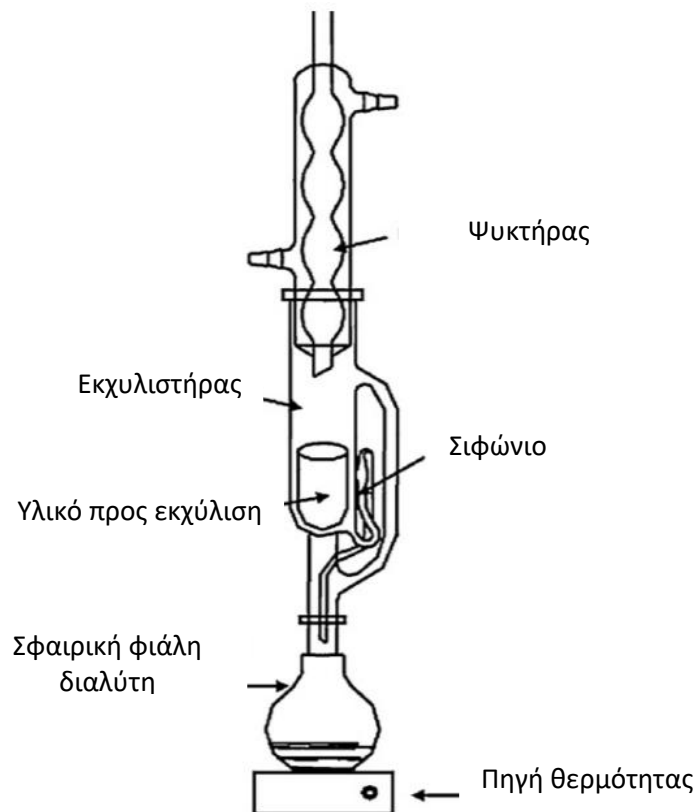
### Εκχύλιση

Στη βιομηχανία τροφίμων οι περισσότερες εφαρμογές της εκχύλισης αφορούν στην εκχύλιση στερεού-υγρού, η οποία καλείται και έκπλυση. Στην εκχύλιση στερεού-υγρού απομακρύνεται ένα ή περισσότερα συστατικά από το στερεό χρησιμοποιώντας κατάλληλο διαλύτη. Όσον αφορά την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φύλλα δεντρολίβανου έχουν γίνει πολλές μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνολογίες εκχύλισης. Αυτές ταξινομούνται σε συμβατικές και μη. Ονομαστικά στις συμβατικές συγκαταλέγονται: η εκχύλιση Soxhlet, η διαβροχή και η απόσταξη με υδρατμούς ενώ στις μη συμβατικές: η εκχύλιση με υπερήχους, η εκχύλιση με μικροκύματα, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό, η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση, η εκχύλιση με ιοντικά υγρά, η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση και η εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία [Jacotet-Navarro et al., 2015].

### Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

#### Εκχύλιση Soxhlet

Το 1879, ο Von Soxhlet ανέπτυξε ένα σύστημα εκχύλισης, το οποίο πήρε το όνομα του και χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη τεχνική για πάνω από έναν αιώνα. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον προσδιορισμό του λίπους στο γάλα.



Εικόνα 11. Διάταξη Εκχύλισης Soxhlet

Στην συσκευή Soxhlet το προς εκχύλιση υλικό αλεσμένο τοποθετείται σε φύσιγγα, από πεπιεσμένο διηθητικό χαρτί ή κυτταρίνη, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται εντός του εκχυλιστήρα [Azwanida, 2015]. Ο διαλύτης που βρίσκεται μέσα στη σφαιρική φιάλη θερμαίνεται και οι ατμοί του ανέρχονται από τον σωλήνα στον ψυκτήρα, όπου

υγροποιούνται και επαναλίσθουν στον εκχυλιστήρα παραλαμβάνοντας μέρος των εκχυλιζόμενων ουσιών. Όταν ο διαλύτης φτάσει στο ανώτατο ύψος του σιφωνίου, επαναρρέει στην φιάλη μαζί με τα συστατικά που έχουν εκχυλιστεί. Εκεί μόνο ατμοί του καθαρού διαλύτη επανεξατμίζονται προς συνέχιση της διαδικασίας της εκχύλισης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι το τέλος της εκχύλισης [Luque de Castro et al., 2010].

Στα πλεονεκτήματα της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet συγκαταλέγονται η επανειλημμένη επαφή του προς εκχύλιση δείγματος με φρέσκο διαλύτη, καθώς αυτός εξατμίζεται και ξανά υγροποιείται και με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η μεταφορά των εκχυλίσιμων στερεών [Luque de Castro et al., 2010]. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μέθοδος απαιτεί μικρότερη ποσότητα διαλύτη σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους όπως η διαβροχή [Azwanida, 2015]. Επίσης, το σύστημα παραμένει σε σχετικά υψηλά θερμοκρασιακά επίπεδα λόγω της θερμότητας που εφαρμόζεται στη σφαιρική φιάλη με σκοπό τον βρασμό του διαλύτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας των εκχυλιζόμενων συστατικών στο διαλύτη. Επιπλέον, σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτείται διήθηση μετά την εκχύλιση εφόσον το στερεό υπόλειμμα παραμένει στη φύσιγγα. Η εκχύλιση Soxhlet είναι απλή και απαιτεί σύντομη εκπαίδευση σε σχέση με άλλες τεχνικές καθώς ο χειρισμός στην παραλαβή του εκχυλίσματος είναι εύκολος. Τέλος, συχνά τα προκύπτοντα εκχυλίσματα έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα στα επιθυμητά βιοδραστικά συστατικά σε σχέση με μη συμβατικές εναλλακτικές μεθόδους εκχύλισης (εκχύλιση με μικροκύματα, εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό κ.λπ.) [Luque de Castro et al., 2010].

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet αυτή παρουσιάζει και κάποια πολύ σοβαρά μειονεκτήματα σε σύγκριση σε άλλες τεχνικές εκχύλισης. Από τα κυριότερα είναι η απαίτηση μεγάλων χρόνων για την ολοκλήρωση της εκχύλισης καθώς και ότι η συσκευή δεν παρέχει ανάδευση, η οποία θα επιτάχυνε τη διαδικασία εκχύλισης. Επιπλέον, η ποσότητα των διαλυτών που χρησιμοποιείται είναι μεγάλη σε σχέση με τις μη συμβατικές μεθόδους, κάτι το οποίο συνεπάγεται υψηλότερο κόστος και δυσκολότερη διαχείριση των παραγόμενων αποβλήτων [Luque de Castro et al., 2010]. Ακόμη, αναφορικά με τους διαλύτες σημαντική είναι και η έκθεση σε επικίνδυνους και εύφλεκτους υγρούς οργανικούς διαλύτες, με πιθανές τοξικές εκπομπές κατά την εκχύλιση [Azwanida, 2015]. Η εκχύλιση λαμβάνει χώρα στο σημείο βρασμού του διαλύτη που έχει επιλεγεί, πράγμα το οποίο συνεπάγεται πιθανή θερμική αποικοδόμηση ποσότητας των προς εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών, ιδιαίτερα όταν αυτά είναι θερμοευαίσθητα. Δεν μπορεί να παραληφθεί η αναγκαιότητα ενός επιπλέον σταδίου επεξεργασίας μετά την εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet, καθώς λόγω του μεγάλου όγκου διαλύτη που χρησιμοποιείται απαιτείται εξάτμιση αυτού για την παραλαβή των επιθυμητών εκχυλισμένων συστατικών. Τέλος, η τεχνική βασίζεται στην εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη και δεν είναι εύκολη η αυτοματοποίηση της [Luque de Castro et al., 2010].

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet έχουν χρησιμοποιηθεί ως σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη μιας ποικιλίας τροποποιήσεων με στόχο τη μείωση του χρόνου εκχύλισης και την αυτοματοποίηση της μεθόδου. Πολλές αυτοματοποιημένες διατάξεις Soxhlet έχουν κατασκευαστεί και έχουν διατεθεί στο εμπόριο κάποιες από τις οποίες ελέγχονται και από ηλεκτρονικό υπολογιστή όπως η Soxtec™ 8000. Πλεονεκτήματα των αυτοματοποιημένων διατάξεων είναι η συντόμευση του χρόνου εκχύλισης, η μείωση του όγκου του διαλύτη εκχύλισης και η ταυτόχρονη παροχή πολλών εκχυλιζόμενων δειγμάτων. Δεν μπορεί όμως να παραληφθεί το υψηλό κόστος αυτών. Επιπρόσθετα, η υποβολή της εκχύλισης Soxhlet με χρήση υπερήχων ή μικροκυμάτων, εργαστηριακά φαίνεται υποσχόμενη, με τον συνδυασμό με μικροκύματα να αποτελεί την καλύτερη εναλλακτική λύση μέχρι στιγμής για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της Soxhlet [Luque de Castro et al., 2010].



## Διαβροχή (maceration)

Η διαβροχή (maceration) αποτελεί μια από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Το προς εκχύλιση υλικό, σε μορφή σκόνης, τοποθετείται σε κλειστό δοχείο σε θερμοκρασία δωματίου με κατάλληλο διαλύτη. Η παραμονή μπορεί να είναι σύντομη αλλά μπορεί να φτάσει έως και τις τρεις ημέρες και συνοδεύεται από ανακίνηση ανά τακτά διαστήματα. Η παραπάνω επεξεργασία γίνεται με σκοπό να μαλακώσει το κυτταρικό τοίχωμα του φυτού και να απελευθερωθούν τα βιοδραστικά συστατικά του, τα οποία θα ανακτηθούν από τον διαλύτη. Μετά από το απαιτούμενο χρονικό διάστημα παραμονής το μίγμα στραγγίζεται και διηθείται. Η τεχνική αυτή θεωρείται η ευκολότερη, η πιο οικονομική και είναι ιδανική για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων ουσιών ωστόσο επειδή χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος διαλυτών απαιτείται σωστή διαχείριση των οργανικών αποβλήτων [Azwanida, 2015]. Παρά την εκτεταμένη χρήση της διαβροχής, ιδιαίτερα για απομόνωση φυσικών προϊόντων, αυτή χαρακτηρίζεται από πρωτόκολλα εκχύλισης μεγάλη χρονικής διάρκειας και έχει χαμηλή απόδοση [Luque de Castro, 2010].

## Απόσταξη με υδρατμούς (Hydrodistillation)

Η υδρο-απόσταξη είναι μια παραδοσιακή μέθοδος εκχύλισης η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την εκχύλιση αιθέριων ελαίων και βιοδραστικών ενώσεων από φυτά. Ως μέθοδος δεν περιλαμβάνει την χρήση οργανικών διαλυτών και συνήθως προηγείται της ξήρανσης του φυτού. Οι τρεις κύριες φυσικοχημικές διεργασίες που εμπλέκονται στην υδρο-απόσταξη είναι η διάχυση του νερού, η υδρόλυση και η αποσύνθεση λόγω θερμότητας. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι υδρο-απόσταξης:

- η απόσταξη με νερό (water distillation),
- η απόσταξη με νερό και ατμό (water and steam distillation)
- και η απόσταξη με ατμό (direct steam distillation) [Aramrueang et al., 2019; Oreopoulou et al., 2019].

Στην υδρο-απόσταξη, αρχικά, σε έναν άμβυκα (αποστακτήρα) προστίθεται νερό σε επαρκή ποσότητα, και στη συνέχεια τοποθετείται το φυτικό υλικό σε ειδικό χώρο εντός αυτού, ώστε να μην έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό. Με πρόσδοση θερμότητας το νερό έρχεται σε βρασμό με αποτέλεσμα ο ατμός να συμπαρασέρνει το αιθέριο έλαιο του φυτού. Εναλλακτικά, η διεργασία γίνεται με απευθείας είσοδο ατμού στον αποστακτήρα όπου βρίσκεται το φυτικό υλικό [Oreopoulou et al., 2019]. Το θερμό νερό και ο ατμός αποτελούν τα μέσα για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων από την μήτρα του φυτού. Έτσι, ψύχοντας το μείγμα ατμών και ελαίου, με ρεύμα ψυχρού νερού, αυτό συμπυκνώνεται και διαχωρίζεται το έλαιο μαζί με τις βιοδραστικές ενώσεις από το νερό, λόγω διαφοράς πυκνότητας. Δεδομένου ότι η υδρο-απόσταξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο βρασμού του νερού, ενδέχεται να χαθούν ορισμένα πτητικά συστατικά, φυσικές χρωστικές ή και βιοδραστικές ενώσεις. Για τον λόγο αυτό η χρήση αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη όσον αφορά θερμοευαίσθητες ενώσεις [Aramrueang et al., 2019; Oreopoulou et al., 2019].

Μετά το πέρας της υδρο-απόσταξης, αφού δηλαδή παραληφθεί το αιθέριο έλαιο, μπορούν να αξιοποιηθούν πλήρως και το ανθόνερο που προκύπτει αλλά και το αποσμημένο φυτικό υλικό. Κύριος λόγος αξιοποίησης είναι ότι αυτά είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διεργασία της υδρο-απόσταξης να έχει λίγα απόβλητα [Oreopoulou et al., 2019].



## Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Οι περισσότερες συμβατικές διεργασίες εκχύλισης, έχουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως η χρήση επιβλαβών διαλυτών, η αποικοδόμηση ενώσεων ενδιαφέροντος λόγω υψηλής θερμοκρασίας, η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης, η δυσκολία εφαρμογής τους ή το υψηλό οικονομικό και ενεργητικό κόστος. Για τον λόγο αυτό, προτιμάται η χρήση μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης καθώς θεωρούνται πιο «πράσινες τεχνολογίες». Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι είναι πιο ασφαλείς για τους πειραματιστές, πιο φιλικές για το περιβάλλον λόγω εξοικονόμησης ενέργειας και ταυτόχρονα δεν παρατηρείται μείωση της απόδοσης της εκχύλισης [Jacotet-Navarro et al., 2015].

### Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction, UAE)

Η χρήση υπερήχων στην εκχύλιση φυτών (Ultrasound-assisted extraction, UAE ή sonication extraction) αυξάνει τη μεταφορά μάζας με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας εκχύλισης των βιοενεργών συστατικών. Αυτή η αύξηση αποδίδεται στο φαινόμενο της σπηλαιώσης που συμβαίνει στον διαλύτη με τη διέλευση ενός υπερηχητικού κύματος. Με την εισαγωγή υπερήχων υψηλής ισχύος σε υγρό τα ηχητικά κύματα μεταδίδονται και δημιουργούν εναλλασσόμενους κύκλους υψηλής πίεσης (συμπίεσης) και χαμηλής πίεσης (αραίωσης), με ρυθμούς ανάλογα με τη συχνότητα. Κατά τη διάρκεια του κύκλου χαμηλής πίεσης τα υπερηχητικά κύματα δημιουργούν μικρά κενά στο υγρό. Όταν αυτές οι φυσαλίδες φτάσουν έναν όγκο στον οποίο δεν μπορούν πλέον να απορροφούν ενέργεια, καταρρέουν βίαια κατά την διάρκεια ενός κύκλου υψηλής πίεσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σπηλαιώση. Κατά τη διάρκεια του κύκλου συμπίεσης οι φυσαλίδες συμπιέζονται με αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης. Η βίαιη κατάρρευση των φυσαλίδων εντός του διαλύτη εκχύλισης οδηγεί σε καλύτερη ανάμιξη αυτού με την φυτόμαζα. Οι υπέρηχοι επιτρέπουν μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη στη φυτόμαζα. Αυτό, σε συνδυασμό με την ενισχυμένη μεταφορά μάζας και τη σημαντική διάρρηξη των κυττάρων, μέσω της κατάρρευσης των φυσαλίδων, έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών [Rodríguez-Rojo et al., 2012].

Η εκχύλιση με υπερήχους διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα όπως είναι η υψηλή απόδοση, οι γρήγοροι ρυθμοί εκχύλισης, η μικρότερη κατανάλωση διαλυτών, η χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης και όσον αφορά το CA υψηλότερη απόδοση και περιεχόμενο σε αυτό σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης [Jacotet-Navarro et al., 2015].

Για τη μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με χρήση υπερήχων είναι απαραίτητη μια προεπεξεργασία της πρώτης ύλης και συγκεκριμένα η απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου και η άλεση της φυτόμαζας. Η απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου μπορεί να γίνει με εκχύλιση μικροκυμάτων χωρίς διαλύτες (solvent free microwave extraction-SFME, 3000 J/g) [Rodríguez-Rojo et al., 2012] ή με απόσταξη. Επιπλέον, η ανάδευση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης συμβάλλει στην μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας. Σύμφωνα με τους Paniwnyk et al. (2009) όταν η διεργασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε χωρίς ανάδευση, το φυτικό υλικό δεν διασκορπίστηκε στη φιάλη και ενήργησε ως εμπόδιο στη μετάδοση ενέργειας υπερήχων. Αντίθετα, η απόδοση της εκχύλισης του καρνοσικού και του ροσμαρινικού οξέος αυξήθηκε στην περίπτωση που αυτή πραγματοποιήθηκε υπό μηχανική ανάδευση. Επιπρόσθετα, κατ' αυτόν τον τρόπο βελτιώθηκε και η απόδοση της αιθανόλης ως διαλύτη αναφορικά με το καρνοσικό οξύ. Τέλος, η φυτόμαζα που υποβάλλεται σε εκχύλιση υπόκειται προηγουμένως σε ξήρανση καθώς η παρουσία νερού έχει αποδειχθεί ότι είναι επιζήμια για την αποτελεσματική εκχύλιση των αντιοξειδωτικών [Paniwnyk et al., 2009].

Η εκχύλιση με υπερήχους μπορεί να γίνει είτε σε λουτρό είτε σε σύστημα με στέλεχος υπερήχων. Σε μελέτη των Albu et al. (2004) τα αποτελέσματα της εκχύλισης σε θερμοκρασία

50°C χρησιμοποιώντας λουτρό υπερήχων, συχνότητας 40 kHz, ήταν παρόμοια με εκείνα που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας σύστημα με στέλεχος υπερήχων, συχνότητας 20 kHz. Δεδομένου ότι ένα λουτρό υπερήχων δύναται να χρησιμοποιηθεί και σε μεγαλύτερη κλίμακα, περισσότερη έρευνα πρέπει να γίνει όσον αφορά τη χρήση αυτού για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών. Η δυνατότητα χρήσης σε μεγαλύτερη κλίμακα επιβεβαιώνεται και από μελέτη των Raniwnyk et al. (2009) καθώς η εκχύλιση με λουτρό υπερήχων αποδείχθηκε αποτελεσματική για όγκο διαλύτη 125 L και μάζα ξηρού φυτού ίση με 6.25 kg υποδεικνύοντας την πιθανότητα χρήσης υπερήχων σε βιομηχανική κλίμακα.

Οι Albu et al. (2004) χρησιμοποίησαν την τεχνολογία των υπερήχων με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης του καρνοσικού οξέος από το φυτό *Rosmarinus officinalis*. Τόσο αποξηραμένα όσο και φρέσκα φύλλα του βοτάνου εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτες βουτανόνη, οξικό αιθυλεστέρα και αιθανόλη με αναλογία φυτόμαζας : διαλύτη 1:10. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ίδια θερμοκρασία και η κατεργασία με υπερήχους βελτίωσε τις αποδόσεις του καρνοσικού οξέος και για τους τρεις διαλύτες μειώνοντας ταυτόχρονα και τους χρόνους εκχύλισης. Το μεγαλύτερο μέρος των συστατικών εκχυλίστηκε εντός 15 min, με χρήση υπερήχων. Επιπρόσθετα, με τη χρήση υπερήχων η αιθανόλη, η οποία είναι ένας φτωχός διαλύτης υπό συμβατικές συνθήκες, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τους άλλους διαλύτες όταν αυτοί υποβάλλονταν στην ίδια διαδικασία. Έτσι, η χρήση υπερήχων θεωρείται ότι μείωσε την επίδραση του διαλύτη στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Βάσει αυτού μπορεί να διευρυνθεί το πεδίο επιλογής διαλυτών που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση με στροφή προς πιο οικονομικούς και ασφαλείς διαλύτες αλλά και πιο φιλικούς προς το περιβάλλον.

Σε μελέτη των Raniwnyk et al. (2009) πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υπερήχους με φρέσκο αλλά και με αποξηραμένο δεντρολίβανο. Κατά την εκχύλιση καρνοσικού οξέος από φρέσκο δεντρολίβανο χρησιμοποιώντας αιθανόλη (IMS), η ποσότητα του καρνοσικού οξέος που εκχυλίστηκε εντός 15 min ήταν 16,58 mg/g και μειώθηκε στα 11,86 mg/g μετά από εκχύλιση 45 min. Σε σύγκριση με το αποξηραμένο δεντρολίβανο, η ποσότητα του καρνοσικού οξέος που εκχυλίστηκε εντός 15 min ήταν 15,12 mg/g και αυξήθηκε στα 19,84 mg/g μετά από 45 min. Με σκοπό να εξηγηθεί η διαφορά στην αποτελεσματικότητα εκχύλισης του καρνοσικού οξέος μεταξύ αποξηραμένων και φρέσκων φύλλων δεντρολίβανου πραγματοποιήθηκε επιπλέον εκχύλιση με αιθανόλη (IMS) και νερό σε αναλογία 80:20. Η παρουσία του νερού επηρέασε τις αποδόσεις σε καρνοσικό και ροσμαρινικό οξύ. Συγκεκριμένα για το καρνοσικό οξύ παρατηρήθηκε μικρότερη αύξηση της εκχυλιζόμενης ποσότητας ανά γραμμάριο φυτού από τα 15 min (9,52 mg/g) στα 45min (13,84 mg/g). Με την προσθήκη νερού στο σύστημα φαίνεται σαφώς ότι τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μειώνονται μέσω της χαμηλής διαλυτότητας στον διαλύτη εκχύλισης και πιθανώς λόγω κάποιας αποικοδόμησης καθώς είναι γνωστό ότι το νερό παρουσία υπερήχων σχηματίζει ελεύθερες ρίζες, όπως το υδροξύλιο και το υπεροξύλιο, οι οποίες θα αντιδράσουν με τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος. Αυτή είναι μια εξήγηση για τα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών που βρίσκονται στα εκχυλίσματα από φρέσκο δεντρολίβανο σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα του αποξηραμένου καθώς κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με υπερήχους το νερό που περιέχεται στο φυτό θα απελευθερωθεί λόγω της διαβροχής του. Ως αποτέλεσμα αυτού τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας του διαλύτη εκχύλισης μεταβάλλονται.

Σε μελέτη των Trusheva et al. (2007) η εκχύλιση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών από πρόπολη σε λουτρό υπερήχων ήταν η πιο αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης, όσον αφορά τα φαινολικά οξέα σε σύγκριση με την εκχύλιση με μικροκύματα ή την διαβροχή. Το συμπέρασμα αυτό εξήχθη λαμβάνοντας υπόψη την απόδοση, το σύντομο χρόνο εκχύλισης (30 min) και την υψηλή εκλεκτικότητα.

## Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave assisted extraction, MAE)

Τα μικροκύματα είναι μη ιονίζοντα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με συχνότητα μεταξύ 300 MHz και 300 GHz. Στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα τοποθετούνται μεταξύ των ραδιοκυμάτων και των υπέρυθρων ακτίνων [Letellier and Budzinski, 1999]. Η Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave assisted extraction, MAE) χρησιμοποιεί την ενέργεια των μικροκυμάτων για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τη μήτρα του δείγματος [Azwanida, 2015]. Πρώτη αναφορά της χρήσης μικροκυμάτων έγινε το 1975 στην όξινη χώνευση δειγμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό μετάλλων. Η εκχύλιση οργανικών ενώσεων με διαλύτη, ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980 χρησιμοποιώντας οικιακούς φούρνους μικροκυμάτων και από το 1986 εισήχθησαν οι πρώτοι ειδικά σχεδιασμένοι φούρνοι για την εκχύλιση με μικροκύματα [Poole, 2020; Letellier and Budzinski, 1999].

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην επίδραση των μικροκυμάτων στα πολικά συστατικά ή τον διαλύτη (π.χ νερό), προκαλώντας θέρμανση [Azwanida, 2015]. Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα μέσω δύο μηχανισμών: της ιοντικής επαγωγής (ionic conduction) και της διπολικής περιστροφής (dipole rotation). Η θερμότητα που παράγεται μέσω ιοντικής επαγωγής οφείλεται στην αντίσταση του διαλύματος, στην κίνηση των ιόντων του. Η μετανάστευση των διαλυμένων ιόντων οδηγεί σε συγκρούσεις μεταξύ των μορίων επειδή η κατεύθυνση των ιόντων αλλάζει όσες φορές αλλάζει το πεδίο. Η διπολική περιστροφή σχετίζεται με τις κινήσεις των πολικών μορίων του διαλύματος λόγω της προσπάθειάς τους να ευθυγραμμιστούν με τη φορά του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Εξαιτίας, λοιπόν, αυτών των περιστροφών και των συγκρούσεων υφίσταται ταχύτατη αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος [Letellier and Budzinski, 1999].

Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα της, η μέθοδος MAE παρουσιάζει μειωμένο χρόνο εκχύλισης και όγκο απαιτούμενου διαλύτη σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους όπως η διαβροχή και η εκχύλιση Soxhlet [Azwanida, 2015; Poole, 2020]. Επιπλέον, έχει δώσει καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την ανάκτηση των επιθυμητών ουσιών και την επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών είναι πολύ σημαντική για την αποφυγή τυχόν θερμικής αποικοδόμησης.

Συγκεκριμένα, στα μειονεκτήματα της μεθόδου αναφέρεται ότι η εκχύλιση με μικροκύματα δεν είναι κατάλληλη για την εκχύλιση ενώσεων που είναι ασταθείς σε υψηλή θερμοκρασία, έτσι για αυτές προτιμάται η εκχύλιση με υπερήχους [Poole, 2020]. Ακόμη η μέθοδος των μικροκυμάτων περιορίζεται στην εκχύλιση φαινολικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους όπως τα φαινολικά οξέα επειδή αυτά τα μόρια είναι σταθερά υπό συνθήκες θέρμανσης με μικροκύματα σε θερμοκρασία έως και 100 °C για 20 min. Αντίθετα, οι τανίνες και οι ανθοκυανίνες δεν ενδείκνυται να εκχυλίζονται με MAE, καθώς ενδέχεται να υποστούν αποικοδόμηση σε υψηλή θερμοκρασία [Azwanida, 2015]. Επιπλέον, οι ιξώδεις διαλύτες μπορεί να εμφανίζουν χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων. Μετά το πέρας της εκχύλισης είναι απαραίτητο το εκχύλισμα αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου να υποβληθεί σε ένα στάδιο διαχωρισμού το οποίο περιλαμβάνει απόχυση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Τέλος, το αρχικό κόστος κεφαλαίου είναι υψηλό σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνολογίες εκχύλισης, παρόλο που η κατανάλωση διαλύτη είναι σημαντικά μικρότερη [Poole, 2020].

Σε μελέτη των Trusheva et al. (2007) που σχετιζόταν με την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών και συγκεκριμένα φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών από πρόπολη η απόδοση της εκχύλισης με μικροκύματα, αλλά και με υπερήχους, ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή που προέκυψε με διαβροχή. Ακόμη, εξήχθη το συμπέρασμα ότι επιπλέον κύκλοι MAE (π.χ. από 2x10s έως 3x10s) οδήγησαν σε δραστική μείωση της απόδοσης των φαινολικών οξέων και των φλαβονονών, λόγω κυρίως της οξειδωσης των ενώσεων. Παρόλα

αυτά η MAE ήταν ταχύτερη μέθοδος εκχύλισης, σε σύγκριση με την διαβροχή και ακόμη και τους υπερήχους.

### Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid extraction, SFE)

Η πρώτη αναφορά της υπερκρίσιμης κατάστασης έγινε το 1822 από τον Baron Gagniard de la Tour [Gagniard de la Tour, 1822]. Ως Υπερκρίσιμο ρευστό (Supercritical fluid, SF) καλείται μια ουσία που βρίσκεται σε θερμοκρασία υψηλότερη από την κρίσιμη θερμοκρασία της και σε πίεση μεγαλύτερη από την κρίσιμη πίεσή της. Υπό κανονικές συνθήκες κάθε αέριο συμπιεζόμενο μετατρέπεται σε υγρό. Με την επίτευξη, όμως, των υπερκρίσιμων συνθηκών οι δύο ξεχωριστές φάσεις, υγρή και αέρια, δεν υφίστανται πλέον. Υπάρχει μόνο μία ομογενής φάση, που παρουσιάζει ιδιότητες τόσο υγρού όσο και αερίου [Azwanida, 2015]. Συγκεκριμένα, τα υπερκρίσιμα ρευστά κατέχουν ιδιότητες των αερίων όπως η διαχυτότητα, το χαμηλό ιξώδες, και η σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση αλλά και ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα υγρά όπως η μεγαλύτερη πυκνότητα και η ικανότητα διαλυτοποίησης ουσιών [Prado et al., 2015; Azwanida, 2015]. Λόγω των τελευταίων τα υπερκρίσιμα ρευστά θεωρούνται καλά εκχυλιστικά μέσα. Ένα παράδειγμα SF είναι το CO<sub>2</sub> το οποίο βρίσκεται στην υπερκρίσιμη κατάσταση σε θερμοκρασία άνω των 31,1 ° C και πίεση μεγαλύτερη από 7380 kPa. Η εκχύλιση υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>), λόγω της χαμηλής του πολικότητας αρχικά ενδεικνυόταν για μη πολικά συστατικά. Στην συνέχεια όμως με τροποποιήσεις όπως η προσθήκη μικρής ποσότητας αιθανόλης ή μεθανόλης κατέστη δυνατή η εκχύλιση πολικών ενώσεων, όπως είναι οι φαινολικές [Azwanida, 2015].

Ως μέθοδος, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (supercritical fluid extraction, SFE) έχει πολλά πλεονεκτήματα τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι τα εξής.

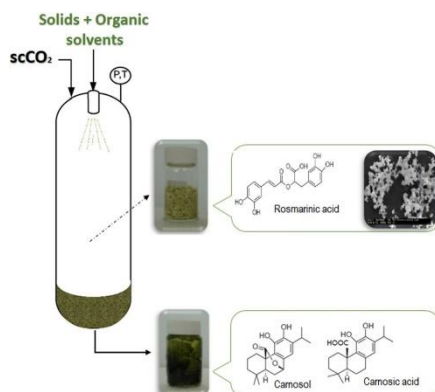
- Οι χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς για παράδειγμα το CO<sub>2</sub>, όπως προαναφέρθηκε, μεταβαίνει στην υπερκρίσιμη κατάσταση σε θερμοκρασία λίγο μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία δωματίου, αποφεύγοντας έτσι την πιθανή αποικοδόμηση θερμικά ασταθών ενώσεων [Reverchon & Senatore, 1992].
- Η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει σε αντίθεση με την συμβατική εκχύλιση με διαλύτη. Επομένως, με μεταβολή της διαλυτοποίησης του υπερκρίσιμου ρευστού, είτε χημικά είτε φυσικά, είναι δυνατή η κλασματική εκχύλιση (Fr-SFE) διαφορετικών κατηγοριών ενώσεων με παρόμοιες πολικότητες από την μήτρα ενός φυτού [Bicchi et al., 2000].
- Η ταχύτητα της μεθόδου, λόγω του χαμηλού ιξώδους, του υψηλού συντελεστή διάχυσης και της ρυθμιζόμενης ισχύος των υπερκρίσιμων ρευστών ως διαλύτες [Prado et al., 2015].
- Η δυνατότητα εφαρμογής της και σε βιομηχανική κλίμακα εκτός της εργαστηριακής. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με σκοπό την αναβάθμιση παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων [Ciftci, 2012].
- Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό θεωρείται τεχνολογία φιλική προς το περιβάλλον καθώς χρησιμοποιούνται είτε μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη ως συνδιαλύτη για καλύτερα αποτελέσματα είτε και καθόλου οργανικός διαλύτης [Quintana et al., 2019]. Το CO<sub>2</sub>, το οποίο και χρησιμοποιείται πιο συχνά σε αυτή την μέθοδο εκχύλισης, εξατμίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται επιπλέον διαχωρισμός του από το εκχύλισμα [Azwanida, 2015]. Η απομάκρυνση του από το εκχύλισμα, γίνεται απλά μειώνοντας την πίεση του συστήματος ή ρυθμίζοντας την θερμοκρασία και έτσι το CO<sub>2</sub> δύναται να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί. Η ανακυκλοφορία του SF στο σύστημα, συμβάλλει στη

θεώρηση ότι είναι μια «πράσινη» τεχνολογία καθώς κατά αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιείται η παραγωγή αποβλήτων [Prado et al., 2015].

- Το CO<sub>2</sub> διατίθεται εύκολα με χαμηλό κόστος δεν είναι εύφλεκτο και έχει χαμηλή τοξικότητα [Azwanida, 2015; Sielfeld et al., 2019].
- Είναι κατάλληλη για την παραγωγή νανοσωματιδίων βιοδραστικών ενώσεων αντικαθιστώντας μεθόδους όπως η λυοφιλίωση ή η ψύξη με ψεκασμό (Spray chilling) όπου παράγονται σωματίδια με ευρεία κατανομή μεγέθους (PSD) και είναι πιθανή και κάποια αποικοδόμηση του προϊόντος λόγω μηχανικών ή θερμικών τάσεων [Quintana et al., 2019].

Σημαντικό όμως μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το πάγιο κόστος του εξοπλισμού είναι πολύ υψηλό καθώς και η απαίτηση πολύ υψηλών πιέσεων [Azwanida, 2015].

Η εκχύλιση με SC-CO<sub>2</sub> βιοδραστικών ενώσεων από δεντρολίβανο έχει διερευνηθεί αρκετά. Τα προκύπτοντα εκχυλίσματα δεντρολίβανου μπορεί να έχουν ακόμη και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκχυλίσματα που προκύπτουν με οργανικούς διαλύτες, όπως προέκυψε στην μελέτη των Bicchi et al. (2000), όπου συγκρίθηκαν εκχυλίσματα που προέκυψαν με εκχύλιση Soxhlet (με και χωρίς ενεργό άνθρακα), με εκχύλιση με υπερήχους (με και χωρίς ενεργό άνθρακα) και με υπερκρίσιμη εκχύλιση. Η απόδοση σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη βρέθηκε υψηλότερη στην περίπτωση της SFE. Παρόλα αυτά η σύσταση του εκχυλίσματος και κατά συνέπεια οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό και από τις συνθήκες εκχύλισης και όχι μόνο από την μέθοδο [Sielfeld et al., 2019].



Εικόνα 12. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> και κλασμάτωση εκχυλισμάτων

Ένα σαφές πλεονέκτημα της εκχύλισης SC-CO<sub>2</sub> είναι ότι επιτρέπει την κλασμάτωση του δεντρολίβανου και κατ' αυτό τον τρόπο επιτρέπεται η λήψη εκχυλισμάτων με αυξημένη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και μειωμένη περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά. Για τον κλασματικό διαχωρισμό εκχυλίσματος δεντρολίβανου χρησιμοποιείται SC-CO<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 40–60 °C και πίεση 30–35 MPa, μαζί με συνδιαλύτη 2–7% αιθανόλη. Τα πτητικά κλάσματα εκχυλίζονται πρώτα και καθιζάνουν σε δεύτερο διαχωριστή. Ωστόσο, η συνέχιση της εκχύλισης προκαλεί τη συν-καθίζηση κάποιων αντιοξειδωτικών ενώσεων, χαμηλότερης διαλυτότητας, επίσης στο δεύτερο διαχωριστή [Sielfeld et al., 2019]. Στην κλασματική εκχύλιση, η εκχύλιση των πτητικών σε μέτρια πίεση 10-15 MPa ακολουθείται από εκείνη των αντιοξειδωτικών που προκύπτει από την αύξηση της ισχύος διαλύτη του SC-CO<sub>2</sub> αυξάνοντας την πίεση εκχύλισης στα 30-40 MPa, αυξάνοντας τη θερμοκρασία εκχύλισης στους 100°C [Ivanović et al., 2009] προσθέτοντας 5-10% ενός πολικού συνδιαλύτη όπως η αιθανόλη, ή με έναν συνδυασμό αυτών των παραγόντων [Sielfeld et al., 2019]. Η προσέγγιση της



κλασμάτωσης εφαρμόστηκε επιτυχώς στην εκλεκτική εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από αποξηραμένα φύλλα δενδρολίβανου που μελέτησαν οι Bicchi et al. (2000), όπου προέκυψε ένα κλάσμα πτητικών ουσιών, ένα φαινολικών διτερπενίων και ένα κλάσμα ροσμαρινικού οξέος.

Οι Reverchon και Senatore (1992) μελέτησαν την εκχύλιση φύλλων δεντρολίβανου με SC-CO<sub>2</sub> σε εύρος συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης αντίστοιχα 35–60 °C και 8–15 MPa και διαπίστωσαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ήταν οι 40 °C και τα 10 MPa. Εν συνεχεία, επιχείρησαν κλασμάτωση του εκχυλίσματος επιτυγχάνοντας επιλεκτική καταβύθιση των ανεπιθύμητων φυτικών κηρών σε έναν πρώτο διαχωριστή, ο οποίος λειτούργησε στους 10 °C με πίεση 8 MPa, και την ανάκτηση του πτητικού κλάσματος σε ένα δεύτερο διαχωριστή ο οποίος λειτούργησε στους 0 °C με πίεση ίση με 2,5 MPa. Το πτητικό κλάσμα είχε αυξημένη περιεκτικότητα σε οξυγονωμένα μονοτερπένια, μειωμένη περιεκτικότητα σε μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και έντονο άρωμα, που θυμίζει αυτό του φυτού, σε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο που προκύπτει από υδρό-απόσταξη.

### Εκχύλιση με ιοντικά υγρά (Extraction with ionic liquids)

Τα ιοντικά υγρά είναι άλατα με σημεία τήξης κάτω των 100 °C και αποτελούνται από ένα οργανικό κατιόν και ένα ανόργανο ανιόν. Σπάνια το ανιόν μπορεί να είναι και οργανικής προέλευσης [Stark et al., 2010]. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα οργανικά κατιόντα είναι άλατα διαλκυλο-ιμιδαζολίου, N-αλκυλοπυριδινίου ή τετρα-αλκυλο-αμμωνίου, ενώ τα ανόργανα ανιόντα είναι συνήθως μονοπυρηνικά ιόντα όπως: Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, [HSO<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, [BF<sub>4</sub>]<sup>-</sup> ή [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup>. Τα ιοντικά υγρά είναι εναλλακτικοί πράσινοι διαλύτες που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τους πτητικούς οργανικούς διαλύτες λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως η αμελητέα τάση ατμών, η μη αναφλεξιμότητα και η καλή διαλυτότητα με οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Ως διαλύτες είναι πολλά υποσχόμενα για την εκχύλιση διαφόρων χρήσιμων ουσιών από δείγματα φυτών όπως αλκαλοειδή, σιλβένιο, προανθοκυανιδίνες, κινίνες, λιγνάνες, κουμαρίνες και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η δομή των ιοντικών υγρών έχει σημαντική επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, και επομένως αναμένεται να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα εκχύλισης των ενώσεων. Η ταυτότητα των ανιόντων θεωρείται η πιο σημαντική και επηρεάζει περισσότερο τις ιδιότητες του ιοντικού υγρού [Zu et al., 2012]. Τα ουδέτερα ιοντικά υγρά είναι συνήθως πιο ιξώδη από τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες [Μαρούλης, Χατζηαντωνίου και Τσιτσιριδάκη, 2012].

Τα ιοντικά υγρά αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, με αποτέλεσμα να μην έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με την τοξικότητα και την περιβαλλοντική επιβάρυνση που ενδεχομένως αυτά να προκαλούν. Επιπρόσθετα, το κόστος τους είναι πολύ υψηλό σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες. Η διαφορά αυτή μπορεί να ελαττωθεί εάν ληφθούν υπόψη η δυνατότητα ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης αλλά και η εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν αυτά. Επιπλέον, επειδή τα περισσότερα ιοντικά υγρά είναι ιδιαίτερα σύνθετα, η σταθερότητα τους δεν μπορεί να προβλεφθεί εύκολα. Τέλος, όσον αφορά την εκχύλιση πολλές φορές είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός συνδιαλύτη, ο οποίος είναι μη αναμίξιμος με το ιοντικό υγρό και ολικά αναμίξιμος με το επιθυμητό προϊόν ή το αντίθετο [Μαρούλης Χατζηαντωνίου και Τσιτσιριδάκη, 2012].

Σε μελέτη των Zu et al. (2012) εφαρμόστηκε επιτυχώς η εκχύλιση καρνοσοικού και ροσμαρινικού οξέος, από το φυτό *Rosmarinus officinalis* με υπερήχους με διαλύτες ιοντικά υγρά. Οκτώ ιοντικά υγρά, με διαφορετικά κατιόντα και ανιόντα, διερευνήθηκαν σε αυτή τη μελέτη και το [C<sub>8</sub>mim]Br επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος διαλύτης. Η προτεινόμενη προσέγγιση αποδείχθηκε ότι έχει υψηλότερη απόδοση, μικρότερο χρόνο εκχύλισης και είναι μια νέα εναλλακτική λύση για την αντικατάσταση των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης.



## Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (Pressurized liquid extraction, PLE)

Η εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (Pressurized liquid extraction, PLE) είναι μία από τις πιο υποσχόμενες μεθόδους στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων και αναφέρεται στη βιβλιογραφία επίσης με τις εξής ονομασίες:

- Pressurized solvent extraction
- Accelerated solvent extraction
- High-pressure solvent extraction
- High-pressure, high-temperature solvent extraction
- Pressurized hot solvent extraction
- Subcritical solvent extraction
- Enhanced solvent extraction

Στην PLE, οι διαλύτες χρησιμοποιούνται κοντά στην υπερκρίσιμη περιοχή τους, όπου λόγω των υψηλών θερμοκρασιών η διαλυτότητα και οι ρυθμοί διάχυσης είναι πιο υψηλοί. Συγχρόνως λόγω της υψηλής πίεσης, ο διαλύτης παραμένει υγρός αφού βρίσκεται κάτω από το σημείο βρασμού του, επιτρέποντας έτσι καλύτερη διείσδυση στο δείγμα. Συγκεκριμένα, αυτή η μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού διεξάγεται σε θερμοκρασίες από 50 έως και 200 °C και πιέσεις από 50 έως και 300 psi για μικρές χρονικές περιόδους (5–10 min) [Duarte et al., 2014]. Αυτή η μέθοδος απαιτεί μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών και μεγάλη ποσότητα νερού, παρέχοντας συγχρόνως υψηλή απόδοση εκχύλισης [Duarte et al., 2014; Picó, 2017]. Θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον τεχνική λόγω της παραγωγής μικρής ποσότητας αποβλήτων και είναι οικονομικότερη και ταχύτερη από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης [Picó, 2017].

Σε μελέτη των Herrero et al. (2010) που αφορούσε την εκχύλιση δεντρολίβανου με φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους διαπιστώθηκε ότι η εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (PLE) χρησιμοποιώντας αιθανόλη ή νερό ως διαλύτες σε υψηλές (200 °C) ή ήπιες θερμοκρασίες (100 °C), αντίστοιχα, παρείχε τα καλύτερα αποτελέσματα, σε σχέση με την εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (CO<sub>2</sub>). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την απόδοση εκχύλισης φαινολικών (≈40%) αλλά και την ποσότητα των αντιοξειδωτικών που εκχυλίζονται (EC<sub>50</sub>=8,8 μg/mL).

Σε συγκριτική μελέτη των Anaëlle et al. (2013) πραγματοποιήθηκε εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από θαλάσσια φύκη *Sargassum muticum* με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> και με συμπιεσμένο υγρό. Η SC-CO<sub>2</sub> διεξήχθη σε θερμοκρασία 60 °C και πίεση 15,2 MPa για 90 min, χρησιμοποιώντας 12% αιθανόλη ως συνδιαλύτη. Η PLE, πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης 120 °C και 10,3 MPa. Η χρονική διάρκεια της εκχύλισης ήταν 20 min και χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ένα μείγμα αιθανόλης:νερού (75:25). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η PLE είναι πιο αποτελεσματική από την SFE για την εκχύλιση πολυφαινολών, δεδομένου ότι η SFE δεν εκχυλίζει το σύνολο των δραστικών φαινολικών ενώσεων.

## Εκχύλιση υποβοηθούμενη από παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed electric field assisted extraction, PEF assisted extraction)

Η τεχνολογία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) μπορεί να εφαρμοστεί για την εκχύλιση επιθυμητών ουσιών. Κατατάσσεται στις μη θερμικές τεχνολογίες και στοχεύει στην ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου υψηλής έντασης στο τρόφιμο. Έτσι αυξάνεται η διαπερατότητα του κυττάρου δημιουργώντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η εκχύλιση, σε θερμοκρασίες

περιβάλλοντος [Bozinou et al., 2019]. Κάποιες από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που θα εφαρμοστεί, ο αριθμός των παλμών, ο χρόνος εφαρμογής αυτών και η σύσταση του διαλύτη εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η ένταση ηλεκτρικού πεδίου PEF, είναι ανάλογη της απόδοσης εκχύλισης [Boussetta et al., 2014]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η επεξεργασία με PEF μπορεί να βελτιώσει την απόδοση εκχύλισης υδατοδιαλυτών φυσικών χρωστικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων όπως πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες, ενώ υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με επίδραση της τεχνολογίας PEF στην εκχύλιση μη πολικών ενώσεων [Pataro et al., 2018].

Ως μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα και συγκεκριμένα εμφανίζει βελτιωμένη απόδοση, μειωμένο χρόνο επεξεργασίας, μείωση της υποβάθμισης των θερμοευαίσθητων ενώσεων, μείωση του ενεργειακού κόστους αλλά και των περιβαλλοντικών επιπτώσεων [Bozinou et al., 2019]. Αναφέρεται επίσης η δυνατότητα εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από ένα ευρύ φάσμα υποπροϊόντων επεξεργασίας τροφίμων, όπως οι φλούδες ντομάτας [Pataro et al., 2018].

Οι Bozinou et al. (2019) μελέτησαν την εφαρμογή παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) για την παραγωγή εκχυλισμάτων από το φυτό *Moringa oleifera*. Για λόγους σύγκρισης πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις και με άλλες μεθόδους και συγκεκριμένα με μικροκύματα και υπερήχους, αλλά και εκχυλίσεις με θερμό νερό καθώς και απλή διαβροχή με νερό. Η μεγαλύτερη ποσότητα ολικών φαινολών (40,24 mg GAE/g Dry Matter) εκχυλίστηκε με εφαρμογή PEF, με παλμούς διάρκειας (PD) 20 msec και εύρος παλμών (PI) 100 msec για 40 min. Επιπρόσθετα, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων ήταν ανάλογη με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο τους, οπότε η μεγαλύτερη (98,31%) σημειώθηκε στο ίδιο πείραμα PEF, ενώ η μικρότερη στο πείραμα όπου η εκχύλιση έγινε με διαβροχή.

### Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme assisted extraction, EAE)

Τα ένζυμα είναι ιδανικοί καταλύτες για την εκχύλιση ή την τροποποίηση σύνθετων βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης [Puri et al., 2012]. Έτσι, η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων που πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμων αποτελεί μια πιθανή εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης καθώς θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν αντιδράσεις με εξαιρετική εξειδίκευση και να λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες επεξεργασίας σε υδατικά διαλύματα [Puri et al., 2012; Xu et al., 2017]. Ένζυμα όπως πηκτινάσες, κυτταρινάσες και ημικυτταρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτά. Αυτά τα ένζυμα υδρολύουν τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος όπως η κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες (ξυλογλυκάνες), η πηκτίνη και διάφορες πρωτεΐνες, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα του και επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων [Puri et al., 2012; Miron et al., 2013; Xu et al., 2017]. Σε μελέτες αναφέρεται ότι τα ένζυμα βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα εκχύλισης αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών, των ανθοκυανινών και των καρροτενοειδών [Xu et al., 2017]. Συγκεκριμένα, σχετικά με τις φαινολικές ενώσεις αυτές συνδέονται με πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Ως εκ τούτου, οι κυτταρινάσες, οι ημικελλουλάσες, οι πηκτινάσες καθώς και άλλα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καταλύσουν την υδρόλυση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος, επιτρέποντας έτσι την πιο αποτελεσματική εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων [Miron et al., 2013].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση (Enzyme Assisted Extraction, EAE) είναι οι ακόλουθοι:

- το είδος και η συγκέντρωση του ενζύμου
- το pH του συστήματος
- η θερμοκρασία
- ο χρόνος της εκχύλισης
- η αναλογία ενζύμου/υποστρώματος
- το είδος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη
- το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος

Πιο αναλυτικά, διαφορετικά ένζυμα αποικοδομούν διαφορετικά υποστρώματα και η συγκέντρωσή τους επηρεάζει την αποτελεσματικότητα εκχύλισης. Επιπλέον, το pH της ενζυμικής υδρόλυσης ποικίλλει από ένζυμο σε ένζυμο. Το pH επηρεάζει όχι μόνο τη δράση του ενζύμου, αλλά και τη διάσπαση ορισμένων βιοδραστικών συστατικών όπως οι ανθοκυανίνες. Εκτός αυτού, η αναλογία υγρού/στερεού, η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης είναι παράγοντες που δεν πρέπει να παραμεληθούν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Επομένως, οι βέλτιστες παράμετροι εκχύλισης διαφέρουν ανάλογα το φυτικό υλικό και το ένζυμο [Xu et al., 2017].

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η μείωση του χρόνου εκχύλισης, η αυξημένη απόδοση, η μειωμένη χρήση διαλύτη και η χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας σε σύγκριση με μη ενζυμικές μεθόδους. Παρόλα αυτά το κόστος των ενζύμων είναι σχετικά υψηλό για την επεξεργασία μεγάλου όγκου πρώτων υλών. Επιπλέον, τα επί του παρόντος διαθέσιμα παρασκευάσματα ενζύμων δεν μπορούν να υδρολύσουν πλήρως τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, περιορίζοντας τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων. Τέλος, η εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα διότι η συμπεριφορά των ενζύμων είναι πιθανό να διαφοροποιείται, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η εκχύλιση. Ωστόσο, εάν μπορέσουν να ξεπεραστούν οι παραπάνω περιορισμοί, τότε με την ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση θα μπορούσαν να παραχθούν εκχυλίσματα με μεγαλύτερες αποδόσεις εκχύλισης, αλλά και με βελτιωμένη ποιότητα λόγω των πιο ήπιων συνθηκών επεξεργασίας (π.χ. χαμηλότερες θερμοκρασίες εκχύλισης) [Puri et al., 2012].

Σε μελέτη των Miron et al. (2013) για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*) πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υποβοηθούμενες από ένζυμο (EAE) και εκχυλίσεις με συμπιεσμένο υγρό (PLE). Η κυτταρινάση, η ενδο-β-1,4 ξυλανάση και η πηκτινάση μελετήθηκαν προκειμένου να αποικοδομηθεί το κυτταρικό τοίχωμα των φύλλων του φυτού και να απελευθερωθούν οι φαινολικές του ενώσεις. Για να συγκριθεί η απόδοση που επιτεύχθηκε με την EAE, εφαρμόστηκε PLE με νερό και αιθανόλη σε θερμοκρασία εκχύλισης ίση με 150 °C. Τα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα και την συνολική περιεκτικότητα τους σε φαινόλες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η EAE, και συγκεκριμένα ένα μείγμα ενζύμων (κυτταρινάση, ενδο-1,4-β-ξυλανάση και πηκτινάση), ενίσχυσε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σε σύγκριση με ένα εκχύλισμα που παράχθηκε χωρίς την βοήθεια ενζύμου (Non-enzymatic control). Παρόλα αυτά με την μέθοδο PLE τα εκχυλίσματα παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ( $EC_{50} = 8.09 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ ) και η ποσότητα φαινολών ήταν υψηλότερη (193,18 mg GA/g εκχυλίσματος) από τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με EAE. Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι οι μέθοδοι EAE και PLE μπορούν να χρησιμοποιηθούν έναντι των συμβατικών για την εκχύλιση φυσικών ενώσεων με βιολογική δραστηριότητα από φυσικές πηγές, με την PLE να είναι πιο εκλεκτική όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις.

Επιπλέον, ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της εκχύλισης φλαβονοειδών από φυτικά υλικά ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τη χρήση διαλυτών και θερμότητας.

Συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαταράξουν το σύμπλεγμα πηκτίνης-κυτταρίνης στη φλούδα εσπεριδοειδών και να ενισχύσουν την εκχύλιση φλαβονοειδών όπως η ναρινγίνη (naringin) [Puri et al., 2012].

### Διαλύτες εκχύλισης

Οι διαλύτες εκχύλισης επιλέγονται με βάση τα εξής χαρακτηριστικά:

- την πολικότητα
  - το σημείο βρασμού, το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό για να διευκολύνεται η απομάκρυνση του διαλύτη από το προϊόν μετέπειτα.
  - την λανθάνουσα θερμότητα εξάτμισης.
  - τη δραστικότητα - ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με το εκχύλισμα, ούτε πρέπει να αποσυντίθεται εύκολα.
  - το ιξώδες, το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό.
  - τη σταθερότητα στη θερμότητα, το οξυγόνο και το φως.
  - την ασφάλεια κατά τη χρήση - ο διαλύτης πρέπει, εάν είναι δυνατόν, να μην είναι εύφλεκτος και δεν πρέπει να παρουσιάζει κίνδυνο τοξικότητας
  - τη διάθεσή του, η οποία δεν πρέπει να θέτει σε κίνδυνο το περιβάλλον
  - τη διαθεσιμότητα του σε σημαντικές ποσότητες.
  - το κόστος
  - τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης [Albu et al., 2004].

Η επιλογή του διαλύτη σχετίζεται κυρίως με τη μελλοντική χρήση του εκχυλίσματος. Τα υδατικά εκχυλίσματα, τα οποία είναι πλούσια σε RA, χρησιμοποιούνται ως αντιοξειδωτικά σε υδρόφιλα συστήματα, ενώ, σε λιπόφιλα συστήματα, χρησιμοποιούνται τα αιθανολικά εκχυλίσματα, τα οποία είναι πλούσια σε καρνοσικό οξύ [Rodríguez-Rojo et al., 2012].

Στον πίνακα 4 γίνεται μια αναφορά των ομάδων των βιοδραστικών συστατικών που δύναται να εκχυλίσει ο εκάστων διαλύτης.

Πίνακας 4. Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών με διαφορετικούς διαλύτες [Azmir et. al., 2013]

Νερό	Αιθανόλη	Μεθανόλη	Χλωροφόρμιο	Διχλωρομεθάνιο	Αιθέρας	Ακετόνη
Ανθοκυάνες	Ταννίνες	Ανθοκυάνες	Τερπενοειδή	Τερπενοειδή	Αλκαλοειδή	Φλαβονοειδή
Ταννίνες	Φλαβονόλες	Τερπενοειδή	Φλαβονοειδή		Τερπενοειδή	
Σαπωνίνες	Τερπενοειδή	Σαπωνίνες				
Τερπενοειδή	Αλκαλοειδή	Ταννίνες				
		Φλαβόνες				

Ανάλογα τον διαλύτη εκχύλισης η σύσταση του εκχυλίσματος σε πολυφαινόλες διαφέρει. Από την έρευνα των Moreno et al. (2006) διαπιστώθηκε ότι τα μεθανολικά και τα ακετονικά εκχυλίσματα περιείχαν κυρίως ροσμαρινικό οξύ, καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ και η συνολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε αυτές τις πολυφαινόλες ήταν 52,2% και 36,5% αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, τα υδατικά εκχυλίσματα περιείχαν μόνο ροσμαρινικό οξύ σε περιεκτικότητα ίση με 14,5%. Τα παραπάνω φαίνονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος (RA), καρνοσικού οξέος (CA) καρνοσόλης (COH) και περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες σε διαφορετικά εκχυλίσματα [Moreno et al., 2006]

Εκχύλισμα	Περιεκτικότητα των ενώσεων (g/100 g εκχυλίσματος)			Περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες (g GAE/100 g εκχυλίσματος)
	RA	CA	COH	
Ακετονικό	4.0 ± 0.4	21.5 ± 2.1	11.0 ± 1.1	19 ± 8
Μεθανολικό	5.5 ± 0.5	30.5 ± 3.0	16.2 ± 1.6	12 ± 5
Υδατικό	14.5 ± 1.4	NF	NF	3 ± 2

Για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών με συμβατικές τεχνικές εκχύλισης η μεθανόλη θεωρείται από μερικούς ερευνητές καλύτερος διαλύτης από την αιθανόλη [Paniwnyk et al., 2009]. Εκτός της μεθανόλης και η ακετόνη αποτελεί διαλύτη που χρησιμοποιείται συχνά για την εκχύλιση τους, λόγω της χημικής δομής των αντιοξειδωτικών ουσιών, CA και RA. Σε πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι διαλύτες όπως η αιθανόλη, το νερό ή μείγματα αυτών κατά κύριο λόγο εξαιτίας της αναγνώρισης τους ως ασφαλείς διαλύτες (GRAS-generally recognized as safe) [Jacotet-Navarro et al., 2015]. Ωστόσο, σε μελέτη των Paniwnyk et al. (2009) τα αιθανολικά εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά από εκχύλιση με υπερήχους περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα σε καρνοσικό οξύ (6.41 mg/g) συγκριτικά με τα μεθανολικά (4.27 mg/g), πράγμα το οποίο υποδηλώνει ότι η αιθανόλη θα μπορούσε να είναι ένας καλός διαλύτης για εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών με χρήση υπερήχων.

Ανάλογα το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στην εκχύλιση, η τελευταία έχει και διαφορετική απόδοση σε πολυφαινόλες. Στο εκχύλισμα των φύλλων η ποσότητα των τριών πολυφαινολών, ροσμαρινικού οξέος, καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος, αντιστοιχούσε στο 45,7% του εκχυλίσματος, ενώ στο εκχύλισμα από τα άνθη του φυτού αντιστοιχούσαν 26,9% του ξηρού βάρους σε αυτές τις ενώσεις όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 [Moreno et al., 2006].

Πίνακας 6. Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος (RA), καρνοσόλης (COH) και καρνοσικού οξέος (CA) σε εκχυλίσματα από φύλλα, άνθη και κλαδιά δεντρολίβανου με χρωματογραφία HPLC [Moreno et al., 2006]

Ένωση	R <sub>time</sub> (min)	Απόδοση (g/100 g εκχυλίσματος) από		
		φύλλα	Άνθη	κλαδιά
RA	19	7.9 ± 0.8	4.6 ± 0.5	0.1 ± 0.1
COH	37	8.5 ± 0.8	8.7 ± 0.9	NF
CA	43	29.3 ± 2.9	13.6 ± 1.3	NF

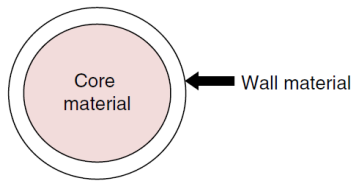
## Ενεργειακή κατανάλωση

Αναφορικά με την κατανάλωση ενέργειας των τεχνολογιών εκχύλισης σύμφωνα με τους Jacotet-Navarro et al. (2015) οι χαμηλότερες τιμές παρουσιάζονται με την εκχύλιση με υπερήχους, όταν αυτή εφαρμόζεται για 30 min. Αντίθετα, η εκχύλιση με μικροκύματα είχε μικρή διαφοροποίηση στην κατανάλωση ενέργειας συγκριτικά με την συμβατική εκχύλιση με διαλύτη (heat reflux extraction-HRE). Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη με την χρήση στελέχους υπερήχων η ενεργειακή κατανάλωση ήταν 23 kWh/kg εκχυλίσματος και η εκπομπές άνθρακα ήταν 19 kg CO<sub>2</sub>/kg εκχυλίσματος ενώ με την συμβατική εκχύλιση καταναλώθηκαν 850 kWh/kg εκχυλίσματος και κατά συνέπεια ήταν η εκχύλιση με τις υψηλότερες εκπομπές άνθρακα (680 kg CO<sub>2</sub>/kg εκχυλίσματος). Επιπλέον, με το λουτρό υπερήχων η ενεργειακή κατανάλωση αντιστοιχούσε σε 15 kWh/kg εκχυλίσματος και οι εκπομπές άνθρακα έφταναν μόλις τα 12 kg CO<sub>2</sub>/kg εκχυλίσματος. Στην συγκεκριμένη μελέτη συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ των τεχνικών εκχύλισης φαίνεται ότι η εκχύλιση καρνοσικού και ουρσολικού οξέος ενισχύεται με τη χρήση υπερήχων, ενώ τα μικροκύματα δίνουν καλύτερα αποτελέσματα στην εκχύλιση ροσμαρινικού οξέος. Συγκεκριμένα το περιεχόμενο σε καρνοσικό οξύ στην περίπτωση της εκχύλισης με στέλεχος υπερήχων βρέθηκε ίσο με 15,4 ± 1,8 mg/g ενώ με την συμβατική εκχύλιση ήταν 13,2 ± 0,2 mg/g.



## Κεφάλαιο 3: Μορφοποίηση βιοδραστικών συστατικών

### Ορισμός Μικροεγκλεισμού



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση μιας μικροκάψουλας

Ως μικροεγκλεισμός ή μικροενθυλάκωση (Microencapsulation) καλείται η διεργασία κατά την οποία ένα υλικό ή ένα μίγμα υλικών επικαλύπτεται από ένα άλλο υλικό. Το επικαλυπτόμενο υλικό ονομάζεται ενεργό υλικό ή πυρήνας (core material) και μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή και αέριο. Το υλικό επικάλυψης ονομάζεται φορέας ή παράγοντας εγκλεισμού (wall material). Η αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού

επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων του φορέα εγκλεισμού, των χαρακτηριστικών του γαλακτώματος που αποτελεί την τροφοδοσία, του είδους και των συνθηκών της διεργασίας μικροεγκλεισμού. Επιπλέον, η σύνθεση και οι ιδιότητες του φορέα επικάλυψης, ο λόγος της πυκνότητας του υλικού που εγκλείεται προς τον φορέα εγκλεισμού (core:wall), το ιξώδες και η διασπορά του υλικού τροφοδοσίας και οι συνθήκες αποθήκευσης επηρεάζουν την μικροδομή των μικροκαψουλών που παράγονται [Carvalho et al., 2016]. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται στον μικροεγκλεισμό, με τα βασικά πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους, δίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Μέθοδοι μικροεγκλεισμού : Μέγεθος μικροσωματιδίων, Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί [Carvalho et al., 2016]

Τεχνική μικροεγκλεισμού	Διάμετρος μικροσωματιδίων (μm)	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
Απλή συσσωμάτωση (Simple coacervation)	20-200	Υψηλή απόδοση εγκλεισμού	Υψηλό κόστος μεθόδου
Σύνθετη συσσωμάτωση (Complex coacervation)	5-200	Αποτελεσματικός έλεγχος του μεγέθους των σωματιδίων	Συσσωμάτωση σωματιδίων Δυσκολίες σε βιομηχανική κλίμακα Εξάτμιση πτητικών συστατικών Οξείδωση του τελικού προϊόντος Πιθανότητα διάλυσης της βιοδραστικής ένωσης στον διαλύτη
Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)	1-1000	Απλή μέθοδος Ταχεία μέθοδος Χαμηλό κόστος μεθόδου Δυνατότητα σε βιομηχανική κλίμακα	μη ομοιόμορφα σωματίδια Απαίτηση περαιτέρω επεξεργασίας Απώλεια κάποιων πτητικών αρωματικών συστατικών
Ψεκασμός με ψύξη (Spray chilling)	20-200	Κατάλληλο για υδατοδιαλυτά υλικά	Υψηλό κόστος επεξεργασίας ειδικές συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης

<b>Εγκλεισμός με ρευστοστερεά κλίνη (Fluid bed spray coating)</b>	>100	Χαμηλό λειτουργικό κόστος  Διαδικασία υψηλής θερμικής απόδοσης  Έλεγχος συνολικής θερμοκρασίας	Μεγάλος χρόνος διεργασίας
<b>Γαλακτωματοποίηση (Emulsification)</b>	0.1-100	Μικρά σταγονίδια  Περιορισμένη κατανομή μεγέθους σωματιδίων  Κατάλληλο για βιοδιασπώμενα και μη μικροσωματίδια και ένα ευρύ φάσμα υγρών και στερεών υλικών πυρήνα	Χαμηλή αποτελεσματικότητα εγκλεισμού  Παραγωγή μεγάλου όγκου υπολειμματικού διαλύτη  Υψηλό κόστος μεθόδου
<b>Επιφανειακός πολυμερισμός (interfacial polymerization)</b>	0.5-1000	Δυνατότητα σε μεγάλη κλίμακα  Ταχεία  Υψηλή απόδοση εγκλεισμού	Δυσχερής έλεγχος  Παραγωγή μεγάλου όγκου υπολειμματικού διαλύτη  Πιθανή παραγωγή μη βιοαποδομήσιμων και/ή μη βιοσυμβατών μονομερών

Η βιομηχανία χρησιμοποιεί την τεχνολογία του μικροεγκλεισμού για πολλούς λόγους και συγκεκριμένα :

- Για την προστασία ευαίσθητων θρεπτικών συστατικών από τις συνθήκες επεξεργασίας και το περιβάλλον.
- Για τον ευκολότερο χειρισμό λόγω του εγκλεισμού των ενεργών συστατικών σε ένα πλέγμα πολυμερών.
- Για την ελεγχόμενη απελευθέρωση κάποιων συστατικών (π.χ. πρόσθετα τροφίμων) στον γαστρεντερικό σωλήνα.
- Για την κάλυψη δυσάρεστης γεύσης κάποιου θρεπτικού συστατικού.
- Για την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών και την αύξηση της επιφάνειας επαφής.
- Για την μείωση της επίδρασης ισχυρών συστατικών πυρήνα με την ένταξη του φορέα εγκλεισμού [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015].

#### Επικαλυπτόμενο υλικό ή πυρήνας

Ο πυρήνας (core) της κάψουλας εφόσον είναι σε υγρή μορφή μπορεί να απαντάται από διασκορπισμένα είτε διαλυμένα συστατικά είτε από γαλακτώματα αυτών. Ένας συμπαγής πυρήνας μπορεί να είναι ένα μίγμα δραστικών συστατικών, σταθεροποιητών, αραιωτικών, και επιβραδυντών ή επιταχυντών του ρυθμού απελευθέρωσης. Η φύση του βασικού συστατικού που αποτελεί τον πυρήνα καθορίζει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος της διαδικασίας εγκλεισμού σε κάψουλα. Ουσιαστικά καθορίζει την μορφολογία του και την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού. Αυτά, με τη σειρά τους, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαλυτότητα και της ελεγχόμενη απελευθέρωση. Έτσι, με βάση τον τρόπο τοποθέτησης του

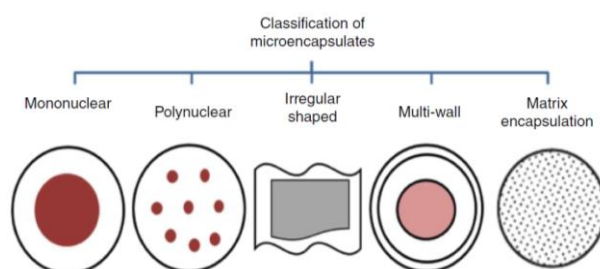
πυρήνα εντός του φορέα εγκλεισμού, οι μικροκάψουλες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

▪Μονοπύρηνες κάψουλες: Ο πυρήνας περιέχεται μέσα σε μια καθορισμένη μεμβράνη κελύφους και καταλαμβάνει το 10-90% του όγκου της κάψουλας. Σε αυτόν τον τύπο, ο πυρήνας είναι συνήθως σε υγρή μορφή.

▪Πολυπύρηνες κάψουλες: Εδώ, το κέλυφος περικλείει πολλές μονάδες πυρήνων μέσα σε αυτό. Αυτός ο τύπος μικροκάψουλας είναι αποτέλεσμα μικροεγκλεισμού ειδικά όταν ένα στάδιο γαλακτωματοποίησης προηγείται αυτής της διαδικασίας.

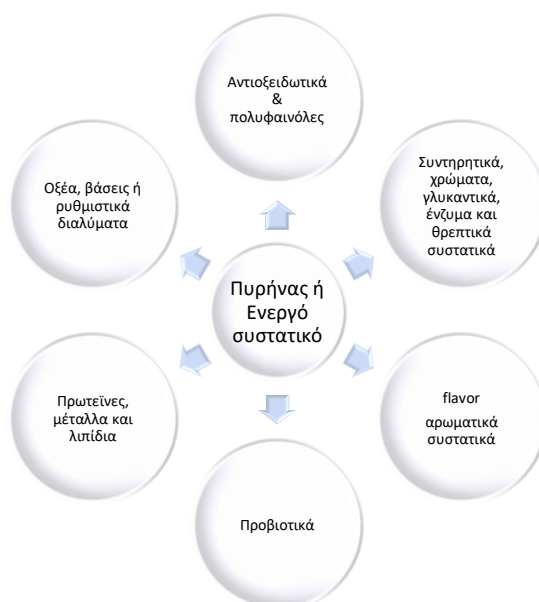
▪Κάψουλες τύπου εγκλεισμού μήτρας: Ο πυρήνας κατανέμεται ομοιογενώς μέσα στο κέλυφος. Αυτός είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος μορφολογίας μικροκαψουλών [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015].

Στην Εικόνα 14 γίνεται μια πιο αναλυτική ταξινόμηση των ειδών μικροκάψουλας.



Εικόνα 14. Ταξινόμηση μικροκαψουλών: Μονοπύρηνες, πολυπύρηνες, ακανόνιστου σχήματος, πολλαπλών τοιχωμάτων, εγκλεισμός μήτρας [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]

Οι κατηγορίες δραστικών ουσιών που συνήθως αποτελούν το βασικό συστατικό ενός συστήματος που υφίσταται μικροεγκλεισμό απεικονίζονται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15. Συνήθη ενεργά συστατικά σε μικροκάψουλες [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]

## Φορείς εγκλεισμού

Ως φορείς εγκλεισμού χρησιμοποιούνται μια ποικιλία πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και λιπιδίων είτε μόνα είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Τα υλικά που επιλέγονται για τον σκοπό αυτό είναι εύκαμπτα, άοσμα, ουδέτερα σε γεύση, μη υγροσκοπικά και έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού φιλμ. Επιπλέον, είναι επιθυμητό να είναι είτε διαλυτά σε υδατικούς διαλύτες είτε να έχουν δυνατότητα μεταβολής της φάσης τους (π.χ. τήξη ή μετατροπή σε γέλη). Άλλα πρόσθετα, όπως γαλακτωματοποιητές ή πλαστικοποιητές, μερικές φορές συμπεριλαμβάνονται στη σύνθεση για να βελτιώσουν τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Οι φορείς μικροεγκλεισμού μπορούν επίσης να τροποποιηθούν με φυσικά ή χημικά μέσα προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή λειτουργικότητα της μήτρας μικροενθυλάκωσης [Khanvilkar et al., 2016]. Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους φορείς μικροεγκλεισμού λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητάς τους και τους χαμηλού κόστους. Επίσης, η ικανότητά τους να σχηματίζουν διαλύματα χαμηλού ιξώδους σε υψηλή συγκέντρωση στερεών και καλά χαρακτηριστικά όσον αφορά την διαλυτότητα, τους καθιστά ανώτερους μεταξύ άλλων υλικών εγκλεισμού. Τα παράγωγα του αμύλου όπως οι μαλτοδεξτρίνες και η β-κυκλοδεξτρίνη είναι τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά μικροενθυλάκωσης στη βιομηχανία τροφίμων. Επίσης χρησιμοποιούνται η χιτοζάνη και τα τροποποιημένα άμυλα [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Η χημική τροποποίηση έχει καταστήσει το άμυλο κατάλληλο για ενθυλάκωση ελαίων αυξάνοντας την λιποφιλία του και βελτιώνοντας τις ιδιότητες γαλακτωματοποίησης του. Η φυσική τροποποίηση του με θερμότητα, διάτμηση ή πίεση έχει επίσης διερευνηθεί για να αλλάξει τις ιδιότητές του και το τροποποιημένο άμυλο έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρωτεΐνες για μικροεγκλεισμό ελαίων. Ακόμη φορείς εγκλεισμού είναι και διάφορα κόμμεα τα οποία είναι πολυσακχαρίτες φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης. Κατηγοριοποιούνται σε φυτικά εκκρίματα όπως το αραβικό κόμμι και το κόμμι mesquite, σε φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από σπόρους φυτών όπως το κόμμι γκουάρ και σε κόμμεα μικροβιακής ζύμωσης όπως το κόμμι ξανθάνης [Khanvilkar et al., 2016]. Οι πρωτεΐνες ως αμφολύτες δύνανται να αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία διαφορετικών τύπων ουσιών και έχουν επίσης εξαιρετικές λειτουργικές ιδιότητες όπως η διαλυτότητα και η ικανότητα γαλακτωματοποίησης που τις καθιστούν ικανές να χρησιμοποιηθούν για ενθυλάκωση. Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, όπως το καζεϊνικό νάτριο αλλά και άλλες πρωτεΐνες όπως η γλουτένη και η ζελατίνη χρησιμοποιούνται ως φορείς εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων, όπως απαραίτητα λιπαρά οξέα, προβιοτικά και πτητικά συστατικά [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Συχνά συνδυάζονται με πολυσακχαρίτες για τον μικροεγκλεισμό ελαίων ή λιποδιαλυτών συστατικών [Khanvilkar et al., 2016]. Η τεχνολογία ενθυλάκωσης βιοενεργών συστατικών σε λιπιδικά συστήματα είναι γνωστή ως τεχνολογία λιποσωμάτων. Τα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα είναι οι κύριες κατηγορίες λιπιδίων που χρησιμοποιούνται ως φορείς εγκλεισμού. Επίσης στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα γλυκερίδια που είναι οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα, οι κηροί, με το μελισσοκέρι να είναι το ο πιο γνωστός ζωικής προέλευσης κηρός και την παραφίνη που είναι παράγωγο του πετρελαίου [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Επίσης χρησιμοποιούνται και οι φυσικοί κηροί όπως ο κηρός Carnauba και ο κηρός Candelilla που είναι φυτικής προέλευσης [Khanvilkar et al., 2016].

Πίνακας 8. Φορείς μικροεγκλεισμού ανάλογα την προέλευση και το είδος των μακρομορίων [Wandrey et al., 2009; Khanvilkar et al., 2016]

Προέλευση	Πολυσακχαρίτες	Πρωτεΐνες	Λιπίδια
<b>Φυτική:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Άμυλο και τα Παράγωγα του</li> <li>▪Κυτταρίνη και τα παράγωγα της                             <ul style="list-style-type: none"> <li>▪Πηκτίνες</li> </ul> </li> <li>▪Φυτικά εκκρίματα:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Αραβικό κόμμι</li> <li>-Κόμμι καράγια</li> <li>-κόμμι mesquite</li> </ul> </li> <li>▪Φυτικά εκχυλίσματα:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Γαλακτομαννάνες</li> <li>-Υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες σόγιας</li> </ul> </li> </ul>	Γλουτένη σίτου Ζεΐνη αραβοσίτου	Λιπαρά οξέα Λιπαρές αλκοόλες Γλυκερίδια <ul style="list-style-type: none"> <li>▪Κηροί:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Carnauba</li> <li>-Candelilla</li> </ul> </li> </ul> Φωσφολιπίδια
<b>Θαλάσσια:</b>	Καραγενάνη Αλγινικό		
<b>Μικροβιακή/Ζωική:</b>	Ξανθάνη Γελλάνη Δεξτράνη Χιτίνη και Χιτοζάνη	Ζελατίνη Καζεΐνες Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος	Λιπαρά οξέα Λιπαρές αλκοόλες Γλυκερίδια <ul style="list-style-type: none"> <li>▪Κηροί:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-μελισσοκέρι</li> </ul> </li> </ul> Φωσφολιπίδια Ρητίνη shellac

### Μαλτοδεξτρίνες

Οι μαλτοδεξτρίνες λαμβάνονται από τη μερική υδρόλυση του αμύλου είτε με αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα είτε από οξέα. Η δομή τους αποτελείται από πολλαπλές μονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται με α: 1 → 4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι μαλτοδεξτρίνες χαρακτηρίζονται με την ισοδυναμία σε δεξτρόζη (Dextrose equivalent – DE) η οποία αποτελεί μέτρο του βαθμού πολυμερισμού του αμύλου. Για τιμές DE >20 οι μαλτοδεξτρίνες θεωρούνται σιρόπια γλυκόζης, ενώ για DE <10 κατατάσσονται στις δεξτρίνες. Όσον αφορά την εμφάνιση, η μαλτοδεξτρίνη (MD) είναι κρεμώδης λευκή υγροσκοπική σκόνη και έχει μια ήπια γλυκιά γεύση. Είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτή και παρουσιάζει χαμηλό ιξώδες ακόμη και σε συμπυκνωμένα διαλύματα. Έτσι είναι δυνατή η αυξημένη συγκέντρωση στερεών στα γαλακτώματα μαλτοδεξτρίνης, το οποίο είναι σημαντικό για την κατακράτηση του πυρήνα κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση για την αντικατάσταση του αραβικού κόμμιος (GA), λόγω του χαμηλού κόστους της, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με GA, πρωτεΐνη ορού γάλακτος ή τροποποιημένα άμυλα για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων εγκλεισμού. Αυτό συμβαίνει επειδή η MD παρουσιάζει χαμηλή ικανότητα

γαλακτωματοποίησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κακή συγκράτηση σε περιπτώσεις που ο πυρήνας είναι λιπόφιλος. Παρόλο που η MD στερείται ικανότητας γαλακτωματοποίησης, προσφέρει εξαιρετική προστασία στον πυρήνα, λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει γρήγορα ένα πυκνό φιλμ γύρω από τον πυρήνα κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Παρά τα πλεονεκτήματα όπως προαναφέρθηκε, η μαλτοδεξτρίνη στερείται ικανότητας γαλακτωματοποίησης και επομένως οδηγεί σε φτωχή σταθερότητα γαλακτώματος και χαμηλότερη κατακράτηση πτητικών και ελαίων. Ωστόσο, ο συνδυασμός μαλτοδεξτρίνης με άλλα υλικά με καλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης μπορεί να ξεπεράσει τον παραπάνω περιορισμό [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015].

### Αραβικό κόμμα

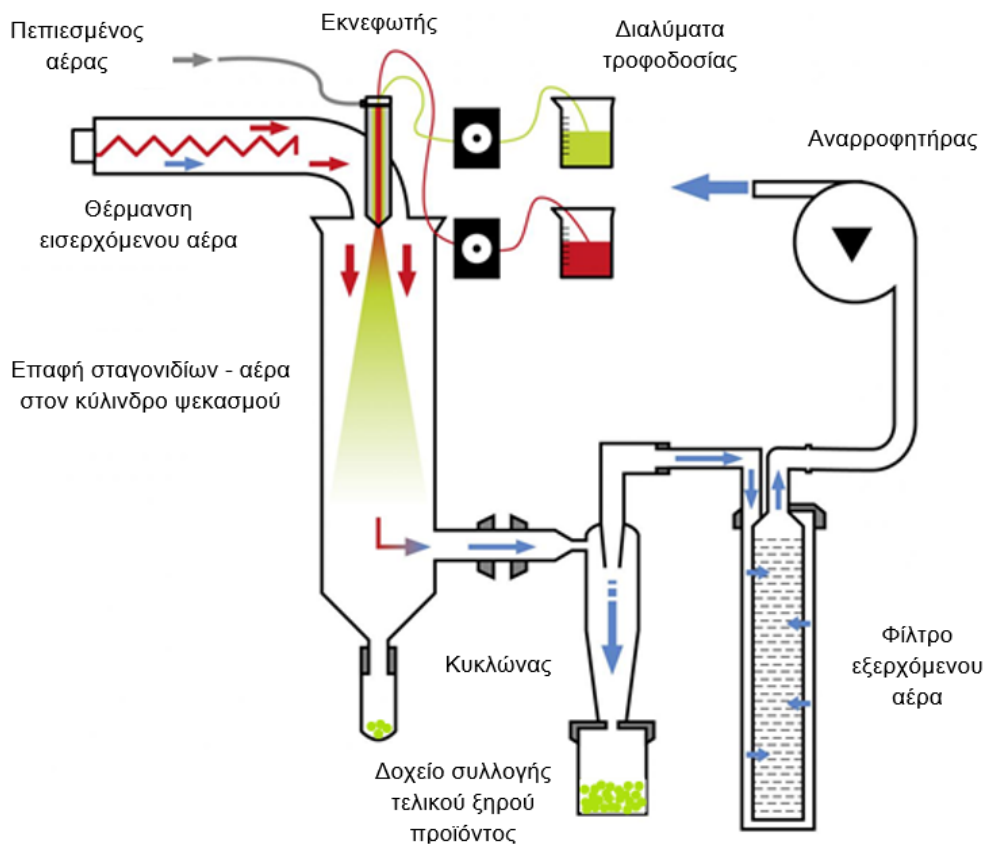
Το αραβικό κόμμα (GA), το οποίο ονομάζεται και κόμμα ακακίας, είναι ένα ξηρό εξίδρωμα που λαμβάνεται από τους μίσχους και τα κλαδιά της *Acacia senegal* ή *Acacia seyal* [Wandrey et al., 2009]. Είναι ένα πολύπλοκο πολυμερές με πολλές διακλαδώσεις που αποτελείται κυρίως από μονάδες D-γαλακτόζης, L-αραβινόζης και σε μικρότερα ποσοστά 4-O-μέθυλ-D-γλυκουρονικού και L-ραμνόζης. Αποτελείται επίσης από γλυκοπρωτεΐνες σε ποσοστό 1-2% [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015; Wandrey et al., 2009]. Επειδή πρόκειται για ένα μίγμα, το οποίο ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση του, το κλίμα, την εποχή, την ηλικία των δέντρων, τις βροχοπτώσεις και άλλους παράγοντες, η ακριβής χημική σύνθεση και οι μοριακές δομές εξακολουθούν να συζητούνται [Wandrey et al., 2009]. Είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος φορέας εγκλεισμού λιπόφιλων ενώσεων λόγω της εξαιρετικής γαλακτωματοποιητικής του ικανότητας, η οποία αποδίδεται στο πρωτεϊνικό του περιεχόμενο, καθώς του προσδίδει υδρόφοβο χαρακτήρα [Dickinson, 2003]. Επιπλέον, χρησιμοποιείται λόγω της ικανότητας σχηματισμού φιλμ και του χαμηλού ιξώδους σε υδατικά διαλύματα [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Το GA είναι άοσμο, άχρωμο, άγευστο και δεν επηρεάζει την οσμή, το χρώμα και τη γεύση του συστήματος στο οποίο προστίθεται. Είναι διαλυτό στο νερό και διαλύεται τόσο στο κρύο όσο και στο θερμό νερό σε συγκεντρώσεις μέχρι 50% w/w. Τα διαλύματα παρουσιάζουν συμπεριφορά νευτωνικών ρευστών σε συγκεντρώσεις αραβικού κόμματος έως 40%w/w και γίνονται ψευδοπλαστικά σε υψηλότερη συγκέντρωση. Το ιξώδες των διαλυμάτων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο GA, το pH και την ιοντική ισχύ. Το μέγιστο ιξώδες επιτυγχάνεται μεταξύ του pH 6 και του 7 [Wandrey et al., 2009]. Το GA είναι επίσης γνωστό για το ότι προστατεύει τα λιπίδια από τη λιποξυγενάση και τις ελεύθερες ρίζες με προσρόφηση στην επιφάνεια σταγονιδίων ελαίου [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Αυτό, με τη σειρά του, αποδίδεται στον σχηματισμό μιας ιξωδοελαστικής προστατευτικής μεμβράνης από το GA η οποία προκύπτει από την εξαιρετικά διακλαδισμένη δομή αραβινογαλακτάνης-πρωτεΐνης που περιέχει αμφότερες πρωτεϊνικές ομάδες και ομάδες πολυσακχαριτών [Wandrey et al., 2009]. Επιπροσθέτως, το GA είναι σταθερό σε ευρύ φάσμα pH και η ικανότητά του να σχηματίζει φιλμ γύρω από τα σταγονίδια ελαίου το καθιστά ένα αξιόλογο φορέα εγκλεισμού λιπιδίων [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015]. Το GA είναι συμβατό με τα περισσότερα υδροκολλοειδή φυτών, τις πρωτεΐνες, τους υπόλοιπους πολυσακχαρίτες και τα τροποποιημένα άμυλα που χρησιμοποιούνται ως φορείς εγκλεισμού, οπότε είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά ως υλικά επικάλυψης [Wandrey et al., 2009]. Παρά τα πλεονεκτήματά του, το GA, καθώς προέρχεται από φυσική πηγή, παρουσιάζει μια μεταβλητότητα στην ποιότητα του και επίσης είναι δαπανηρό. Επιπρόσθετα, το GA παρουσιάζει περιορισμένη προστασία έναντι οξειδωτικών αντιδράσεων, καθώς δρα ως ημιπερατή μεμβράνη και αυτό μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη διάρκεια ζωής του εγκλεισμένου προϊόντος [Anandharamakrishnan & Ishwarya, 2015].



## Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) είναι μια μέθοδος φυσικο-μηχανικού μικροεγκλεισμού που αναπτύχθηκε στη δεκαετία του 1930. Χαρακτηρίζεται ως μια απλή, εύκολη στη χρήση, ταχεία και οικονομικά προσιτή τεχνική [Oliveira, Bott, & Souza, 2006]. Δύναται να χρησιμοποιηθεί και σε βιομηχανική κλίμακα για τον μικροεγκλεισμό βιοδραστικών συστατικών καθώς διεξάγεται υπό συνεχή λειτουργία, έχει υψηλή αποτελεσματικότητα εγκλεισμού, καλή σταθερότητα του τελικού προϊόντος και αρκετά καλή συγκράτηση πτητικών ουσιών. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοευαίσθητα υλικά (χαμηλού σημείου βρασμού) λόγω του μικρού χρόνου επαφής στον ξηραντήρα.

Στην τεχνική της ξήρανσης με ψεκασμό, ο πυρήνας (core material) διασπείρεται σε διάλυμα του φορέα επικάλυψης (συνήθως υδατικό) και το προκύπτον διάλυμα ψεκάζεται εντός του θαλάμου ψεκασμού. Το ρευστό τροφοδοσίας, εκτός από διάλυμα, μπορεί να είναι σε μορφή πάστας ή αιωρήματος [Carvalho et al., 2016]. Πριν την ξήρανση με ψεκασμό το διάλυμα υφίσταται γαλακτωματοποίηση και ομογενοποίηση ώστε να μειωθεί η επιφανειακή του τάση [Santos et al., 2017]. Το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων επιτρέπει την ταχεία αφυδάτωση τους και ο χρόνος παραμονής τους στον ξηραντήρα είναι της τάξεως μερικών δευτερολέπτων. Η εξάτμιση πραγματοποιείται καθώς το ρευστό έρχεται σε επαφή με θερμό αέρα εντός του θαλάμου ψεκασμού. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, τα ξηρά μικροσωματίδια (μικροκάψουλες) συλλέγονται, αφού διαχωριστούν μέσω του κυκλώνα, σε ειδικό δοχείο συλλογής. Οι μικροκάψουλες έχουν διάμετρο 1-1000 μm και προστατεύουν την δραστική ουσία που είναι εγκλεισμένη στο εσωτερικό τους αποφεύγοντας την έκθεση της στο περιβάλλον. Το σχήμα τους μπορεί να είναι κανονικό (π.χ. σφαιρικό, σωληνοειδές και ωσειδές) ή και ακανόνιστο. Συνήθως, οι μικροκάψουλες που λαμβάνονται με ξήρανση με ψεκασμό δεν είναι ομοιόμορφες. Μερικά πτητικά συστατικά λόγω της θέρμανσης μπορεί να χαθούν κατά τη διάρκεια της διεργασίας και ο φορέας εγκλεισμού θα πρέπει να έχει χαμηλό ιξώδες και να βρίσκεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις [Carvalho et al., 2016]. Τα σημαντικότερα όμως από τα πλεονεκτήματα των ξηρών αυτών εκχυλισμάτων είναι η υψηλή σταθερότητα του προϊόντος, ο εύκολος χειρισμός, ο μικρός όγκος, η δυνατότητα τυποποίησης, η δυνατότητα παρασκευής δισκίων (στερεή μορφή δοσολογίας) και η εύκολη μεταφορά και αποθήκευση τους [Oliveira, Bott, & Souza, 2006; Vidović et al., 2014].



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση ενός ξηραντήρα με ψεκασμό [τροποποίηση από Fraunhofer-Gesellschaft ,2017]

Τα κύρια στάδια της διεργασίας είναι τα ακόλουθα:

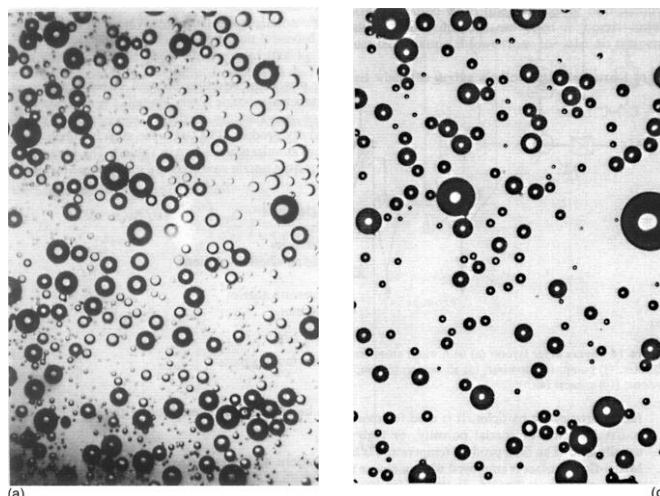
- Ατομοποίηση της τροφοδοσίας σε σταγονίδια
- Επαφή σταγονιδίων με θερμό αέρα
- Ξήρανση των σταγονιδίων
- Διαχωρισμός ξηρού προϊόντος και αέρα.

### Ατομοποίηση

Η ατομοποίηση είναι το πιο βασικό στάδιο της ξήρανσης με ψεκασμό. Ως ατομοποίηση ορίζεται ο σχηματισμός σταγονιδίων της υγρής τροφοδοσίας ώστε να μειωθεί η επιφανειακή τάση [Santos et al., 2017]. Η τροχιά και η ταχύτητα των σωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθος τους [Filkova et al., 2006]. Όσο μικρότερο είναι αυτό τόσο αυξάνεται η επιφάνεια τους συντελώντας θετικά στην μεταφορά θερμότητας και μάζας και συνεπώς στην ταχύτητα ξήρανσης [Santos et al., 2017]. Το μέγεθος των σωματιδίων αλλά και η κατανομή αυτού καθορίζονται από τον τύπο του εκνεφωτή. Ο σχεδιασμός του θαλάμου εξαρτάται επίσης από τον τύπο του εκνεφωτή. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι εκνεφωτών. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι είναι οι περιστροφικοί ή φυγοκεντρικοί εκνεφωτές και τα ακροφύσια (βαλβίδες) πίεσης ενός ρευστού. Οι πνευματικές βαλβίδες δύο ρευστών χρησιμοποιούνται πιο σπάνια καθώς έχουν ειδικές εφαρμογές [Filkova et al., 2006].

Το τελικό ξηρό προϊόν μπορεί να βρίσκεται σε μορφή λεπτής σκόνης, κόκκων ή συσσωματωμάτων. Πιο συγκεκριμένα η διάμετρος των σωματιδίων σε ξηραντήρες με

περιστροφικούς εκνεφωτές κυμαίνεται από 1-600μm, σε ξηραντήρες με ακροφύσια πίεσης από 10-800μm και σε ξηραντήρες με πνευματικές βαλβίδες από 5-300μm [Filikova et al., 2006].



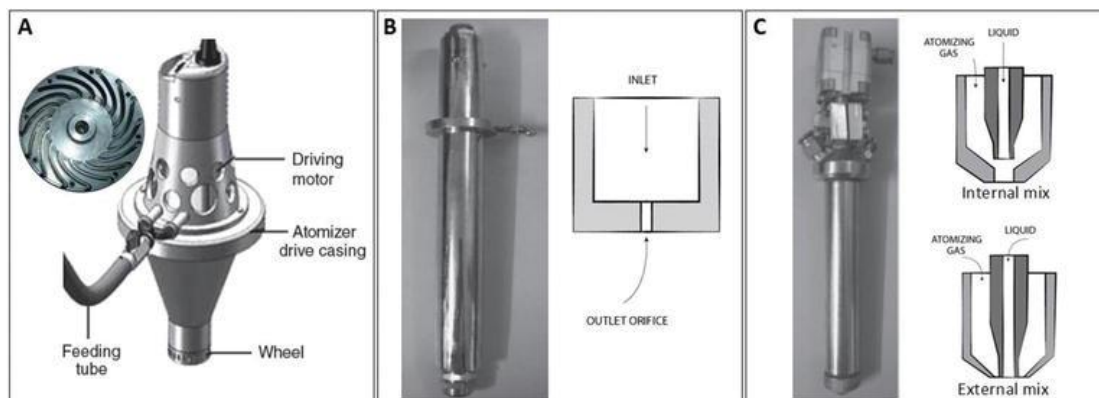
Εικόνα 17. Παραγόμενη Σκόνη με ξήρανση με ψεκασμό: (α) με περιστροφικό εκνεφωτή (β) με ακροφύσιο πίεσης υπό συγκρίσιμες λειτουργικές συνθήκες

Στους περιστροφικούς εκνεφωτές το ρευστό τροφοδοτείται στο κέντρο μιας περιστρεφόμενης επιφάνειας και κινούμενο από την φυγοκεντρική δύναμη διασκορπίζεται. Λόγω της οριζόντιας κυκλοφορίας γι' αυτούς τους εκνεφωτές είναι απαραίτητοι θάλαμοι ψεκασμού μεγάλης διαμέτρου. Ο ψεκασμός χαρακτηρίζεται από υψηλή ομοιογένεια και η κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων μπορεί να ελεγχθεί μεταβάλλοντας την ταχύτητα περιστροφής. Επίσης, ο ρυθμός της τροφοδοσίας επιδρά σε μικρότερο βαθμό στο μέγεθος των σταγονιδίων. Αυτός ο τύπος εκνεφωτή δύναται να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία υγρών τροφοδοσίας, με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες [Filikova et al., 2006].

Στα ακροφύσια πίεσης, η ατομοποίηση γίνεται λόγω της υψηλής πίεσης (5-7 MPa). Το ρευστό τροφοδοσίας με περιστροφική κίνηση ή με ροή μέσω οπών διασκορπίζεται σε σταγονίδια [Filikova et al., 2006]. Πιο συγκεκριμένα, το ρευστό εξέρχεται από το στόμιο του ακροφυσίου, του οποίου η διάμετρος κυμαίνεται από 0.4 έως 4 mm, με υψηλή ταχύτητα και ταυτόχρονη απώλεια πίεσης, δημιουργώντας ένα νέφος σταγονιδίων [Santos et al., 2017]. Με αυτόν τον τύπο ακροφυσίου είναι δυνατή η παραγωγή σταγονιδίων μέσα σε ένα στενό εύρος διαμέτρων και τα ξηρά σωματίδια είναι συνήθως κοίλες σφαίρες. Τα ακροφύσια πίεσης δεν είναι κατάλληλα για υψηλής συγκέντρωσης εναιωρήματα, λόγω της τάσης τους να φράζουν και να διαβρώνουν το στόμιο ακροφυσίου. Η κατανάλωση ενέργειας είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με εκείνη του περιστροφικού εκνεφωτή ή της πνευματικής βαλβίδας [Filikova et al., 2006].

Οι πνευματικές βαλβίδες χρησιμοποιούν πεπιεσμένο αέρα ή ατμό για τον ψεκασμό του ρευστού τροφοδοσίας. Η τροφοδοσία συνήθως αναμειγνύεται με τον αέρα έξω από το σώμα του ακροφυσίου και λιγότερο συχνά, η ανάμειξη συμβαίνει μέσα στο ακροφύσιο. Το ρεύμα του υγρού έχει μικρή ταχύτητα και διασπάται έτσι σε μικρά σταγονίδια. Η ατομοποίηση λιγότερων ιξωδών ρευστών χαρακτηρίζεται από μικρό μέσο μέγεθος σταγονιδίων και υψηλά επίπεδα ομοιογένειας. Τέτοιου τύπου εκνεφωτές χρησιμοποιούνται και για ιξώδη υγρά λόγω της δυνατότητάς τους να λειτουργούν με μικρή ταχύτητα υγρού ρεύματος αλλά σε αυτή την περίπτωση παράγονται σταγονίδια μεγαλύτερου μέσου μεγέθους και χαμηλότερης ομοιογένειας. Το μέγεθος των σταγονιδίων εξαρτάται από τον λόγο αέρα-ρευστού. Το υψηλό κόστος του πεπιεσμένου αέρα (εύρος πίεσης, 0,15-0,8 MPa) καθιστά αυτόν τον τύπο

εκνεφωτή τον πιο ακριβό συγκριτικά με τους άλλους δύο λόγω υψηλότερης κατανάλωσης ενέργειας [Filkova et al., 2006].



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση εκνεφωτών: (Α) περιστροφικός εκνεφωτής, (Β): ακροφύσιο πίεσης, (C): Πνευματική βαλβίδα [Santos et al., 2017]

Η επιλογή του τύπου του εκνεφωτή εξαρτάται κυρίως από τη φύση της τροφοδοσίας και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του προϊόντος και συγκεκριμένα το μέγεθος των παραγόμενων σταγονιδίων.

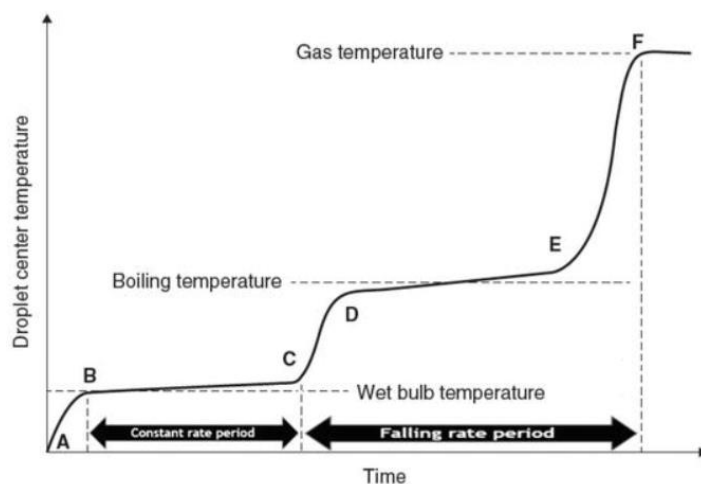
#### Επαφή σταγονιδίων με θερμό αέρα

Η επαφή των σταγονιδίων με τον θερμό αέρα μπορεί να επιτευχθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους ανάλογα με τον σχεδιασμό του ξηραντήρα και επηρεάζει τις ιδιότητες του τελικού ξηρού προϊόντος. Αρχικά, η λειτουργία του ξηραντήρα σε ομορροή χρησιμοποιείται κυρίως στα συστήματα περιστροφικών εκνεφωτών και ακροφυσίων πίεσης. Αναφέρεται ότι η τελική θερμοκρασία του προϊόντος είναι χαμηλότερη από τη θερμοκρασία του αέρα εισόδου και εξόδου και για τον λόγο αυτό εφαρμόζεται ιδιαίτερα σε θερμοευαίσθητα υλικά. Η λειτουργία σε αντιρροή χρησιμοποιείται για λιγότερο θερμοευαίσθητα υλικά τα οποία απαιτούν χοντρόκοκκα σωματίδια ή υψηλή πυκνότητα. Στην περίπτωση αυτή ο αέρας ξήρανσης διαβιβάζεται αντίθετα προς την ροή των σταγονιδίων που προέρχονται από τον ψεκάσμο και κατέρχονται λόγω βαρύτητας. Το ξηρό προϊόν υπόκειται σε ρεύμα αέρα υψηλής σχετικά θερμοκρασίας, αυξάνοντας έτσι τη θερμοκρασία του με αποτέλεσμα αυτή να είναι υψηλότερη από εκείνη του αέρα εξόδου. Τέλος υπάρχουν ξηραντήρες μικτής ροής όπου η διασπορά λαμβάνει χώρα στο μέσο του θαλάμου ξήρανσης και η διαβίβαση του αέρα γίνεται από πλάγια ανοίγματα στην οροφή. Το μίγμα ρέει προς τον πυθμένα, από όπου και εξέρχεται το ξηρό τελικό προϊόν, ενώ η φορά του αέρα μεταβάλλεται και αυτός εξέρχεται είτε από την κορυφή, είτε από πλάγιο άνοιγμα κοντά στον πυθμένα. Η μικτή ροή χρησιμοποιείται όταν απαιτείται χοντρόκοκκο τελικό προϊόν και ο χώρος του θαλάμου είναι περιορισμένος. Θεωρείται το πιο οικονομικό σύστημα και βρίσκει εφαρμογή σε θερμοάντοχα υλικά σε ξηρή μορφή [Filkova et al., 2006; Santos et al., 2017].

#### Ξήρανση των σταγονιδίων

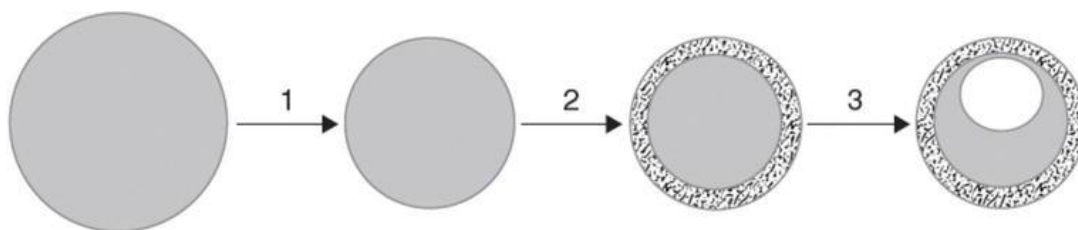
Όταν τα σταγονίδια έρχονται σε επαφή με το μέσο ξήρανσης εντός του θαλάμου υφίστανται εξάτμιση καθώς απομακρύνεται ο διαλύτης. Η ξήρανση των σταγονιδίων είναι αποτέλεσμα του φαινομένου της ταυτόχρονης μεταφοράς θερμότητας και μάζας λόγω της διαφοράς της τάσης ατμών του διαλύτη και της μερικής πίεσης της αέριας φάσης. Έτσι, λόγω

της υψηλής θερμοκρασίας του αέρα μεταφέρεται θερμότητα από αυτόν στα σταγονίδια και λόγω της μεγαλύτερης τάσης ατμών στην επιφάνεια των σταγονιδίων σε σχέση με τον αέρα, γίνεται μεταφορά υγρασίας από τα σταγονίδια στον αέρα ξήρανσης. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω λαμβάνονται ξηρά σωματίδια [Santos et al., 2017].



Εικόνα 19. Εκτίμηση θερμοκρασίας σταγονιδίων κατά την ξήρανση με ψεκάσμο

Αμέσως μετά την επαφή των σταγονιδίων και του αέρα, η μεταφορά θερμότητας από τον θερμό αέρα στη σταγόνα προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας της σταγόνας από την αρχική θερμοκρασία ( $T_i$ ) σε μια σταθερή τιμή θερμοκρασίας ( $T_{eq}$ ) που λέγεται θερμοκρασία εξάτμισης στην ισορροπία (Εικόνα 19 διάστημα A-B). Η διαδικασία ξήρανσης διεξάγεται αρχικά με σταθερό ρυθμό εξάτμισης. Υφίσταται δηλαδή, ταχεία διάχυση του νερού από τον πυρήνα των σταγονιδίων προς την επιφάνειά επιτρέποντας μια σταθερή απομάκρυνση της υγρασίας. Έτσι, η επιφάνεια των σταγονιδίων παραμένει επαρκώς κορεσμένη σε υγρασία, διατηρώντας τη θερμοκρασία της σταθερή στη θερμοκρασία υγρού θερμομέτρου (Εικόνα 19 διάστημα B-C). Η θερμότητα από το μέσο ξήρανσης μεταφέρεται στα σταγονίδια με συναγωγή και στη συνέχεια μετατρέπεται σε λανθάνουσα θερμότητα κατά την εξάτμιση της περιεχόμενης υγρασίας των σταγονιδίων. Στο στάδιο αυτό υφίσταται συρρίκνωση των σταγονιδίων όπως φαίνεται και στην Εικόνα 20 (βήμα 1). [Santos et al., 2017].



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των μορφολογικών αλλαγών που υφίστανται τα σταγονίδια κατά την ξήρανση με ψεκάσμο

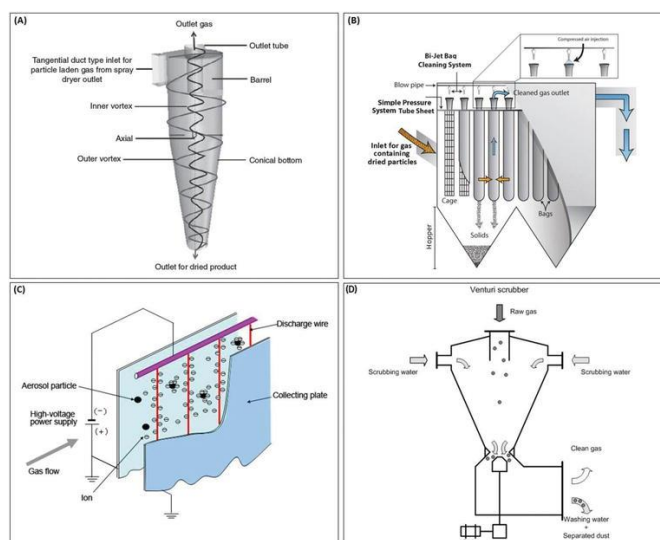
Η εξάτμιση της υγρασίας με σταθερό ρυθμό διεξάγεται ως μια κρίσιμη τιμή περιεχόμενου νερού στα σταγονίδια. Έτσι, όταν επιτευχθεί κορεσμός σχηματίζεται ένα λεπτό κέλυφος ή κρούστα στην επιφάνεια των σταγονιδίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 (βήμα 2) και η εξάτμιση επιβραδύνεται. Τότε σηματοδοτείται η αρχή του μειωνόμενου ρυθμού ξήρανσης όπου και παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας των σωματιδίων (Εικόνα 19 – διάστημα C-D). Όταν η θερμοκρασία των σταγονιδίων φτάσει στο σημείο βρασμού του νερού, πραγματοποιείται εξάτμιση, μια μετάβαση που απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας (Εικόνα 19 διάστημα D-E). Έτσι η διαδικασία ξήρανσης προχωράει με εξωτερική μεταφορά θερμότητας από τον αέρα στα σωματίδια. Στο διάστημα αυτό παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας των σωματιδίων μέχρι να γίνει ίση με εκείνη του περιβάλλοντος αερίου,



σημειώνοντας τότε το τέλος της διαδικασίας ξήρανσης αφού έχει επιτευχθεί η τελική επιθυμητή υγρασία των σωματιδίων (Εικόνα 19 διάστημα E-F). Κατά τη διάρκεια της περιόδου ξήρανσης με μειωνόμενο ρυθμό, μπορεί να συμβεί σχηματισμός φυσαλίδων μέσα στα σταγονίδια όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 (βήμα 3). Αυτό συμβαίνει όταν η μερική πίεση στον πυρήνα των σταγονιδίων ξεπερνά την πίεση περιβάλλοντος [Santos et. al (2017)].

### Διαχωρισμός ξηρού προϊόντος από τον αέρα

Μόλις ολοκληρωθεί η μετατροπή των σταγονιδίων σε ξηρά σωματίδια, είναι απαραίτητη η συλλογή τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τον διαχωρισμό των ξηρών σωματιδίων από τον ξηρό αέρα ο οποίος γίνεται σε δύο φάσεις. Σε πρώτη φάση, γίνεται διαχωρισμός όπου τα μεγαλύτερα μεγέθους σωματίδια παραλαμβάνονται στον πυθμένα του θαλάμου ξήρανσης. Σε δεύτερη φάση, τα μικρότερα σωματίδια μεταφέρονται σε ειδικό σύστημα διαχωρισμού που έπεται του θαλάμου ξήρανσης. Οι πιο συνηθισμένοι ξηροί συλλέκτες είναι οι κυκλώνες και ακολουθούν τα σακκόφιλτρα και οι ηλεκτροστατικοί κατακρημιστής (Εικόνα 21). Ακόμη, είναι επίσης σύνηθες να χρησιμοποιούνται υγρές πλυντρίδες μετά από τους συλλέκτες προκειμένου να πραγματοποιηθεί ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού αερίων [Santos et al., 2017].



Εικόνα 21. Τυπικοί συλλέκτες που χρησιμοποιούνται για την ξήρανση με ψεκασμό: (Α) Κυκλώνας, (Β) σακκόφιλτρα, (Γ) Ηλεκτροστατικός κατακρημιστής, (Δ) Πλυντρίδα Venturi

Οι κυκλώνες αποτελούν την κυρία μέθοδο διαχωρισμού σε συστήματα διαχωρισμού αερίου-στερεού. Αυτού του είδους οι διαχωριστές αποτελούνται από ένα κυλινδρικό άνω τμήμα και ένα κωνικό τμήμα στον πυθμένα του (Εικόνα 21 Α). Ο αέρας και τα ξηρά σωματίδια που προέρχονται από το θάλαμο ξήρανσης τροφοδοτούνται στον κυκλώνα όπου και γίνεται ο διαχωρισμός τους. Το αέριο εισέρχεται από την κορυφή του θαλάμου εφαπτομενικά και με περιδίνηση προς τα κάτω φθάνει στο κωνικό μέρος της συσκευής. Μόλις φθάσει το αέριο στον κώνο, δημιουργείται μια εσωτερική δίνη προς την αντίθετη κατεύθυνση. Έτσι κινείται προς τα άνω σε έναν, μικρότερης διαμέτρου, κυκλώνα και εξέρχεται από την κορυφή μέσω ενός κεντρικού καθέτου σωλήνα. Τα στερεά κινούνται ακτινικά προς τα τοιχώματα και συλλέγονται σε ένα θάλαμο συλλογής τοποθετημένο στον πυθμένα του κυκλώνα.



## Παράμετροι που επιδρούν στο τελικό ξηρό προϊόν

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού ξηρού προϊόντος εξαρτώνται από τον εξοπλισμό, δηλαδή από τον τύπο του εκνεφωτή, τη διαμόρφωση του θαλάμου ξήρανσης, τον τύπο του συλλέκτη. Επιπλέον, οι παράμετροι της διεργασίας όπως ο ρυθμός ροής τροφοδοσίας, το ιζώδες της τροφοδοσίας, η πίεση του εκνεφωτή και οι θερμοκρασίες εισόδου και εξόδου του ξηραντήρα επηρεάζουν τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Πιο αναλυτικά, η πίεση του εκνεφωτή επηρεάζει το μέγεθος των ξηρών σωματιδίων και συγκεκριμένα αυξάνοντας την πίεση, αυτό μειώνεται. Διατηρώντας την πίεση του εκνεφωτή σταθερή, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνοντας τον ρυθμό ροής της τροφοδοσίας. Επίσης, όσο αυξάνεται το ιζώδες του ρευστού τροφοδοσίας, ένα μεγάλο ποσοστό της ενέργειας ψεκασμού που τροφοδοτείται στο ακροφύσιο χρησιμοποιείται για να ξεπεραστούν οι μεγάλες ιζώδεις δυνάμεις του διαλύματος. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται μικρότερη ποσότητα ενέργειας για τον διαχωρισμό των σταγονιδίων, με αποτέλεσμα το τελικό μέγεθος των σωματιδίων να καθίσταται μεγαλύτερο. Η θερμοκρασία εισόδου αναφέρεται στη θερμοκρασία του θερμού αερίου ξήρανσης και μετράται ακριβώς πριν από την είσοδό του στο θάλαμο ξήρανσης. Το θερμικό φορτίο του εισερχόμενου αερίου ξήρανσης αντανακλά την ικανότητά του να ξηραίνει τα σταγονίδια που προέρχονται από τον ψεκασμό. Συνεπώς οι υψηλότερες θερμοκρασίες εισόδου επιτρέπουν υψηλότερους ρυθμούς εξάτμισης διαλύτη. Παρόλα αυτά, μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας εισόδου μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, λόγω αύξησης της θερμοκρασίας υγρού θερμομέτρου του αέρα. Επομένως, η επιλογή θερμοκρασίας εισόδου, πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη και τις ιδιότητες τροφοδοσίας. Η θερμοκρασία εξόδου είναι η θερμοκρασία του αέρα που περιέχει τα σωματίδια που έχουν ξηρανθεί πριν τον διαχωρισμό και την συλλογή τους. Δεν δύναται να ρυθμιστεί άμεσα από τον χειριστή αλλά επηρεάζεται από άλλες παραμέτρους όπως η θερμοκρασία εισόδου, ο ρυθμός ροής του ξηρού αέρα, καθώς και ιδιότητες της τροφοδοσίας όπως ο ρυθμός ροής αυτής, η ενθαλπία εξάτμισης του διαλύτη και η συγκέντρωση των στερεών σταγονιδίων [Santos et al., 2017].

## Εφαρμογές σε εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά συστατικά

Καθώς οι κύριες βιοδραστικές ενώσεις του δεντρολίβανου είναι οι πολυφαινόλες είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί το υλικό επικάλυψης στην ξήρανση με ψεκασμό που παρέχει την καλύτερη απόδοση εγκλεισμού αυτών. Σε έρευνα των Garofulic et al. το 2017 εξετάστηκαν διαφορετικοί φορείς εγκλεισμού (wall) ως προς την αναλογία τους με το επικαλυπτόμενο υλικό (core) και την απόδοση εγκλεισμού πολυφαινολών. Όσον αφορά τον μικροεγκλεισμό γλυκοζιτών φλαβονόλης προσδιορίστηκε η βέλτιστη απόδοση εγκλεισμού (84,01%) χρησιμοποιώντας ως φορέα εγκλεισμού το GA σε αναλογία με τον πυρήνα 2:1 (core:wall 1:2). Η αντίστοιχη απόδοση εγκλεισμού χρησιμοποιώντας ως υλικό επικάλυψης MD<sub>DE 13-17</sub> ήταν 81,45%. Για τον μικροεγκλεισμό φαινολικών οξέων βρέθηκε ότι η αντίστοιχη βέλτιστη απόδοση εγκλεισμού (93,31%) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ως παράγοντα εγκλεισμού MD<sub>DE 13-17</sub> σε αναλογία είναι 1:3 με τον πυρήνα (core:wall 1:3). Αντίστοιχα, ο εγκλεισμός των φαινολικών οξέων με GA, ως φορέα, σημείωσε τη χαμηλότερη απόδοση (59,15%). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι με τη χρήση συνδυασμού φορέων εγκλεισμού, όπως MD και GA, προκειμένου να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματα και των δύο, μπορεί να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση εγκλεισμού πολυφαινολών, δηλαδή και φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών [Garofulic et al., 2017]. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και σε μελέτη των Tolun et al. (2016), όπου η χρήση MD σε συνδυασμό με GA για τον εγκλεισμό φαινολικών ενώσεων, οι οποίες εκχυλίστηκαν από πυρήνα σταφυλιού, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η χρήση μόνο MD ως υλικού επικάλυψης.

Τα φλαβονοειδή όπως και το GA έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα και για τον λόγο αυτό εγκλείονται καλύτερα σε κάψουλες που έχουν ως υλικό επικάλυψης το GA σε σύγκριση με αυτές που έχουν την MD, καθώς η δεύτερη είναι υδρόφιλη. Μεταξύ όμως των διαφορετικών υποκατηγοριών φλαβονοειδών, η σχετική υδροφοβία είναι διαφορετική και συγκεκριμένη είναι υψηλότερη για τις φλαβόνες και τις φλαβανόνες απ' ότι για τις φλαβονόλες [Van Dijk et al., 2000]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα κύρια φλαβονοειδή που υπάρχουν στο αποσμημένο δεντρολίβανο είναι φλαβόνες είναι λογικό το αραβικό κόμμα να δίνει καλύτερα αποτελέσματα εγκλεισμού σχετικά με αυτά.

Επιπρόσθετα, σχετικά με τον φορέα εγκλεισμού η συγκέντρωση αυτού επιδρά στα χαρακτηριστικά των κόνεων. Σε μελέτη των Vidoníc et al. (2014), που αφορούσε ξήρανση με ψεκασμό εκχυλίσματος *S. montana* (θρούμπι) μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του φορέα εγκλεισμού στις φυσικές ιδιότητες της παραγόμενης σκόνης. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του φορέα εγκλεισμού, εν προκειμένω MD<sub>DE 16</sub>, αυξάνεται η φαινόμενη πυκνότητα (bulk density) της σκόνης, μειώνεται η υγροσκοπικότητα της, αυξάνεται η διαλυτότητα της στο νερό (water solubility index - WSI), ενώ μειώνεται η ικανότητα της σκόνης όσον αφορά την απορρόφηση νερού (water absorption index - WAI). Οι προκύπτουσες σκόνες με υψηλές συγκεντρώσεις σε MD (50% MD<sub>DE 16</sub>) παρουσίασαν συσσωματώματα, καθώς και χαμηλή συγκράτηση του υλικού του πυρήνα και αυτή η συμπεριφορά πιθανότατα οφείλεται σε καθυστέρηση του σχηματισμού ημιπερατού στρώματος κατά την ξήρανση.

Σε μελέτη των Dadi et al. το 2019 που αφορούσε εκχύλισμα φύλλων *Moringa stenopetala* μία εκ των παραμέτρων που μελετήθηκαν ήταν η επίδραση της αναλογίας πυρήνα και φορέα εγκλεισμού, εν προκειμένω μαλτοδεξτρίνη, στην αποτελεσματικότητα εγκλεισμού και στην περιεκτικότητα ολικών φαινολών στα ξηρά προϊόντα. Ξηρά προϊόντα με αναλογία core:wall (1:10) είχαν υψηλότερη απόδοση εγκλεισμού (EE%=89,22%) συγκριτικά με σκόνες με αντίστοιχες αναλογίες 1:8 (EE%=85,48%) και 1:6 (EE%=82,07%). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία περισσότερων φαινολικών ενώσεων στην επιφάνεια των μικροκαψουλών με υψηλή τιμή λόγου πυρήνα:φορέα επικάλυψης (core:wall 1:6 εν προκειμένω). Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες στο περίβλημα των μικροκαψουλών εμφανίζεται χαμηλότερη όταν ο λόγος πυρήνα:φορέα επικάλυψης είναι χαμηλός. Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού επικάλυψης μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού.

Σχετικά με την θερμοκρασία, η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού αυξήθηκε καθώς η θερμοκρασία του αέρα εισόδου αυξήθηκε από 120 °C σε 160 °C όταν ο λόγος πυρήνα:φορέα εγκλεισμού ήταν 1:10. Ωστόσο, όταν ο λόγος αυξήθηκε σε 1:6, η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού μειώθηκε. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην παρουσία μεγαλύτερης περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων στην επιφάνεια των σωματιδίων και κατά συνέπεια, εφόσον οι δραστικές ενώσεις εκτίθενται σε υψηλότερη θερμοκρασία αέρα εισόδου αποικοδομούνται. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχει πιθανότητα ρωγμών στην επιφάνεια των σωματιδίων καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία του αέρα εισόδου. Έτσι, οι εσωτερικές δραστικές ενώσεις ενδέχεται να απελευθερωθούν και να οδηγούν στην υπερεκτίμηση του επιφανειακού φαινολικού περιεχομένου [Dadi et al., 2019].

Όπως είναι λογικό η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες αυξάνεται όσο αυξάνεται ο λόγος core:wall, καθώς αυξάνεται έτσι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες. Παρόλα αυτά με την μείωση του προστατευτικού υλικού επικάλυψης μειώνεται η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού. Για τον λόγο αυτό όταν γίνονται πειράματα με

υψηλό λόγο core:wall προτιμάται να χρησιμοποιείται μίγμα φορέων εγκλεισμού ώστε να αυξάνεται η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού. Όπως περιγράφεται από τους Tolun et al. (2016), η ανάμειξη μαλτοδεξτρίνης με άλλα υλικά επικάλυψης βελτιώνει την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού. Παρόμοια συμπεράσματα εξήχθησαν και από τα πειράματα των Dadi et al. (2019) όπου όταν ο φορέας εγκλεισμού ήταν ένα μείγμα μαλτοδεξτρίνης και πηκτίνης (MDHP) οι ξηρές σκόνες είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες (total phenolic content-TPC) συγκριτικά με τις σκόνες που παρασκευάστηκαν με φορέα μόνο την MD. Το παραπάνω αιτιολογείται πιθανότατα λόγω της βελτίωσης της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού του υλικού επικάλυψης MDHP. Επιπλέον, το ισοδύναμο δεξτρόζης της μαλτοδεξτρίνης επηρεάζει το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, το οποίο ήταν υψηλότερο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας εγκλεισμού MD<sub>DE 4-7</sub> συγκριτικά με MD<sub>DE 17-20</sub>, σε συνδυασμό και στις δύο περιπτώσεις με GA [Tolun et al., 2016]. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι η μαλτοδεξτρίνη με υψηλότερο ισοδύναμο δεξτρόζης είναι πιο ευαίσθητη σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτές που επικρατούν κατά την ξήρανση με ψεκασμό [Bušić et al., 2018].

Η θερμοκρασία του αέρα εισόδου επηρεάζει επίσης σημαντικά την περιεκτικότητα σε TPC των μικροκαψουλών. Στην μελέτη των Dadi et al. (2019), καθώς η θερμοκρασία του αέρα εισόδου αυξήθηκε από τους 120 ° C στους 160 ° C, η περιεκτικότητα σε TPC μειώθηκε κυρίως όταν ο λόγος πυρήνα:φορέα εγκλεισμού ήταν υψηλός. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην καταστροφή των βιοδραστικών ενώσεων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας αέρα εισόδου του ξηραντήρα ψεκασμού σε συνδυασμό με την χαμηλότερη προστατευτική ικανότητα του φορέα εγκλεισμού λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας αυτού. Η ίδια τάση αναφέρθηκε και από τους Tolun et al. (2016), σε μικροκάψουλες που περιείχαν πολυφαινόλες σταφυλιών, όπου η απώλεια σε πολυφαινόλες δεν ήταν στατιστικά σημαντική με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 120°C στους 140°C, αλλά όταν η θερμοκρασία του αέρα εισόδου ρυθμίστηκε στους 160°C υπήρχε στατιστικά σημαντική απώλεια του φαινολικού περιεχομένου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην καταστροφή των βιοδραστικών ενώσεων ή και στην επίδραση της πυρόλυσης στην επιφάνεια των μικροκαψουλών.

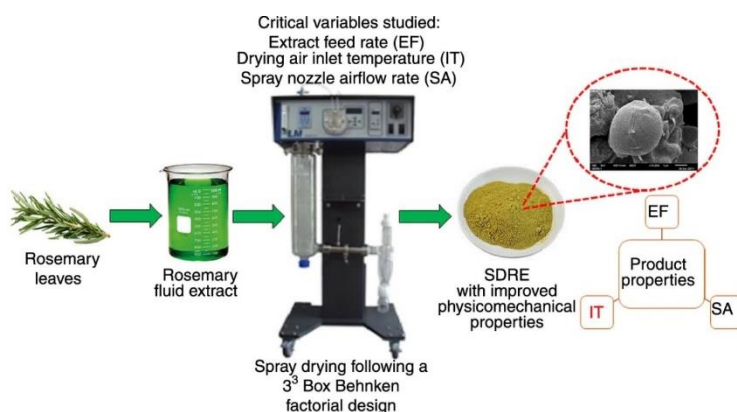
Σε έρευνα των Tolun et al. (2016) που αφορούσε μικροεγκλεισμό πολυφαινολών σταφυλιού χρησιμοποιήθηκαν ως υλικά επικάλυψης MD<sub>DE 4-7</sub> ή MD<sub>DE 17-20</sub> μόνο ή σε συνδυασμό με GA. Έγιναν πειράματα με δύο διαφορετικές αναλογίες πυρήνα : φορέα εγκλεισμού (1:1 και 1:2), τρεις διαφορετικές αναλογίες MD:GA (10:0, 8:2 και 6:4) και τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες αέρα εισόδου (120, 140, 160 και 180° C) με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων αναλογιών και συνθηκών. Όταν αξιολογήθηκαν όλες οι παράμετροι ποιότητας μαζί (απόδοση διεργασίας, υγροσκοπικότητα, συνολικό και επιφανειακό φαινολικό περιεχόμενο (TPC & SPC), αντιοξειδωτική δράση και μορφολογία σωματιδίων) τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από μικροκάψουλες που παράχθηκαν με αναλογία των φορέων εγκλεισμού MD<sub>DE 4-7</sub>:GA 8:2, με αναλογία πυρήνα:φορέα εγκλεισμού 1:1 και θερμοκρασία αέρα εισόδου ίση με 140 ° C.

Σχετικά με την απόδοση της διεργασίας αυτή παρουσίασε αύξηση με αύξηση της θερμοκρασίας σε όλα τα πειράματα. Η αύξηση αυτή στην απόδοση, μπορεί να αποδοθεί στην καλύτερη μεταφορά θερμότητας και μάζας στην περίπτωση χρήσης υψηλότερων θερμοκρασιών αέρα εισόδου. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι η ανεπαρκής εξάτμιση του νερού στις μικροκάψουλες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Οι αποδόσεις που ελήφθησαν με MD<sub>DE 4-7</sub> ως υλικό επικάλυψης ήταν υψηλότερες από αυτές του MD<sub>DE 17-20</sub> σε όλες τις θερμοκρασίες. Ο λόγος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η μαλτοδεξτρίνη με υψηλή τιμή DE τείνει να κολλά στον θάλαμο στεγνώματος σε σύγκριση με εκείνη με χαμηλή DE. Σε

πειράματα που φορέας εγκλεισμού ήταν μόνο μαλτοδεξτρίνη ( $MD_{DE\ 4-7}$  ή  $MD_{DE\ 17-20}$ ), η απόδοση αυξήθηκε όταν ο λόγος πυρήνα: φορέα εγκλεισμού αυξήθηκε από 1:1 σε 1:2. Από την άλλη πλευρά, η χρήση μίγματος μαλτοδεξτρίνης και αραβικού κόμμεως ως υλικού επικάλυψης οδήγησε σε μείωση της απόδοσης, μεταβάλλοντας την αναλογία πυρήνα:υλικού επικάλυψης από 1:1 σε 1:2. Η χρήση μόνο  $MD_{DE\ 4-7}$  οδήγησε σε αποδόσεις μεταξύ 44,7 - 64,9%, ενώ στην περίπτωση χρήσης MD:GA σε αναλογία 8:2, παρατηρήθηκαν αποδόσεις μεταξύ 42,6-59,5%. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της ποσότητας GA (MD:GA 6:4) μείωσε περαιτέρω την απόδοση (38,9-58,5%). Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αύξηση της αναλογίας του φορέα σε GA έχει αντίθετη επίδραση στην απόδοση. Η υψηλότερη απόδοση (64,9%) μεταξύ όλων των αναλογιών υλικού επικάλυψης επιτεύχθηκε όταν ο λόγος MD:GA ήταν 10:0, το είδος μαλτοδεξτρίνης ήταν  $MD_{DE\ 4-7}$ , η θερμοκρασία του αέρα εισόδου 180°C και ο λόγος πυρήνα :φορέα εγκλεισμού 1:2.

Σε έρευνα της Luiza T. Chaul και των συνεργατών της το 2017, εκτιμήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην απόδοση της ξήρανσης δια ψεκασμού και στις ιδιότητες των προκυπτουσών ξηρών κόνεων από αιθανολικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου. Πιο συγκεκριμένα οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν ο ρυθμός τροφοδοσίας του εκχυλίσματος, η θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης και η ροή του αέρα του ακροφυσίου ψεκασμού. Μεγαλύτερη επίδραση στα χαρακτηριστικά της σκόνης του εκχυλίσματος του δεντρολίβανου βρέθηκε ότι έχει η θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης. Ως βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση ξηρής σκόνης προέκυψαν οι εξής:

- χαμηλός ρυθμός ροής τροφοδοσίας εκχυλίσματος 2 mL/min,
- χαμηλή θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης ( $T_{IT}=80^{\circ}C$ ) και
- μια ενδιάμεση τιμή αναφορικά με τον ρυθμό ροής του αέρα στο ακροφύσιο ψεκασμού ίσο με 40L/min [Chaul et al., 2017].



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας

Σε αντίστοιχη μελέτη, οι Couto et al. (2012) πραγματοποίησαν πειράματα με θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης ίση με 80, 100, 120 και 140 °C, με ρυθμό τροφοδοσίας του ρευστού ίσο με 2, 4 και 6 mL/min και με ρυθμό ροής αέρα ακροφυσίου ψεκασμού ίσο με 30, 40 και 50 L/min. Ως βέλτιστες συνθήκες για την απόκτηση ξηρού εκχυλίσματος δεντρολίβανου προσδιορίστηκαν για την θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης οι 140 °C, για τον ρυθμό τροφοδοσίας τα 6 mL/min και για τον ρυθμό ροής αέρα ακροφυσίου ψεκασμού τα 50 L/min. Σύμφωνα με τους Couto et al. (2012) παρόλο που το ξηρό εκχύλισμα χάνει μέρος των πολυφαινολών του έχει ακόμη αντιοξειδωτικές ιδιότητες ( $IC_{50} = 17,6 - 24,8$  μg/mL).

Σε μελέτη των Bužić et al. (2018) αξιολογήθηκε η πιθανότητα εγκλεισμού πολυφαινολών από φύλλα δεντρολίβανου συνδυάζοντας την διπλή γαλακτωματοποίηση και την ξήρανση με ψεκασμό. Παρασκευάστηκαν διπλά γαλακτώματα για τον καλύτερο εγκλεισμό του εκχυλίσματος δεντρολίβανου τα οποία περιείχαν για σταθεροποίηση πολυγλυκερινική πολυγλυκερόλη (polyglycerol polyglycinate-PGPR) (4%) και υπερσυμπύκνωμα πρωτεϊνών ορού γάλακτος (whey protein isolates-WPI) (2 και 4%) ως γαλακτωματοποιητές. Ως φορείς εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν μαλτοδεξτρίνες (DE 10 και DE 21) και εξήχθη το συμπέρασμα ότι ο τύπος μαλτοδεξτρίνης και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δεν επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά το μέσο μέγεθος των σωματιδίων των διπλών γαλακτωμάτων που περιέχουν πολυφαινόλες δεντρολίβανου. Οι αναλύσεις μορφολογίας έδειξαν ότι τα διπλά γαλακτώματα παρασκευάστηκαν επιτυχώς και ότι μετά από ξήρανση με ψεκασμό διπλών γαλακτωμάτων ελήφθησαν σφαιρικές μικροκάψουλες. Επιπρόσθετα, η μορφή διπλού γαλακτώματος διατηρήθηκε ακόμη και μετά την επαναδιαλυτοποίηση των ξηραμένων με ψεκασμό μικροκάψουλών. Η ξήρανση με ψεκασμό πραγματοποιήθηκε με θερμοκρασία αέρα εισόδου ίση με  $175\pm 2^{\circ}\text{C}$ , θερμοκρασία εξόδου ίση με  $90^{\circ}\text{C}$  και ρυθμό ροής αέρα ακροφυσίου ψεκασμού ίσο με 600 L/h. Ανεξάρτητα από τον τύπο μαλτοδεξτρίνης, σημαντικά ( $p < 0,05$ ) μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα εγκλεισμού (encapsulation efficiency-EE%) των πολυφαινολών (39,57 και 42,83%) επιτεύχθηκε όταν η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ήταν υψηλότερη (4% πρωτεΐνη ορού γάλακτος), υποδεικνύοντας την κύρια επίδραση αυτής στην EE% των πολυφαινολών δεντρολίβανου στα δείγματα που υπέστησαν ξήρανση με ψεκασμό και επανενυδατώθηκαν. Επίσης, χρησιμοποιώντας ανάλυση HPLC, ανιχνεύθηκαν ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, απιγενίνη και λουτεολίνη στα δείγματα και συγκεκριμένα το ροσμαρινικό οξύ είχε απόδοση ενθυλάκωσης που κυμαινόταν από 62,15% έως 67,43%. Με αυτόν τον τρόπο, οι προκύπτουσες, εγκλεισμένες σε μικροκάψουλες, πολυφαινόλες δεντρολίβανου θα μπορούσαν εύκολα αναμειγνύεται με διάφορα ξηρά μίγματα (τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα ή και καλλυντικά).



## Κεφάλαιο 4: Χρήση βιοδραστικών συστατικών δενδρολίβανου σε καλλυντικά

Τα συστατικά του δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*) έχουν ποικίλες λειτουργίες στα καλλυντικά. Τα περισσότερα από τα συστατικά του λειτουργούν ως ρυθμιστικοί παράγοντες (conditioning agent) του δέρματος ή/ και ως συστατικά σε αρώματα.

Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει συλλέξει πληροφορίες από διάφορες εταιρείες παραγωγής καλλυντικών προϊόντων σχετικά με τη χρήση μεμονωμένων συστατικών του δεντρολίβανου στα καλλυντικά ως συνάρτηση της κατηγορίας καλλυντικών προϊόντων στο Εθελοντικό Πρόγραμμα Καταχώρησης Καλλυντικών (VCRP). Με βάση τα δεδομένα από το VCRP το εκχύλισμα των φύλλων του *Rosmarinus officinalis* έχει το μεγαλύτερο αριθμό χρήσεων σε καλλυντικά και συγκεκριμένα 689, ακολουθούμενο από αιθέριο έλαιο του που έχει 516 [Fiume et al., 2014].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα περισσότερα καλλυντικά σκευάσματα περιέχουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε δεντρολίβανο, συχνά πολύ μικρότερες από 0,1%. Ωστόσο, το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού αναφέρεται ότι χρησιμοποιείται σε ποσοστό έως και 10% σε προϊόντα σώματος και χεριών και σε ποσοστό 3% σε σκιές ματιών και σαμπουάν. Συστατικά του *Rosmarinus officinalis* μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε προϊόντα για τη φροντίδα του δέρματος των μωρών (π.χ. 0,012% εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* σε λοσιόν για μωρά, έλαια και κρέμες). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται σε προϊόντα τα οποία υπάρχει πιθανότητα να καταποθούν (π.χ. 0,012% εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* σε κραγιόν) ή χρησιμοποιούνται κοντά στην περιοχή των ματιών ή στους βλεννογόνους (π.χ. έως 3% εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* σε σκιά ματιών και σε σαπούνια μπάνιου). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα που παράγονται από δεντρολίβανο χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά σπρέι και σκόνες. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα φύλλων του δεντρολίβανου χρησιμοποιείται σε παρασκευές αρωμάτων σε ποσοστό μέχρι 0,5% και σε πούδρες προσώπου μέχρι και 0,05%. Αυτά τα προϊόντα θα μπορούσαν ενδεχομένως να εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα δια της εισπνοής. Στην πράξη, το 95 με 99% των αιωρούμενων σωματιδίων που απελευθερώνονται από τα καλλυντικά σπρέι έχουν αεροδυναμικές ισοδύναμες διαμέτρους > 10 μm. Επομένως, τα περισσότερα εξ αυτών εναποτίθενται στις ρινοφαρυγγικές και βρογχικές περιοχές και εισέρχονται στους πνεύμονες του ατόμου σε οποιαδήποτε σημαντική ποσότητα. Το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού χρησιμοποιείται σε αποσμητικά σπρέι σε συγκεντρώσεις έως και 0,012% [Fiume et al., 2014]. Επιπρόσθετα, συστατικά του φυτού περιέχονται σε κρέμες για την ακμή και κρέμες αντιγήρανσης [Carvalho et al., 2016].

Οι φυσικές πηγές με αντιοξειδωτική δράση, όπως το RA, έχουν θεωρηθεί ως μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων αντιγηραντικών δερματικών σκευασμάτων όπως προαναφέρθηκε. Στο πλαίσιο αυτό, οι Marafon et al. (2019) μελέτησαν την τοπική εφαρμογή υδρογελών με ενσωματωμένα νανογαλακτώματα που περιείχαν RA. Αξιολόγησαν την επίδραση της προσθήκης επιφανειοδραστικού παράγοντα (Tween 80) σε αυτά και την ασφάλεια των νανογαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας HaCaT (αθανатоποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα). Παρατηρήθηκε ότι οι υδρογέλες διατηρούσαν τα χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν στα νανογαλακτώματα και επίσης ότι όλα τα σκευάσματα παρουσίασαν κατάλληλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για τοπική εφαρμογή. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία Tween 80 μείωσε το μέγεθος των σταγονιδίων και το δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων και των υδρογελών. Η παρουσία του Tween 80 είχε επίσης θετική επίδραση στην διείσδυση του RA στο δέρμα. Τα συνολικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τα σκευάσματα που αναπτύχθηκαν σε αυτή τη μελέτη, και συγκεκριμένα τα νανογαλακτώματα RA που έχουν ενσωματωθεί με υδρογέλη



υδροξυαιθυλοκυτταρίνης (hydroxyethyl cellulose) και περιέχουν επιφανειοδραστικό παράγοντα (Tween 80), μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλος φορέας για το RA σε ένα αντιγηραντικό προϊόν για τοπική εφαρμογή στο δέρμα.

Η διείσδυση του RA στο δέρμα επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά του φορέα που είναι ενσωματωμένο καθώς και από τη μορφή του εκχυλίσματος. Οι Stelmakiené et al. (2015) σε μελέτη τους για την ατοπική δερματίτιδα (atopic dermatitis) παρασκεύασαν αλοιφές και κρέμες-γαλακτώματα με ξηρό ή υδατικό εκχύλισμα *Melissa Officinalis L.*, το οποίο περιέχει RA, με τις συστάσεις αναλυτικά όπως φαίνονται στην Εικόνα 23.

	Beeswax	Paraffin	Vaseline	Honey	Cocoa butter	Cholesterol	Olive oil	Water	Aqueous lemon balm extract, 1:15	Dry extract
N 1	6.0	5.0	5.0	-	10.0	3.0	67.0	-	-	4.0
N 2	15.0	-	-	10.0	10.0	3.0	58.0	-	-	4.0
N 3	5.0	-	-	10.0	10.0	3.0	33.0	35.0	-	4.0
N 4	5.0	-	-	10.0	10.0	3.0	37.0	-	35.0	-

Εικόνα 23. Σύσταση ημιστερεών σκευασμάτων με εκχύλισμα *Melissa Officinalis L.* [Stelmakiené et al., 2015]

Ο δείκτης συνεκτικότητας είναι μέτρο του ιξώδους το οποίο, με τη σειρά του, έχει αντιστρόφως ανάλογη επίδραση στη διάχυση, δηλαδή μια μείωση του ιξώδους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού απελευθέρωσης της ουσίας. Λόγω των παραπάνω ως δείγμα αναφοράς για τη διείσδυση του RA χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα ως έχει. Τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης απελευθέρωσης έδειξαν ότι μεγαλύτερες ποσότητες RA απελευθερώθηκαν από τα γαλακτώματα και συγκεκριμένα όταν προστέθηκε το εκχύλισμα *Melissa officinalis L.* σε ξηρή μορφή και όχι ως υδατικό εκχύλισμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλοιφές περιέχουν 15% ουσιών που σχηματίζουν ένα φιλμ στην επιφάνεια του δέρματος (μελισσοκέρι, παραφίνη, βαζελίνη), το οποίο μπορεί να αποτελέσει πρόσθετο φραγμό για την διείσδυση του RA όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα (Εικόνα 24) [Stelmakiené et al., 2015].

Rosmarinic acid (%)	Aqueous extract of <i>Melissa officinalis L.</i> (1:15)	Sample			
		N 1	N 2	N 3	N 4
Epidermis	0.42 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.15 ± 0.00	1.08 ± 0.18	0.22 ± 0.01
Dermis	tr	0	0	tr	0
Acceptor	0	0	0	0	0

tr – traces

<sup>a</sup>After 24-hours application.

Εικόνα 24. Διείσδυση ροσμαρινικού οξέος μέσω ημιστερεών σκευασμάτων στην επιδερμίδα και το χόριο

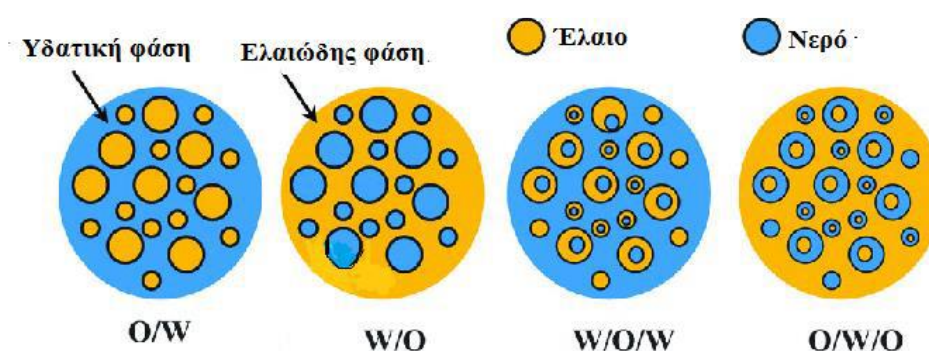
Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της διείσδυσης έδειξαν ότι το RA συσσωρεύεται στην επιδερμίδα. Το χόριο (dermis), δηλαδή η δεύτερη κύρια στιβάδα του δέρματος που βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα, λειτουργεί ως φραγμός αποτρέποντας τη βαθύτερη διείσδυση και την είσοδο του RA στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ροσμαρινικό οξύ που χρησιμοποιείται τοπικά έχει μόνο τοπικές επιδράσεις [Stelmakiené et al., 2015].

Εκχυλίσματα φυτών συμπεριλαμβανομένου και του δενδρολίβανου, χρησιμοποιούνται στην σύνθεση πολλών προϊόντων στοματική υγιεινής καθώς μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό οδοντικού βιοφίλμ (πλάκας) μειώνοντας την προσκόλληση των παθογόνων στην

επιφάνεια των δοντιών. Οι Valones et al. (2019) πραγματοποίησαν μια διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή ώστε να διερευνηθεί η δράση μιας νέας καλλυντικής οδοντόκρεμας που περιέχει αιθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου ενάντια στην βακτηριακή πλάκα και την αιμορραγία των ούλων, σε σύγκριση με μια οδοντόκρεμα με φθόριο που είναι εμπορικά διαθέσιμη. Στην κλινική μελέτη, οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και η Ομάδα Α χρησιμοποίησε την πειραματική οδοντόκρεμα ενώ η Ομάδα Β χρησιμοποίησε μια εμπορικά διαθέσιμη οδοντόκρεμα με φθόριο (Sorriso Dentes Brancos®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brazil). Τα άτομα που συμμετείχαν εξετάστηκαν σε πρώτο στάδιο για να καταγραφεί ο δείκτης ουλίτιδας (GBI) και πλάκας (PI) πριν την έναρξη της κλινικής δοκιμής. Στη συνέχεια για διάστημα 30 ημερών ο κάθε εθελοντής χρησιμοποιούσε την οδοντόκρεμα που του είχε δοθεί για την στοματική του υγιεινή. Σε δεύτερο στάδιο, μετά το πέρας των 30 ημερών οι εθελοντές επέστρεψαν την κλινική και εξετάστηκαν ξανά προκειμένου να προσδιοριστούν οι νέες τιμές GBI και PI. Η μέση τιμή των δεικτών GBI και PI μειώθηκε μετά από 30 ημέρες, αν και η μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p > 0,05$ ) σε καμία από τις περιπτώσεις. Συμπερασματικά, η πειραματική οδοντόκρεμα (Α) ήταν αρκετά αποτελεσματική στον έλεγχο της ουλίτιδας και της βακτηριακής πλάκας στο δείγμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε, συγκρινόμενη με την εμπορική οδοντόκρεμα με φθόριο. Ως εκ τούτου, αποτελεί μια βιώσιμη εναλλακτική λύση στα συνθετικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στον τομέα της οδοντολογίας.

## Γαλακτώματα

Τα γαλακτώματα είναι μίγματα δύο μη αναμίξιμων υγρών, στα οποία το ένα υγρό εμφανίζεται με τη μορφή σταγόνων (διασπαρμένη φάση) που βρίσκονται στο εσωτερικό του άλλου υγρού (συνεχής φάση) [Perazzo et. al., 2015]. Ανάλογα με την φύση των σχηματιζόμενων σταγόνων, τα γαλακτώματα διακρίνονται σε α) ελαίου σε νερό (oil in water, o/w), β) νερού σε έλαιο (water in oil, w/o) ή γ) ελαίου σε έλαιο (oil in oil o/o). Επιπρόσθετα, υπάρχουν και τα πολλαπλά γαλακτώματα μέσα στα οποία τα διασπαρμένα σωματίδια αποτελούν τα ίδια γαλακτώματα, όπως για παράδειγμα το διπλό γαλακτώμα νερού σε έλαιο σε νερό (water in oil in water, w/o/w). Σε αυτού του τύπου γαλακτώματα στην υδατική συνεχή φάση βρίσκεται διασπαρμένο ένα γαλακτώμα νερού σε έλαιο. Αντίστροφος τύπος γαλακτώματος είναι το έλαιο σε νερό σε έλαιο (oil in water in oil o/w/o). Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25. Τύποι γαλακτώματος

Η σταθερότητα ενός γαλακτώματος ποικίλει από μερικά λεπτά ως και χρόνια ανάλογα το γαλακτώμα. Συγκεκριμένα, αυξάνεται με την μείωση της ακτίνας των σταγονιδίων αλλά και την αύξηση του ιξώδους της συνεχούς φάσης καθώς κατά αυτόν τον τρόπο επιβραδύνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων [Perazzo et. al., 2015]. Τα γαλακτώματα νερού σε λάδι (w/o) έχουν χαμηλότερο κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης σε σχέση με τα γαλακτώματα ελαίου σε

νερό (o/w). Σε πολλές περιπτώσεις, η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων γαλακτώματος (νανογαλάκτωμα) αυξάνει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Ακόμη, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα εξαρτάται επίσης από τη χημική σύνθεση του ελαίου, δηλαδή τον τύπο των φαινολικών ενώσεων, τη συγκέντρωσή τους και τη χημική δομή [Halla et al., 2018]. Επιπλέον, όσον αφορά τα νανογαλακτώματα αυτά αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων και για καλλυντικούς σκοπούς, αφού τα μικρά μεγέθη σταγονιδίων μπορούν να βελτιώσουν τη διείσδυση ενεργών λιπόφιλων μορίων μέσω του δέρματος, αυξάνοντας το τοπικό τους αποτέλεσμα [Marafon et al., 2019].

Σε μελέτη των Varka et al. (2012) εκτιμήθηκε η σταθερότητα καλλυντικών γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό που παράγονται με διαφορετικά βότανα (*Rosmarinus officinalis* και *Calendula officinalis*) και συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών ουσιών. Αναφορικά με τα γαλακτώματα με εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* βέλτιστη σταθερότητα παρατηρήθηκε σε γαλάκτωμα με 6 g γαλακτωματοποιητή Glycerol monostearate (GMS) και εκχύλισμα ελαίου *Rosmarinus officinalis*, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία αποσταθεροποίηση για τις πρώτες 60 ημέρες μετά την παραγωγή του. Αντίθετα, ο διαχωρισμός των δύο φάσεων ήταν σχεδόν πλήρης σε λιγότερο από 20 ημέρες σε γαλακτώματα χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση GMS. Με βάση τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσθήκη εκχυλίσματος βοτάνων συντελεί καθοριστικά στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων.

Στην παρούσα διπλωματική θα παρασκευαστούν και γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w) στα οποία θα μελετηθεί η διατηρησιμότητα των φαινολικών συστατικών αλλά και γαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o) και συγκεκριμένα καλλυντικές κρέμες στις συνθέσεις των οποίων πάλι θα περιέχονται συστατικά του δεντρολίβανου.

Οι κρέμες είναι στερεά ή ημιστερεά γαλακτώματα (o/w ή w/o) τα οποία περιέχουν μίγματα ελαίου και νερού και η ομογενοποίηση τους επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων γαλακτωματοποιητών. Για παράδειγμα, μια ενυδατική κρέμα θα πρέπει να απλώνεται εύκολα στο δέρμα, να απορροφάται γρήγορα και να αφήνει το δέρμα απαλό και ενυδατωμένο και όχι λιπαρό ή κολλώδες. Η επικρατέστερη ταξινόμηση στον τομέα των καλλυντικών είναι αυτή που κατατάσσει τις κρέμες ανάλογα με τις λειτουργίες τους:

- Κρέμες Καθαρισμού και Ψυχρές κρέμες,
- Κρέμες νύχτας και Μασάζ,
- Κρέμες ημέρας, Εξαφανιζόμενες κρέμες και κρέμες Βάσης Make-up,
- Κρέμες χεριών και σώματος,
- Κρέμες για όλες τις χρήσεις [Sharma et al., 2018].

Πίνακας 9. Ταξινόμηση κρεμών και τα χαρακτηριστικά τους [Sharma et al., 2018]

Κατηγορία	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Δράση
Κρέμες Καθαρισμού	Μέτρια έως υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά	Καθαρισμός δέρματος και Make-up δεν απορροφούνται
Ψυχρές κρέμες	w/o στερεά ή ημιστερεά γαλακτώματα	Αίσθηση ψύξης Ενυδάτωση Μαλακτική δράση Απαλότητα

<b>Κρέμες Νύκτας</b>	Συνήθως περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες για βελτίωση της διαπερατότητας και της σταθερότητας	Ενυδάτωση Απαλότητα
<b>Κρέμες Μασάζ</b>	Ουδέτερο pH	Τόνωση της Κυκλοφορίας Απαλότητα δεν απορροφούνται
<b>Κρέμες Ημέρας</b>	Μικρή περιεκτικότητα σε λιπαρά	Ενυδάτωση Απαλότητα Εύκολο άπλωμα Εύκολη απορρόφηση
<b>Κρέμες Βάσης Make-up</b>	Συνήθως ο/w ή w/o στερεά ή ημιστερεά γαλακτώματα	
<b>Εξαφανιζόμενες κρέμες</b>	ο/w γαλακτώματα περιέχουν ενυδατικούς και άλλους δραστικούς παράγοντες Υψηλό σημείο τήξης και μικρότερο αριθμό Ιωδίου	
<b>Κρέμες Χεριών και Σώματος</b>	Χαμηλή έως μέτρια περιεκτικότητα σε λιπαρά. Συνήθως ο/w. Ελαφρώς αλκαλικό ή όξινο pH. Μπορεί να περιέχουν λανολίνη ή και σιλικόνες.	Ενυδάτωση Απαλότητα Εύκολο άπλωμα Όχι τόσο εύκολη Απορρόφηση Μη κολλώδης αίσθηση Συνήθως κυκλοφορούν σε μορφή λωσιόν.
<b>Κρέμες για όλες τις χρήσεις</b>	Μέτρια περιεκτικότητα σε λιπαρά, ο/w ή w/o στερεά η ημιστερεά γαλακτώματα.	Συνήθως είναι λίγο λιπαρές Εύκολες στην χρήση και στο άπλωμα Λείανση του δέρματος

### Γαλακτωματοποιητές

Οι γαλακτωματοποιητές αποτελούν μια ιδιαίτερα κατηγορία επιφανειοδραστικών ουσιών, οι οποίοι προστίθεται σε συστήματα διασποράς όπως είναι τα γαλακτώματα και σκοπό έχουν να αυξήσουν την σταθερότητα του συστήματος ενώνοντας τις δύο φάσεις του γαλακτώματος. Ο χρησιμοποιούμενος γαλακτωματοποιητής είναι καθοριστικός του τύπου του γαλακτώματος ο/w ή w/o. Στην περίπτωση που ο γαλακτωματοποιητής διαλύεται ευκολότερα σε νερό δημιουργεί γαλάκτωμα τύπου ο/w. Παρακάτω αναφέρονται μερικά στοιχεία για τους γαλακτωματοποιητές που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα.

### *Tween 20*

Το Tween 20 ή αλλιώς Μονολαυρική πολυοξυαιθυλενοσορβιτάνη (polysorbate 20) E433 χρησιμοποιείται ως μη ιοντικός επιφανειοδραστικός παράγοντας σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w). Χρησιμοποιείται ευρέως ως γαλακτωματοποιητής σε φαρμακευτικές συνθέσεις, βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών λόγω της υψηλής σταθερότητας που προσδίδει στις συνθέσεις.

### *Μελισσοκέρι*

Το μελισσοκέρι χρησιμοποιείται ως παράγοντας γαλακτωματοποίησης σε συνδυασμό με άλλους γαλακτωματοποιητές, καθώς κατά αυτόν τον τρόπο βελτιώνεται η δράση του. Στα καλλυντικά, το κερι μέλισσας χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό καθώς παρέχει ελαστικότητα και βοηθάει στην αποκατάσταση του ταλαιπωρημένου δέρματος. Το κερι μέλισσας χρησιμοποιείται κυρίως σε κραγιόν και κρέμες. Έχει λιπαντικές, μαλακτικές ιδιότητες και μειώνει τη διαδερμική απώλεια νερού. Συστατικά του όπως το σκουαλένιο και τα φλαβονοειδή (χρυσίνη) παρέχουν αντισηπτικές ιδιότητες και προστατεύουν το δέρμα από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αποτελεί επίσης προστατευτικό φράγμα έναντι πολλών εξωτερικών παραγόντων σχηματίζοντας ένα φιλμ στην επιφάνεια του δέρματος. Το β-καροτένιο που υπάρχει στο κερι της μέλισσας είναι μια πολύτιμη πηγή βιταμίνης Α. Η βιταμίνη Α καθυστερεί την αποδόμηση του κολλαγόνου, οδηγώντας έτσι σε ταχύτερη αναγέννηση του δέρματος μετά από βλάβες [Kurek-Górecka et al., 2020].

### *Βουτυλενογλυκόλη*

Η βουτυλενογλυκόλη είναι μια από τις κυριότερες διυγρυντικές ουσίες και προστίθεται σε ένα προϊόν για να μειώσει την απώλεια του νερού από το σκεύασμα αυξάνοντας την σταθερότητα του.

### *Γαλακτωματοποιητής φυτικής προέλευσης Phytocream® 2000*

Είναι ένας γαλακτωματοποιητής φυτικής προέλευσης, που προέρχεται από ένα συνδυασμό πολυπεπτιδίων σίτου με παλμιτικό κάλιο, τον εστέρα στεατικού οξέος με γλυκερίνη και την κεταρυλική αλκοόλη. Είναι ανιονικός / μη ιονικός γαλακτωματοποιητής o/w και είναι συμβατός με όλες τις καλλυντικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται εκτός από τα κατιονικά τασιενεργά. Δεν περιέχει συντηρητικά και έχει τη μορφή υπόλευκων νιφάδων με χαρακτηριστική οσμή και σημείο τήξης 52-62°C. Λόγω της δομής του μπορεί να δεχτεί έως και 40% λιπόφιλες ουσίες πράγμα που τον καθιστά κατάλληλο για καλλυντικά σκευάσματα πλούσια σε φυτικά έλαια. Χρησιμοποιείται σε καλλυντικά προϊόντα προσώπου και σώματος. Έχει πολύ ισχυρές ενυδατικές ιδιότητες, μειώνει την ξηρότητα του δέρματος αυξάνοντας συγχρόνως την ελαστικότητα του. Δεν ερεθίζει το δέρμα και τα μάτια, είναι κατάλληλο για ευαίσθητο δέρμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και σε καλλυντικά προϊόντα για μωρά.

Επιπρόσθετα, αναφέρονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά των λοιπών συστατικών που θα χρησιμοποιηθούν για την Παρασκευή των καλλυντικών συνθέσεων.

### *Αλόη (Aloe vera)*

Η αλόη (Aloe vera) θα αποτελέσει το βασικό συστατικό της υδατικής φάσης των κρεμών. Αποτελείται από πολυσακχαρίτες, ένζυμα, βιταμίνες (B2, B6, C και E), μέταλλα, και αμινοξέα όπως η προλίνη που παρέχουν ενυδάτωση, απαλότητα και ελαστικότητα στο δέρμα. Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Reveny et al. (2016) σχετικά με τα σκευάσματα με



διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος αλόης και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αυτής σε μάσκες προσώπου με αντιγηραντική επίδραση στο δέρμα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλόης αυξάνουν το αντιγηραντικό δυναμικό της μάσκας. Η αλόη εμφανίζει ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, επουλωτικές κ.α. Χρησιμοποιείται επίσης για τη θεραπεία κοψίματος, εγκαυμάτων και εκζέματος. Η αλόη είναι ένα από τα φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως απευθείας, χωρίς επεξεργασία, ως παραδοσιακή θεραπεία για την φλεγμονή αλλά και την ενυδάτωση του δέρματος [Nilforoushzadeh et al., 2018].

#### *Φυτικά εκχυλίσματα*

Τα φυτικά εκχυλίσματα αλλά και τα αιθέρια έλαια προστίθενται σε καλλυντικές φόρμουλες λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Επιπρόσθετα, έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιγηραντικές δράσεις, προστατεύουν έναντι της ακτινοβολίας UV-B και συνεισφέρουν στην μείωση του αποχρωματισμού του δέρματος. Σε αντίθεση με τα αιθέρια έλαια τα φυτικά εκχυλίσματα δεν έχουν έντονη οσμή η οποία είναι ανεπιθύμητη σε τέτοιου είδους προϊόντα και έτσι είναι ευκολότερη η εφαρμογή τους ως φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη συντηρητική αποτελεσματικότητα που προσδίδουν τα φυτικά εκχυλίσματα στα καλλυντικά προϊόντα. Χρησιμοποιούνται είτε ως έχουν, μικροενθυλακωμένα ή σε φορείς όπως νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων. Παρόλα αυτά συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με συνθετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες γιατί η δραστηριότητα τους μειώνεται λόγω αραιώσεων [Halla et al., 2018]. Επιπρόσθετα, με βάση μελέτη των Varka et al. (2012) η προσθήκη βοτάνων όπως το δεντρολίβανο και η καλέντουλα σε καλλυντικά γαλακτώματα μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων χωρίς περαιτέρω προσθήκη χημικών σταθεροποιητών. Εν προκειμένω σε κάποιες από τις καλλυντικές κρέμες θα χρησιμοποιηθεί υδατικό εκχύλισμα από δεντρολίβανο και για αυτό γίνεται λόγος για την επίδραση των εκχυλισμάτων στα καλλυντικά.

#### *Αμυγδαλέλαιο*

Το αμυγδαλέλαιο είναι από τα έλαια που χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στη βιομηχανία καλλυντικών. Έχει ελαφριά οσμή και μαλακτικές ιδιότητες. Διαθέτει επίσης καλές ιδιότητες όσον αφορά τη διείσδυση, την ενυδάτωση και την αναδόμηση του δέρματος. Περαιτέρω, από κλινική εμπειρία το αμυγδαλέλαιο μειώνει φαινομενικά τις υπερτροφικές ουλές μετεγχειρητικά, λειαίνει και αναζωογονεί το δέρμα. Είναι περιζήτητο κυρίως για την πλούσια συγκέντρωσή του σε λιπαρά οξέα (ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ) [Ahmad, 2010].

#### *Έλαιο αβοκάντο*

Το έλαιο αβοκάντο εκτιμάται ιδιαίτερα για την ευεργετική επίδραση του στο δέρμα. Για τη χρήση του στα καλλυντικά, το έλαιο αβοκάντο υποβάλλεται σε επεξεργασία και συγκεκριμένα σε εξευγενισμό, λεύκανση και απόσμηση. Το προκύπτον λάδι έχει χρώμα ανοιχτό κίτρινο (αντί για πράσινο) και έχει ελαφριά οσμή ή γεύση αβοκάντο [Woolf et al., 2009]. Το έλαιο χρησιμοποιείται σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος, όπως κρέμες, καθώς απορροφάται γρήγορα και έχει αντηλιακές και εξαιρετικές μαλακτικές ιδιότητες. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε σαπούνια καθώς παρέχει βελτιωμένο αφρισμό [Human, 1987].

#### *Τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας*

Στα τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας (medium chain triglycerides - MCT) συγκαταλέγονται τα λιπαρά οξέα με οκτώ άνθρακες (καπρυλικό), δέκα άνθρακες (καπρικό), έξι άνθρακες (καπροϊκό) και δώδεκα άνθρακες (λαυρικό). Συγκεκριμένα, έλαια από καπρυλικό και καπρικό τριγλυκερίδιο χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά προϊόντα λόγω των καλυπτικών ιδιοτήτων τους αλλά και επειδή είναι ένα εξαιρετικά μαλακτικά. Επιπλέον, αυτού του τύπου έλαια έχουν αποδειχθεί ότι δεν είναι ερεθιστικά για το δέρμα [Patel et al., 1985].



## Κεφάλαιο 5: Πειραματικό μέρος

### Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο και η επεξεργασία του εκχυλίσματος για να χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικές φόρμουλες. Σχετικά με την επεξεργασία του εκχυλίσματος πραγματοποιείται είτε ξήρανση με ψεκασμό για την παραγωγή κόνεων με εγκλεισμένα τα συστατικά του δεντρολίβανου, οι οποίες μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικές συνθέσεις, είτε ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε ελαιώδη φορέα για την μετέπειτα χρήση τους σε καλλυντικές συνθέσεις όπως γαλακτώματα ή κρέμες.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τις εκχυλίσεις στόχος είναι ο προσδιορισμός της βέλτιστης επιλογής διαλύτη αλλά και της βέλτιστης μεθόδου εκχύλισης. Έτσι, αρχικά συγκρίνονται τα εκχυλίσματα που προκύπτουν με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και με εκχύλιση σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μίγμα ακετόνης:νερού (80:20). Η σύγκριση γίνεται μέσω αναλύσεων υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με σκοπό την ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών αλλά και με ταχύτερες μεθόδους όπως η μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών και η μέθοδος DPPH για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Εν συνεχεία, επιλέγοντας τη βέλτιστη μέθοδο, δηλαδή αυτή των υπερήχων, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με διαλύτη μίγμα ακετόνης:νερού σε αναλογία 80:20 και με διαλύτη μίγμα αιθανόλης:νερού σε αναλογία 60:40 με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης του διαλύτη. Η σύγκριση πραγματοποιείται ξανά με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως. Ακόμη, πραγματοποιούνται διαδοχικές εκχυλίσεις στην σταθερή κλίση με σκοπό την παραλαβή ξεχωριστά υδατικών και ακετονικών εκχυλισμάτων, τα οποία περιέχουν τα πολικά συστατικά (κυρίως ροσμαρινικό οξύ) και τα άπολα (κυρίως φαινολικά διτερπένια), αντίστοιχα.

Τα παραγόμενα εκχυλίσματα οδηγούνται σε ξήρανση με ψεκασμό για την παραγωγή κόνεων. Στόχος είναι να παρασκευαστούν κόνεις, στις οποίες ανάλογα τον τύπο του εκχυλίσματος τα εγκλεισμένα συστατικά διαφέρουν. Συγκεκριμένα τροφοδοτώντας υδατικά εκχυλίσματα πραγματοποιείται εγκλεισμός ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών, τροφοδοτώντας ακετονικά εκχυλίσματα πραγματοποιείται εγκλεισμός φαινολικών διτερπενίων, ενώ τέλος τροφοδοτώντας εκχυλίσματα προερχόμενα από μίγματα διαλυτών, δύναται να εγκλειστεί το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου. Χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα με μίγμα ακετόνης:νερού (80:20) και μίγμα αιθανόλης:νερού (60:40) σε υπερήχους, καθώς κρίθηκαν καλύτερα στις προηγούμενες σειρές πειραμάτων. Επιπλέον, η παραγωγή σκόνης με δύο μίγματα διαλυτών έγινε προς εξέταση του είδους του εκχυλίσματος όσον αφορά την απόδοση και την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των συστατικών στις μικροκάψουλες. Στα πειράματα ελέγχεται η απόδοση εγκλεισμού, η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού αλλά και η διατηρησιμότητα αυτών στον χρόνο. Οι παράμετροι που εξετάζονται σε αυτά τα πειράματα είναι η θερμοκρασία (140 και 160°C), τα διαφορετικά εγκλειστικά μέσα (MD:GA (1:0), MD:GA (4:1) και MD:GA (2:1)) και η περιεκτικότητα των παραγόμενων μικροκαψουλών σε πυρήνα (5 %, 10% και 20% core). Αναλυτικά οι παράμετροι που εξετάστηκαν σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Παράμετροι προς εξέταση στα πειράματα ξήρανσης με ψεκασμό

Είδος εκχυλίσματος	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)	Περιεκτικότητα core (%)	Θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης (°C)
Υδατικά <sup>i</sup>	1:0	10	160
	1:0	20	160
	2:1	10	160
Υδατικά <sup>ii</sup>	4:1	10	160
	1:0	10	140
	2:1	10	140
	4:1	10	140
Μίγμα Ακετόνης:Νερού (80:20)	1:0	10	140
	4:1	10	140
Μίγμα Αιθανόλης:Νερού (60:40)	4:1	5	140

i: Υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας ii: Υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας

Επιπλέον, παρασκευάστηκε, με βάση το ακετονικό εκχύλισμα, ελαιοδιάλυμα περιεκτικότητας 2,5% σε φαινολικά διτερπένια (καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη), ώστε να δοκιμαστεί η δυνατότητα εγκλεισμού αυτών σε μορφή ελαιοδιαλύματος. Το ελαιοδιάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή κόνεων με περιεκτικότητα σε έλαιο 5% και 10% σε θερμοκρασία 140°C με εγκλειστικό μέσο MD:GA (2:1) και γαλακτωματοποιητή tween 20, σε περιεκτικότητα 1% επί των ολικών στερεών.

Σχετικά με την εξέταση της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών συστατικών στις κόνεις, οι αναλύσεις αυτών επαναλαμβάνονται για τα υδατικά μεγάλης κλίμακας μετά από 6 μήνες και για τα υδατικά πειραματικής κλίμακας και τις κόνεις του ελαιοδιαλύματος μετά από 1 μήνα περίπου.

Επιπλέον, το ελαιοδιάλυμα περιεκτικότητας 2,5% σε φαινολικά διτερπένια αποτέλεσε την ελαιώδη φάση γαλακτωμάτων (o/w) που παρασκευάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν ο έλεγχος της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου σε τέτοιους φορείς. Τα γαλακτώματα αποθηκεύτηκαν σε κλιβάνους των 15 και των 37°C και αναλύθηκαν στην διάρκεια 21 ημερών, με σκοπό την εξέταση της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών συστατικών τους.

Τέλος, παρασκευάστηκε πυκνότερο ελαιοδιάλυμα, 5% σε φαινολικά διτερπένια, και χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή κρεμών (w/o). Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν ο έλεγχος της σταθερότητας των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου μέσα σε καλλυντικές φόρμουλες. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε μια κρέμα χωρίς τα βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου (κρέμα blank), μία κρέμα με εμπλουτισμένη την ελαιώδη φάση με το ελαιοδιάλυμα (κρέμα 1), μια κρέμα με εμπλουτισμένη την υδατική φάση με υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου (κρέμα 3) και μια κρέμα με εμπλουτισμένες και τις δύο φάσεις της με ελαιοδιάλυμα και υδατικό εκχύλισμα αντίστοιχα (κρέμα 2). Όλες οι κρέμες υποβλήθηκαν σε ταχείες αναλύσεις Folin-Ciocalteu και DPPH αλλά και σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για την εξέταση του περιεχομένου τους.

## Πρώτες ύλες, αντιδραστήρια και συσκευές

### Πρώτες ύλες

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων ήταν δεντρολίβανο από καλλιέργειες του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ». Η συγκομιδή έγινε τον Μάιο του 2019. Το δεντρολίβανο παρελήφθη απειλαιωμένο και αποξηραμένο μετά από διεργασίες υδρο-απόσταξης και ξήρανσης που έλαβαν χώρα σε άλλη διπλωματική.

### Αντιδραστήρια

Αρχικά, οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις του δεντρολίβανου ήταν ακετόνη, αιθανόλη και απιονισμένο νερό. Για την οξύνιση των διαλυτών και κατά συνέπεια την προστασία των φαινολικών διτερπενίων χρησιμοποιήθηκε ορθοφωσφορικό οξύ ( $H_3PO_4$ ) και για την αραίωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε επίσης ακετόνη, αιθανόλη ή απιονισμένο νερό ανάλογα την εκχύλιση. Για την καμπύλη αναφοράς των φαινολικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ (98% w/w) και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και διάλυμα ανθρακικού νατρίου που παρασκευάστηκε στα πλαίσια των πειραμάτων. Επίσης, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες έκλουσης νερό, ακετονιτρίλιο και μεθανόλη ποιότητας HPLC και βαθμού MS στους οποίους προστίθονταν τριφθοραιθανικό οξύ (Trifluoroacetic acid (TFA)) ή ορθοφωσφορικό οξύ ανάλογα τη μέθοδο ανάλυσης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε βουτανόλη για την πλύση της στήλης HPLC. Για τον εγκλεισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς εγκλεισμού μαλτοδεξτρίνη και αραβικό κόμμι. Ως επιφανειοδραστικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το Tween 20. Το έλαιο στο οποίο εγκλείστηκαν τα συστατικά του ακετονικού εκχυλίσματος (φαινολικά διτερπένια) ήταν καπρικό/καπρυλικό τριγλυκερίδιο (medium-chain triglyceride-MCT). Για την παρασκευή του γαλακτώματος χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον Tween 20, μίγμα μονογλυκεριδίων και αραιό αντιμικροβιακό διάλυμα αζιδίου του νατρίου (sodium azide) περιεκτικότητας 0,5%. Για τις αναλύσεις των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε διαλύτης ισοπροπανόλης και έγινε προσθήκη ορθοφωσφορικού οξέος για την οξύνιση και κατά συνέπεια την προστασία των φαινολικών διτερπενίων. Τέλος, για τις καλλυντικές φόρμουλες χρησιμοποιήθηκαν αμυγδαλέλαιο, λάδι αβοκάντο, έλαιο από καπρικό/καπρυλικό τριγλυκερίδιο, βουτυλενογλυκόλη, μελισσοκέρι, μίγμα γαλακτωματοποιητών φυτικής προέλευσης, ζελέ αλόης και flavor κεράσι. Ο γαλακτωματοποιητής φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα μίγμα πολυπεπτιδίων σίτου με παλμιτικό κάλιο (Potassium palmitol hydrolized wheat protein), εστέρα στεατικού οξέος με γλυκερίνη (Glyceryl stearate) και κετσαρυλικής αλκοόλης (cetearyl alcohol) Για τις αναλύσεις των κρεμών χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών ισοπροπανόλης και διμεθυλοσουλφοξειδίου (Dimethyl sulfoxide). Στα δείγματα αυτά προστέθηκε και ορθοφωσφορικό οξύ σε περιεκτικότητα 0,1% για την προστασία των φαινολικών διτερπενίων.

Στον πίνακα 11 καταγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η ονομασία του αντίστοιχου προμηθευτή.

Πίνακας 11. Αντιδραστήρια

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Προμηθευτής</b>
<b>Ακετόνη</b>	ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε.
<b>Αιθανόλη</b>	ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε.
<b>ορθοφωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Fisher chemical, Leicestershire, UK
<b>Γαλλικό οξύ</b>	Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey
<b>Folin-Ciocalteu</b>	Merck, Darmstadt, Germany
<b>Ανθρακικό νάτριο</b>	Mallinckrodt, St.Louis, Missouri
<b>DPPH</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
<b>Νερό ποιότητας HPLC</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>Ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>Μεθανόλη ποιότητας HPLC</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>Βουτανόλη ποιότητας HPLC</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>Ισοπροπανόλη ποιότητας HPLC</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>τριφθοραιθανικό οξύ (Trifluoroacetic acid (TFA))</b>	Firsher Chemical, Leicestershire, UK
<b>Μαλτοδεξτρίνη</b>	(Astron Chemicals SA, maltodextrin, MD, 18-20DE
<b>Αραβικό κόμμι</b>	Nexira Food France, Arabic gum, GA
<b>Tween 20</b>	Fisher Scientific
<b>Καπρυλικό τριγλυκερίδιο (medium-chain triglyceride)</b>	Cosmochem
<b>Distilled monoglycerides TYPE P(V) FINE POWDER</b>	Rikevita, Malaysia
<b>Αζίδιο του Νατρίου</b>	Acros Organics, New Jersey, USA
<b>Γαλακτωματοποιητής φυτικής προέλευσης (PHYTOCREAM 2000)</b>	SINEGRA
<b>Βουτυλενογλυκόλη</b>	Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΜΠ
<b>Λευκό Μελισσοκέρι</b>	ORESTIS CRAFT CENTER, Μοσχάτο
<b>Φαρμακευτικό Αμυγδαλέλαιο</b>	Εργαστήριο Zarbis
<b>Φυτικό έλαιο Αβοκάντο</b>	Athinarom
<b>Aloe Vera Gel</b>	ORESTIS CRAFT CENTER, Μοσχάτο
<b>Flavor κεράσι</b>	ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε.
<b>Διμέθυλοσουλφοξείδιο</b>	CARLO ERBA Reagents, Spain

### Συσκευές και όργανα

Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα και συσκευές.

Αρχικά, οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (ΧΤ 220Α, Precisa). Επίσης ζυγίσεις μεγαλύτερων ποσοτήτων πραγματοποιήθηκαν σε ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων.



Εικόνα 26. Ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Η ανάδευση των δοκιμαστικών σωλήνων πραγματοποιήθηκε με αναδευτήρα τύπου Vortex (ZX3, Velp).



Εικόνα 27. Αναδευτήρας τύπου Vortex

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους, σε σταθερή κλίση και με υπερήχους. Η εκχύλιση σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκε με πειραματική διάταξη που αποτελούνταν από έναν ανοξείδωτο, κυλινδρικό εκχυλιστήρα με εσωτερική διάμετρο 3 cm και ύψος 9 cm. Την διέλευση του υγρού διαλύτη μέσα από τον κυλινδρικό εκχυλιστήρα ρύθμιζε μία περισταλτική αντλία (Millipore, Bedford, Massachusetts).



Εικόνα 28. Σύστημα εκχύλισης με ανοξειδωτο εκχυλιστήρα και αντλία Millipore ογκομετρικό κύλινδρο συλλογής εκχυλίσματος (δεξιά) και το ποτήρι ζέσεως με διαλύτη (αριστερά)

Η διάταξη για την διεξαγωγή των εκχυλίσεων με υπερήχους αποτελούνταν από μια σφαιρική φιάλη εμβαπτισμένη σε λουτρό υπερήχων (Elmasonic S, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) έναν κάθετο ψυκτήρα και μεταλλικά στηρίγματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 29.



Εικόνα 29. Διάταξη για εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

Οι φωτομετρήσεις που απαιτούνταν στις διάφορες μεθόδους προσδιορισμού (Folin-Ciocalteu, DPPH) πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο Hitachi U29000.





Εικόνα 30. Φωτόμετρο Hitachi U29000

Οι συμπυκνώσεις των εκχυλισμάτων, για την μετέπειτα ξήρανση τους με ψεκασμό ή την ενσωμάτωση τους σε έλαιο, πραγματοποιήθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού (Rotary evaporator, Heidolph G1, Germany).



Εικόνα 31. Διάταξη περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotary evaporator)

Ο εγκλεισμός των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων σε μικροκάψουλες έγινε με ξήρανση με ψεκασμό και η διάταξη (SD-Büchi 190 Mini) αποτελούνταν από το διάλυμα τροφοδοσίας, τον σωλήνα τροφοδοσίας, τον εκνεφωτή, τον κύλινδρο ψεκασμού, το δοχείο συλλογής της καμένης σκόνης, το θερμοστοιχείο, τον κυκλώνα, το δοχείο συλλογής της σκόνης και το φίλτρο όπως φαίνεται στην Εικόνα 32.



Εικόνα 32. Διάταξη ξήρανσης με ψεκασμό

Οι αναλύσεις των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, των κόνεων, των γαλακτωμάτων αλλά και των καλλυντικών κρεμών έγιναν σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης που αποτελούνταν από αντλία βαθμωτής έκλουσης HP1100, ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany), συνδεδεμένο με στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm, Agilent, USA).



Εικόνα 33. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ο Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (CAT Unidrive 1000d, Paso Robles, California) χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση των εκχυλισμάτων τροφοδοσίας που προορίζονταν για ξήρανση με ψεκασμό αλλά και την προ-ομογενοποίηση του γαλακτώματος που εξετάστηκε ως φορέας όσον αφορά την διατήρηση των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου.



Εικόνα 34. Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας

Το γαλάκτωμα αυτό τελικώς παρασκευάστηκε μέσω ομογενοποίησης σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (APV SYSTEMS Albertslund, Denmark) ο οποίος φαίνεται στην Εικόνα 35.



Εικόνα 35. Ομογενοποιητής υψηλής πίεσης

Κατά τη διάρκεια της παρασκευής των καλλυντικών κρεμών εφαρμόστηκαν υπέρηχοι για την επίτευξη καλύτερης ομοιογένειας. Συγκεκριμένα το μοντέλο ήταν Vibra-Cell VCX 750 (20 kHz, 750 W) εξοπλισμένο με επεξεργαστή υπερήχων (Sonics and Materials Inc., Newtown USA) και probe διαμέτρου 13 mm κατασκευασμένο από κράμα τιτανίου Ti-6Al-4V.



Εικόνα 36. Διάταξη υπέρηχων Probe

Για την μέτρηση του pH των κρεμών χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (744 pH Meter, Metrohm). Έγινε καλιμπράρισμα του πεχάμετρου πριν από κάθε μέτρηση με δύο ρυθμιστικά διαλύματα ένα όξινο και ένα βασικό.



Εικόνα 37. Πechάμετρο

## Πειραματική διαδικασία και πειραματικές τεχνικές

### Εκχύλιση σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου

Στα πειράματα εκχύλισης με εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου τοποθετούνται στον ανοξείδωτο κυλινδρικό εκχυλιστήρα σταθερής κλίσης 20 g δεντρολίβανου. Στην είσοδο και την έξοδο του εκχυλιστήρα εφαρμόζουν πλαστικοί σωλήνες από τους οποίους διέρχεται ο διαλύτης προς τον εκχυλιστήρα μέσω της αντλίας και το εκχύλισμα από τον εκχυλιστήρα στον ογκομετρικό κύλινδρο συλλογής. Πιο αναλυτικά, μέσω της περισταλτικής αντλίας, ο διαλύτης εισέρχεται από την είσοδο του εκχυλιστήρα που βρίσκεται στο κάτω μέρος διαπερνά το φυτικό υλικό και το εκχύλισμα εξέρχεται από το πάνω μέρος του εκχυλιστήρα όπου και συλλέγεται σε ογκομετρικό κύλινδρο για μέτρηση του όγκου και προσδιορισμού της ροής. Ο διαλύτης έχει ρυθμιστεί να εισέρχεται από κάτω προς τα πάνω για να επιτυγχάνεται ομοιόμορφη διαβροχή του φυτικού υλικού. Ως διαλύτες στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν καθαρή ακετόνη, καθαρό απιονισμένο νερό και μίγμα αυτών σε αναλογία 80:20, με προσθήκη ορθοφωσφορικού οξέος σε περιεκτικότητα 0,1% του όγκου του

οργανικού διαλύτη. Η εκχύλιση λαμβάνει τέλος με την συλλογή 200 mL εκχυλίσματος καθώς έχει προσδιοριστεί ότι σε αυτό το σημείο επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση εκχύλισης.

Η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά πραγματοποιείται σε συνθήκες φιλικές προς το περιβάλλον (θερμοκρασία περιβάλλοντος) και δεν απαιτείται διαχωρισμός του εκχυλίσματος από το στερεό μειώνοντας έτσι το κόστος της εκχύλισης. Επιπλέον, παρουσιάζεται καθόλη τη διάρκεια της εκχύλισης διαφορά συγκέντρωσης στερεού υγρού. Το δυναμικό μεταφοράς μάζας από μία στερεή σε μία υγρή φάση είναι η διαφορά συγκέντρωσης. Εφόσον, στον εκχυλιστήρα κυκλοφορεί συνεχώς καθαρός διαλύτης, το δυναμικό μεταφοράς μάζας δεν θα γίνει ποτέ μηδέν και η εκχύλιση θα πραγματοποιηθεί μέχρι εξάντλησης του στερεού σε αντίθεση με την παραδοσιακή εκχύλιση με διαβροχή, όπου ο διαλύτης δεν ανανεώνεται και επιτυγχάνεται ισορροπία.

Ωστόσο, η εκχύλιση αυτή παρουσιάζει και μειονεκτήματα και συγκεκριμένα απαιτείται διεξοδική μελέτη με σκοπό την εύρεση της μέγιστης απόδοσης εκχύλισης καθώς διαφορετικά χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη και εκτός από το γεγονός ότι αραιώνεται το εκχύλισμα γίνεται και άσκοπη κατανάλωση διαλυτών επηρεάζοντας το περιβάλλον. Επιπρόσθετα, η χρήση της αντλίας αυξάνει το λειτουργικό κόστος και τέλος σε επίπεδο βιομηχανικής κλίμακας είναι χρονοβόρα η πάκτωση του εκχυλιστήρα.

### Εκχύλιση με υπερήχους

Στα πειράματα εκχύλισης με υπερήχους τοποθετούνται 10 g δεντρολίβανου σε 200 mL διαλύτη στην σφαιρική φιάλη, με σκοπό την επίτευξη αναλογίας υγρού-στερεού 20:1. Στο μίγμα διαλυτών προστίθεται και  $H_3PO_4$  σε περιεκτικότητα 0,1% του όγκου του οργανικού διαλύτη (ακετόνη ή αιθανόλη αντίστοιχα). Η προσθήκη αυτή γίνεται για την προστασία των φαινολικών διτερπενίων. Τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για αυτού του τύπου τις εκχυλίσεις ήταν ακετόνη:νερό σε αναλογία (80:20) και αιθανόλη:νερό σε αναλογία (60:40). Τα πειράματα διεξάγονται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία καθώς είναι επιθυμητό αυτή να βρίσκεται κάτω από τη θερμοκρασία βρασμού των διαλυτών. Για τον σκοπό αυτό ανά 10 min πραγματοποιείται αλλαγή του νερού του λουτρού με σκοπό την διατήρηση της θερμοκρασίας ( $T < 50$  °C).

### Ξήρανση με ψεκασμό

Αρχικά αναφέρεται ότι η συνολική ποσότητα στερεών στο γαλάκτωμα προς ξήρανση διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα και ήταν της τάξης του 30% (g στερεών/100 g γαλακτώματος). Όσον αφορά την περιεκτικότητα του γαλακτώματος σε ενεργό συστατικό, εν προκειμένω το εκχύλισμα δεντρολίβανου, μελετήθηκαν διαφορετικές περιεκτικότητες της τάξεως του 5, 10 και 20% των συνολικών στερεών (g ενεργού συστατικού/100 g στερεών στο γαλάκτωμα).

Για την παρασκευή του γαλακτώματος στην περίπτωση που θα παρασκευαστούν κόνεις με μίγμα φορέων αρχικά προστίθεται ορισμένη ποσότητα αραβικού κόμμεος σε ορισμένη ποσότητα θερμού απεσταγμένου νερού. Η θερμοκρασία του μίγματος διατηρείται κάτω από τους 50 °C και το μίγμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση. Αφού επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση αυτού (20-25 min), προστίθεται η ανάλογη ποσότητα μαλτοδεξτρίνης και η ανάδευση συνεχίζεται διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία μέχρι τη δημιουργία διαυγούς διαλύματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το έκαστον εκχύλισμα δεντρολίβανου, στην ανάλογη πειραματική περιεκτικότητα, και το διάλυμα επωάζεται σε ψύξη κατά τη διάρκεια της νύχτας, για να επιτευχθεί καλύτερη ενυδάτωση των φορέων. Το πλέον ενυδατωμένο μίγμα αφού



αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) οδηγείται προς γαλακτωματοποίηση με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (UnidriveX 1000, CAT) για 15 min στις 15000 rpm.

Αμέσως μετά την διεργασία της ομογενοποίησης, το γαλάκτωμα οδηγείται προς ξήρανση στον ξηραντήρα ψεκασμού (Spray Dryer-Büchi 190 Mini) όπου και βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση μέχρι το πέρας της διαδικασίας. Στην περίπτωση των πειραμάτων που αφορούσαν εγκλεισμό ελαιοδιαλύματος η προσθήκη αυτού έγινε κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και όχι την προηγούμενη ημέρα κατά την παρασκευή του διαλύματος φορέων. Επιπλέον, σε αυτά τα γαλακτώματα προστέθηκε πριν την ομογενοποίηση και γαλακτωματοποιητής tween 20 σε περιεκτικότητα 0,1% επί των ολικών στερεών.

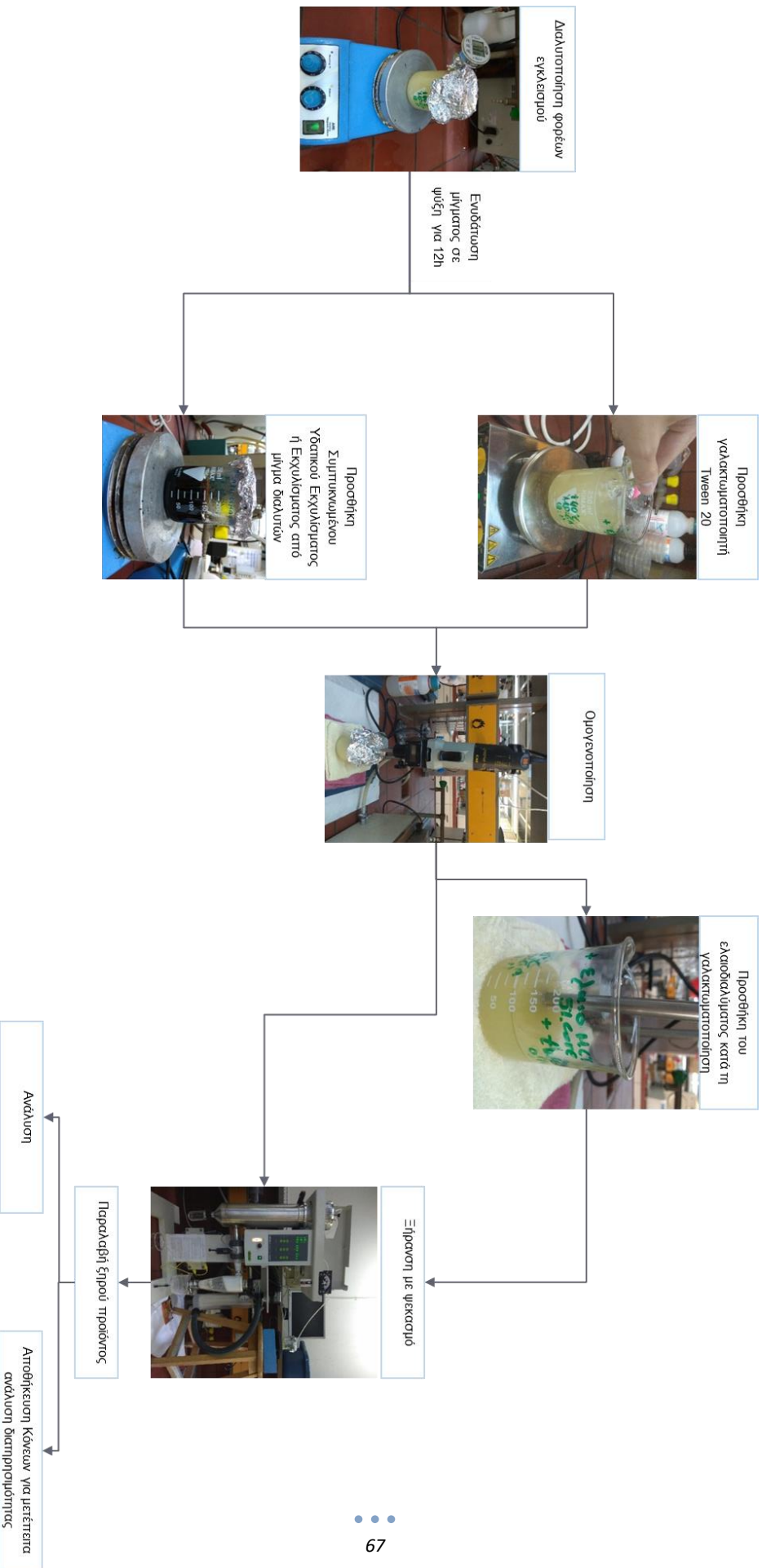
Οι παράμετροι λειτουργίας του ξηραντήρα είναι:

- 1) η θερμοκρασία εισόδου αέρα ( $T_{\text{εισόδου}}$ ), ως προς την οποία εξετάστηκαν δύο διαφορετικές τιμές, 140 και 160 °C αντίστοιχα,
- 2) η θερμοκρασία εξόδου αέρα ( $T_{\text{εξόδου}}$ ) η οποία κυμάνθηκε στους 70-85 °C στην περίπτωση των 140°C και στους 85-100°C για  $T_{\text{εισόδου}}=160$  °C,
- 3) η πίεση εκνέφωσης, ( $P_{\text{ατομοποίησης}}$ ) η οποία διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα και ίση με 5 bar,
- 4) η θερμοκρασία τροφοδοσίας γαλακτωμάτων ( $T_{\text{τροφοδοσίας δ/τος}}$ ), η οποία ήταν 25 °C
- 5) και ο ρυθμός τροφοδοσίας γαλακτώματος, ο οποίος σε κάθε πείραμα ρυθμιζόταν και παρέμενε σταθερός στο σημείο που επιτυγχανόταν η επιθυμητή θερμοκρασία εξόδου.

Με την ολοκλήρωση της διεργασίας, το τελικό προϊόν συλλέγεται και ένα μέρος του χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύεται σε πολυστρωματική συσκευασία από OPP 20 μm/Adhesive/PET MET 12 μm/Adhesive/PE 75 μm σε διαστάσεις 12,5 x 16,5 cm (Βλάχου Αφοί. ΑΒΕ). Η συσκευασία σφραγίζεται αεροστεγώς, και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μελλοντική ανάλυση.

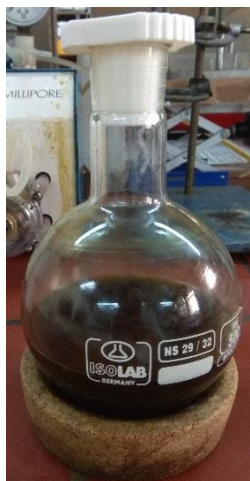
Παρακάτω φαίνεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του εκάστοτε μίγματος ή γαλακτώματος τροφοδοσίας σε μορφή διαγράμματος (Διάγραμμα 1). Στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων ή των μιγμάτων δεν προστέθηκε γαλακτωματοποιητής και έγινε η ενσωμάτωση τους αμέσως μετά την διαλυτοποίηση των φορέων εγκλεισμού. Αντίθετα, στην περίπτωση του ελαιοδιαλύματος προστέθηκε γαλακτωματοποιητής και κατά την ομογενοποίηση έγινε η προσθήκη του ελαίου, όπως προαναφέρθηκε.





Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής διαδικασίας παραγωγής μίγματος ή γαλακτώματος τροφοδοσίας προς ξήρανση με ψεκασμό

## Ελαιοδιαλύματα και Γαλακτώματα



Εικόνα 38. Ελαιοδιάλυμα

Τα ελαιοδιαλύματα, 2,5 και 5% σε φαινολικά διτερπένια και συγκεκριμένα καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, παρασκευάστηκαν προσθέτοντας την απαραίτητη ποσότητα καπρικού/καπρυλικού τριγλυκεριδίου (MCT) σε ακετονικά εκχυλίσματα και οδηγώντας τα προς πλήρη εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξάτμιστήρα.

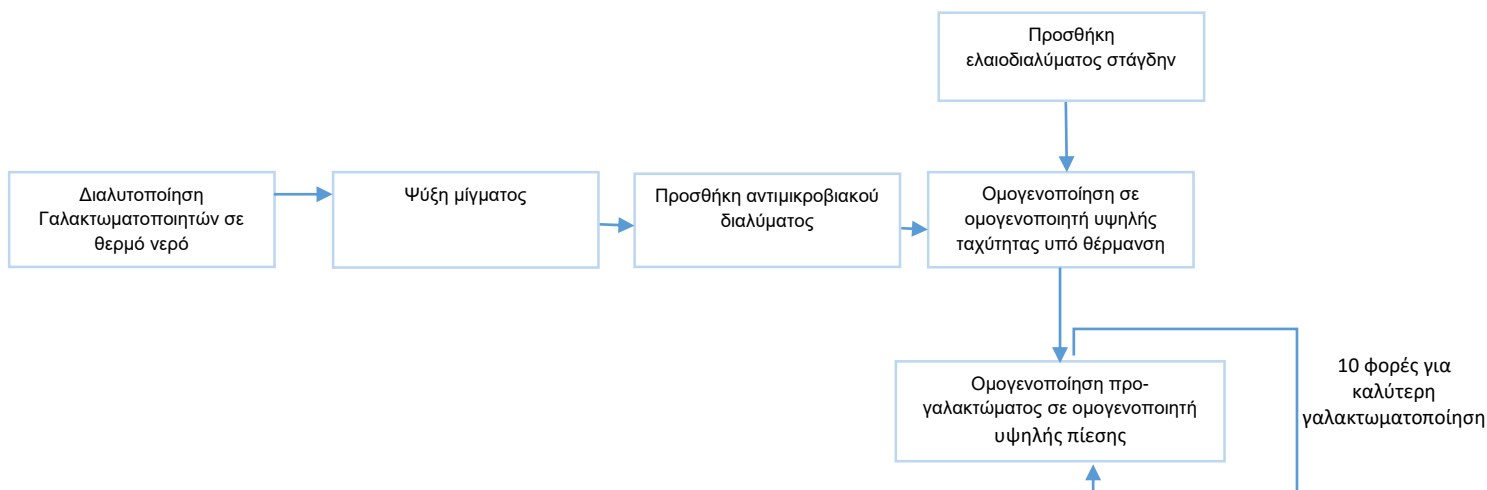
Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε αραιό γαλάκτωμα με 8% (w/w) ελαιώδη φάση, 1,5% υδρόφιλο γαλακτωματοποιητή (Tween 20), 1,5% λιπόφιλο γαλακτωματοποιητή ("Distilled monoglycerides"), 0,01% αντιμικροβιακό παράγοντα και το υπόλοιπό νερό. Συγκεκριμένα σε 244 g θερμό H<sub>2</sub>O διαλυτοποιήθηκαν 6 g Tween 20. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6 g από το μίγμα μονογλυκεριδίων που πρώτα διαλυτοποιήθηκαν σε 32 g θερμού νερού υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την ψύξη του μίγματος προστέθηκαν 80 g αραιό αντιμικροβιακό διάλυμα αζιδίου του νατρίου (sodium azide) 0,5%. Το μίγμα υπό ταυτόχρονη θέρμανση οδηγήθηκε σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (high speed homogenizer) με 15.000 min<sup>-1</sup> όπου και προστέθηκαν στάγδην και υπό έντονη ανάδευση 32 g από το ελαιοδιάλυμα που παρασκευάστηκε προηγουμένως. Η ομογενοποίηση διήρκησε 15 min. Εν συνεχεία το προ-γαλάκτωμα οδηγήθηκε σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (high pressure) με σκοπό την παρασκευή γαλακτώματος. Η εφαρμοζόμενη πίεση ήταν 700 bar. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 10 φορές με σκοπό την καλύτερη γαλακτωματοποίηση και τη μείωση της διαμέτρου των σταγονιδίων.



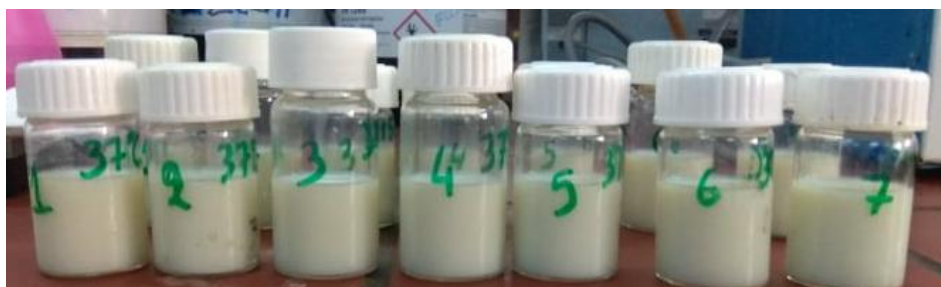
Εικόνα 39.  
Γαλάκτωμα μετά  
από ταχεία δοκιμή  
σταθερότητας  
μέσω  
φυγοκέντρησης

Αρχικά, το γαλάκτωμα υποβλήθηκε σε ταχεία δοκιμή σταθερότητας μέσω φυγοκέντρησης για 20 min σε 3500 rpm σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge). Καθώς δεν προκλήθηκε σπάσιμο του γαλακτώματος (βλέπε Εικόνα 39) συμπεραίνεται ότι πιθανότατα παρασκευάστηκε γαλάκτωμα υψηλής σταθερότητας. Επιπρόσθετα, το γαλάκτωμα εξετάστηκε οπτικά με μικροσκόπιο φωτός (DM750P, Leica, Wetzlar, Germany). Μερικές σταγόνες του δείγματος τοποθετήθηκαν σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με γυάλινη καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν κάτω από το μικροσκόπιο. Τα ελαιοσταγονίδια βρίσκονταν σε καλή διασπορά στο γαλάκτωμα και είχαν μέγεθος της τάξης των μm.

Ορισμένη ποσότητα (10 g) του γαλακτώματος τοποθετήθηκε σε φιαλίδια με σκοπό την μελέτη διατηρησιμότητας των συστατικών του στο περιβάλλον (προσομοίωση σε κλίβανο των T=15 °C) αλλά και σε κλίβανο των 37 °C (πείραμα επιταχυνόμενης γήρανσης). Η διατηρησιμότητα ελέγχθηκε μέσω χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συγκρίνοντας το αρχικό ελαιοδιάλυμα αλλά και τις επιμέρους μετρήσεις του γαλακτώματος με τον χρόνο. Συγκεκριμένα 2 mL γαλακτώματος αραιώνονται σε φιάλη των 10 mL μέχρι την χαραγή με διάλυμα ισοπροπανόλης (0,1% σε H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Με το πέρασμα των ημερών στις αναλύσεις αυξάνεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε γαλάκτωμα (3 mL σε τελικό όγκο 10 mL γαλακτώματος και διαλύτη) λόγω της υποβάθμισης αυτού.



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ροής παρασκευής γαλακτώματος



Εικόνα 40. Γαλακτώματα πριν την εισαγωγή τους σε κλιβάνους

### Καλλυντικές φόρμουλες

Αναφορικά με την σύνθεση των κρεμών η ελαιώδης φάση των κρεμών αποτελείται από αμυγδαλέλαιο, λάδι αβοκάντο και καπρικό/καπρυλικό τριγλυκερίδιο (κρέμες blank και 3) ή ελαιοδιάλυμα καπρικού/καπρυλικού τριγλυκεριδίου με εγκλεισμένα φαινολικά διτερπένια (κρέμες 1 και 2). Το ελαιοδιάλυμα προστέθηκε στις συνθέσεις ώστε το καρνοσόλη και η καρνοσόλη να βρίσκονται σε περιεκτικότητα 0,05% στο τελικό προϊόν. Η υδατική φάση αποτελείται από ζελέ αλόης και στην περίπτωση των κρεμών 2 και 3 και από υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου. Αυτό προστέθηκε στις κρέμες σε τέτοια ποσότητα ώστε το ροσμαρινικό οξύ να βρίσκεται σε περιεκτικότητα 0,1% στα τελικά σκευάσματα. Οι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις δοκιμές ήταν το μελισσοκέρι, η βουτυλενογλυκόλη και ένας μίγμα γαλακτωματοποιητών φυτικής προέλευσης. Οι γαλακτωματοποιητές είναι καθοριστικοί για τον τύπο του γαλακτώματος που παρασκευάζεται δηλαδή αν είναι ο/w ή w/o. Στην περίπτωση που οι γαλακτωματοποιητές διαλύονται ευκολότερα στο νερό τότε δημιουργείται γαλάκτωμα τύπου ο/w. Εν προκειμένω οι γαλακτωματοποιητές παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με την λιπαρή φάση και οι κρέμες που παρασκευάζονται είναι γαλακτώματα τύπου w/o.

Οι περιεκτικότητες (% w/w) καταγράφονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Σύσταση κρεμών

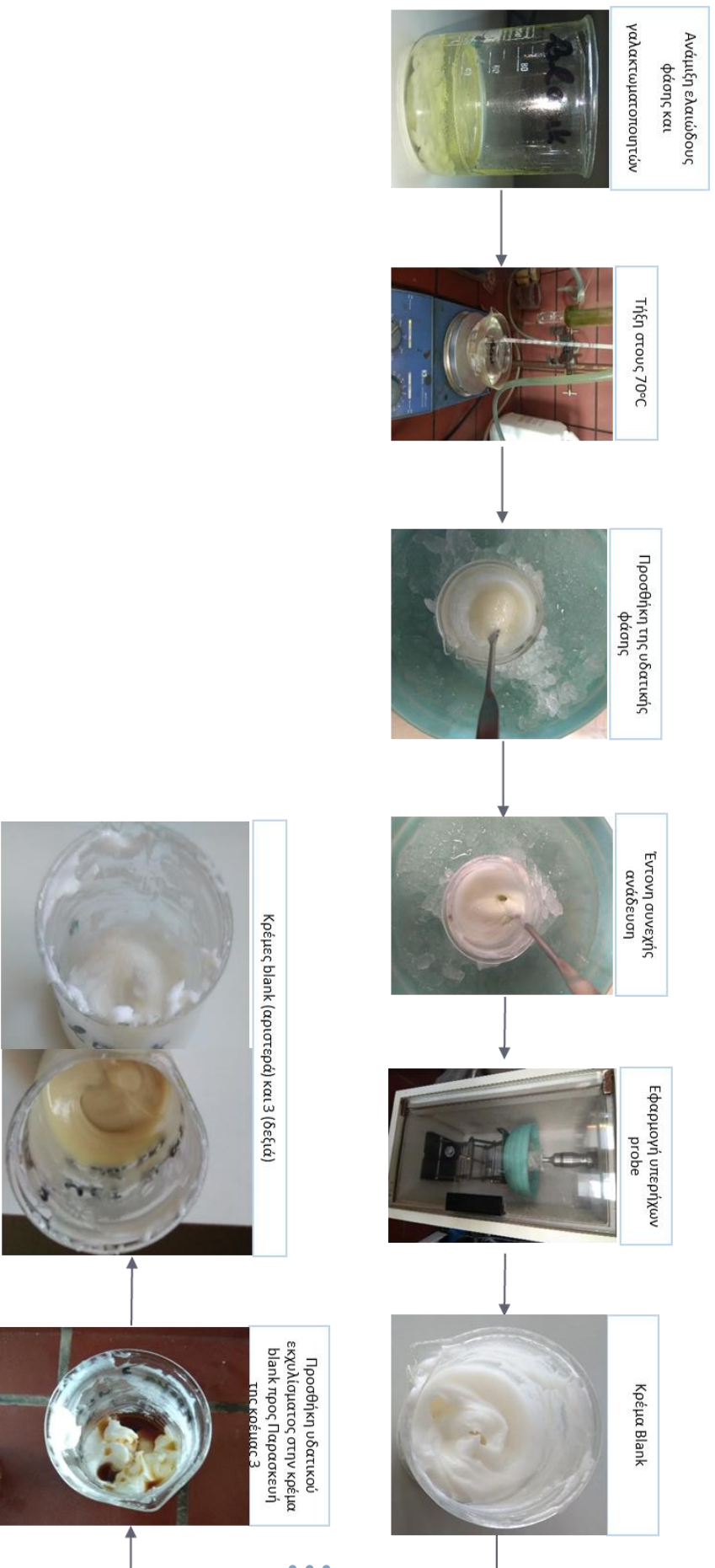
Συστατικά	Περιεκτικότητα (% w/w)	
	Κρέμα Blank & 1	Κρέμα 2 & 3
<b>Αμυγδαλέλαιο</b>	21,51	21,35
<b>Λάδι αβοκάντο</b>	9,73	9,66
<b>Καπρυλικό τριγλυκερίδιο (ακέραιο ή ως ελαιοδιάλυμα με εγκλεισμένα φαινολικά διτερπένια)</b>	10,00	9,93
<b>Βουτυλενογλυκόλη</b>	3,92	3,89
<b>γαλακτωματοποιητής φυτικής προέλευσης με προσμίξεις</b>	3,92	3,89
<b>Μελισσοκέρι</b>	3,92	3,89
<b>Ζελέ αλόης</b>	47,01	46,67
<b>Υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου</b>	0,00	0,72

Η ελαιώδης φάση μαζί με τους γαλακτωματοποιητές θερμαίνονται σε υδατόλουτρο μέχρι θερμοκρασία  $T=70^{\circ}\text{C}$  όπου και επιτυγχάνεται η τήξη των γαλακτωματοποιητών. Στη συνέχεια το μίγμα αποσύρεται από τη θέρμανση και σε αυτό προστίθεται η υδατική φάση της κρέμας (αλόη) και υφίσταται έντονη ανάδευση μέσα σε παγόλουτρο όπου και επιτυγχάνεται η γαλακτωματοποίηση της κρέμας. Οι κρέμες οδηγούνται σε υπερήχους probe για 2 min, στην συνέχεια χωρίζονται και προστίθεται το flanoγ κεράσι αλλά και το υδατικό εκχύλισμα στις 2 εξ αυτών (κρέμα 2 και 3) και επαναλαμβάνονται οι υπερήχοι για ακόμη 2 min. Αναφέρεται ότι αρχικά γίνεται η παρασκευή της κρέμας 1 και της κρέμας blank, οι οποίες χωρίζονται κατά το ήμισυ και παρασκευάζονται δύο νέες κρέμες (κρέμα 2 και 3 αντίστοιχα) με την προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε διασπορά. Στον πίνακα 13 έχουν καταγραφεί τα βιοδραστικά συστατικά που έχει η κάθε καλλυντική σύνθεση. Ακολουθούν τα διαγράμματα ροής των κρεμών στις επόμενες σελίδες.

Πίνακας 13. Βιοδραστικά συστατικά κάθε παρασκευασθείσας καλλυντικής σύνθεσης

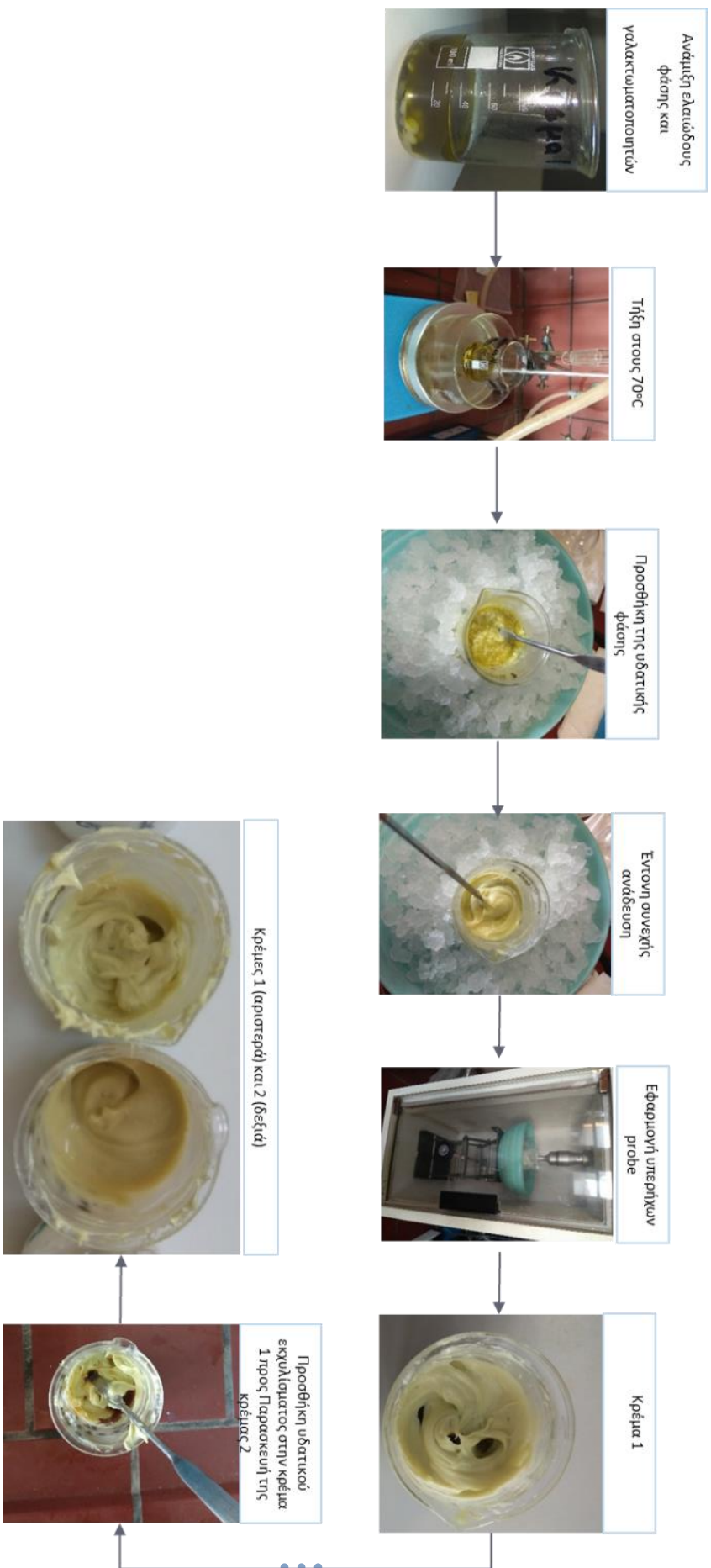
Κρέμα	Βιοδραστικά συστατικά δεντρολίβανου
<b>Blank</b>	-
<b>1</b>	Φαινολικά διτερπένια
<b>2</b>	Φαινολικά διτερπένια Ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή
<b>3</b>	Ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή

Ακολουθούν τα διαγράμματα ροής των κρεμών στις επόμενες σελίδες.



Διάγραμμα 3. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή των κρεμών Blank και 3





Διάγραμμα 4. Διάγραμμα ροής για την παρασκευή των κρεμών 1 και 2



## Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH των σκευασμάτων 0,1 g της κάθε κρέμας διαλύονται σε 10 mL απιονισμένου νερού και μετράται το pH του διαλύματος με πεχάμετρο.

## Ανάλυση βιοδραστικών συστατικών στις κρέμες

Η ανάλυση γίνεται με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και συγκεκριμένα 0,5 g δείγματος διαλυτοποιούνται σε 5 mL διαλύματος ισοπροπανόλης:DMSO (0,1% σε H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Επιπρόσθετα, έγιναν και αναλύσεις Folin-Ciocalteu και DPPH.

## Αναλυτικές μέθοδοι

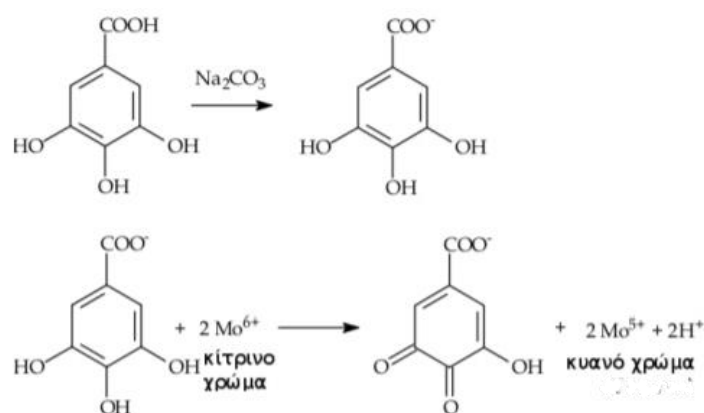
### Προσδιορισμός υγρασίας δεντρολίβανου

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας του δεντρολίβανου τοποθετούνται δείγματα των 5 g δεντρολίβανου σε φούρνο (Binder, Germany) στους 100 °C για 24 h. Ακολουθεί επαναζύγιση των δειγμάτων και η υγρασία προκύπτει από την διαφορά της μάζας προς την αρχική μάζα των δειγμάτων.

$$\text{Υγρασία δεντρολίβανου \%} = \frac{\Delta m}{\text{αρχική μάζα δεντρολίβανου}} \cdot 100\%$$

### Προσδιορισμός ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου, ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) και φωσφο-βολφραμικά (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Συγκεκριμένα το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) και του μολυβδαινίου (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 765 nm και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων [Bancuta et al., 2016].



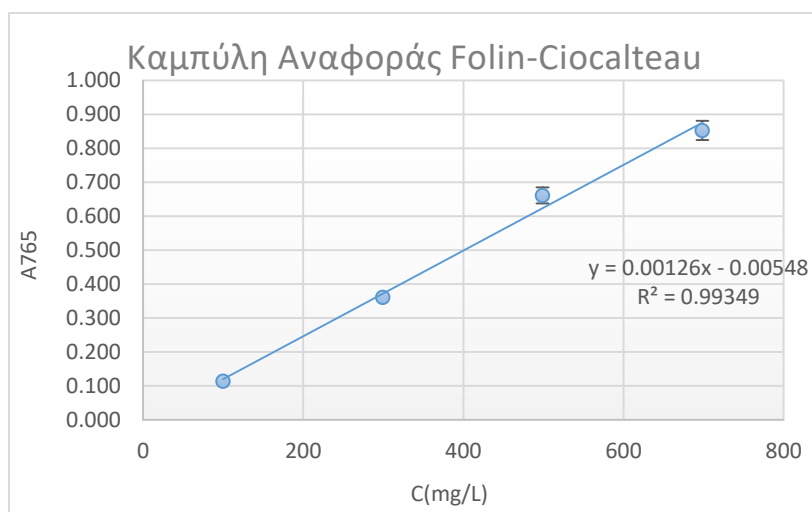
Εικόνα 41. Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e<sup>-</sup>

Η επίτευξη του αλκαλικού περιβάλλοντος επιτυγχάνεται με την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Για την παρασκευή αυτού, σε 800 mL απιονισμένο νερό διαλυτοποιούνται 200 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου με τη βοήθεια ήπιας ανάδευσης και θέρμανσης σε θερμαντική πλάκα. Η θέρμανση του διαλύματος συνεχίζεται έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το ανθρακικό νάτριο και επιτευχθεί ήπιος βρασμός. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο για 24 h με σκοπό τον σχηματισμό κρυστάλλων. Την επόμενη ημέρα, προστίθενται επιπλέον κρύσταλλοι ανθρακικού νατρίου αν είναι απαραίτητο. Τέλος, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και το διήθημα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L, όπου και πληρώνεται με απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  έως την χαραγή. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την μέτρηση των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 7.9 mL απιονισμένο νερό, 0.1 mL από κατάλληλα αραιωμένο εκχύλισμα δεντρολίβανου που έχει παρασκευαστεί με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε εκχύλιση και 0.5 mL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Μετά από χρονικό διάστημα επώασης 30 sec - 8 min προστίθεται 1.5 mL κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο και ένα τυφλό δείγμα στο οποίο αντί για 0.1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος τοποθετούνται 0.1 mL απιονισμένου νερού, για την διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης που οφείλεται στην πιθανή απορρόφηση των αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επώάζονται για 2 h απουσία φωτός, καθώς το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu θεωρείται φωτοευαίσθητο και στη συνέχεια αναδεύονται με χρήση vortex. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 765 nm σε φωτόμετρο (Hitachi U29000). Για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με την χρήση γαλλικού οξέος ως φαινολικό υπόστρωμα. Αρχικά, για την παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος, προστέθηκαν 199.6 mg γαλλικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL και ακολούθησε διαλυτοποίηση αυτών με 20 mL αιθανόλη ( $\text{EtOH}$ ) και στην συνέχεια έγινε προσθήκη απιονισμένου νερού ως την χαραγή (stock διάλυμα συγκέντρωσης C). Στη συνέχεια, σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, προστέθηκαν 1, 3, 5 και 7 mL από το stock διάλυμα γαλλικού οξέος και ακολούθησε αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Έτσι, προέκυψαν διαλύματα με περιεκτικότητες που φαίνονται στον πίνακα 14 και με την μέθοδο Folin-Ciocalteu πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση τους στα 765 nm, οπότε και από τις τιμές των απορροφήσεων κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς, με εξίσωση  $A = 0,00126 \cdot C_{\text{φαινολών}} - 0,00547$  και γραμμικότητα  $R^2=0.993$  ( Διάγραμμα 5).

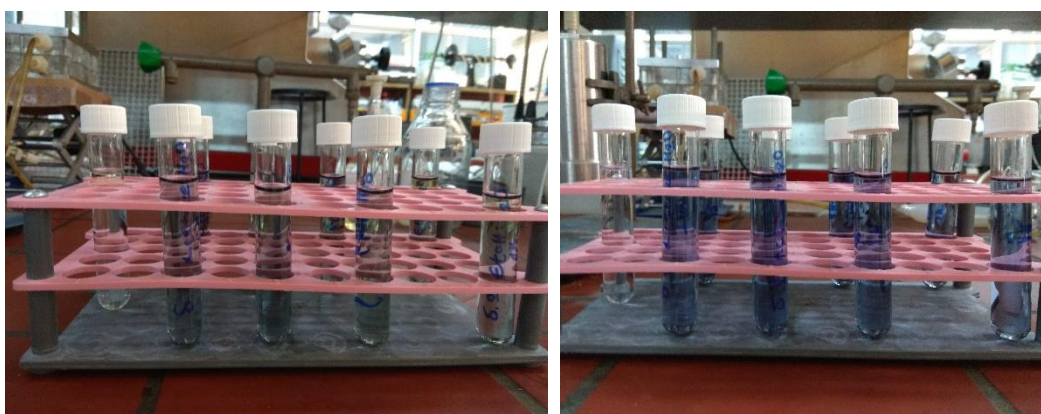
Πίνακας 14. Δεδομένα για Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu

Hitachi	C (mg/L)	$A_{765}$ (1)	$A_{765}$ (2)	$\bar{A}_{765}$	s.d.
0.1C	99,8	0,112	0,117	0,115	0,004
0.3C	299,4	0,360	0,363	0,362	0,002
0.5C	499,0	0,678	0,645	0,662	0,023
0.7C	698,6	0,873	0,833	0,853	0,028
C <sup>a</sup>	998,0	1,003	1,087	1,045	0,059

a: το πειραματικό σημείο δεν συμπεριλήφθηκε στην καμπύλη αναφοράς του διαγράμματος 5.



Διάγραμμα 5. Καμπύλη Αναφοράς Folin-Ciocalteu



Εικόνα 42. Δείγματα πριν και μετά την επώαση κατά την δοκιμή Folin-Ciocalteu

### Ανάλυση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

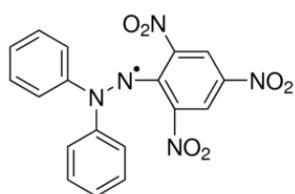
Τα φαινολικά συστατικά των δειγμάτων (εκχυλίσματα, κόνεις, γαλακτώματα και κρέμες) προσδιορίστηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Συγκεκριμένα, τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε στήλη αντιστρόφου φάσης ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, Agilent, USA) μετά από μικροδιήθηση (0.45  $\mu\text{m}$ , PVDF syringe filters, Teknokroma, Barcelona, Spain) και αναλύθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλογα τον τύπο εκχυλίσματος που αυτά προέρχονταν.

Η πρώτη μέθοδος αφορούσε τον προσδιορισμό των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών και στο εξής θα διακρίνεται με την ονομασία «Flav». Η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε από τους Merken & Beecher (2000) και τροποποιήθηκε από τους Tsimogiannis et al. (2007). Με την μέθοδο αυτή δύναται να προσδιοριστούν και τα φαινολικά διτερπένια αλλά όχι να ποσοτικοποιηθούν λόγω της υψηλής κατακράτησης τους στη στήλη.

Ως ροή διαλυτών μέσα στην στήλη επιλέχτηκε το 1 mL/min και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 70 min. Ο διαλύτης A ήταν νερό ποιότητας HPLC με 0,2% TFA, ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη ποιότητας HPLC με 0,2% TFA και ο διαλύτης C ήταν ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC με 0,2% TFA. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 90% A, 6% B και 4% C και με γραμμικές κλίσεις άλλαξε σε 85%A, 9% B και 6%C σε διάστημα 5min. Στη συνέχεια σε 71% A, 17,4% B και 11,6% C στα 30 min της ανάλυσης και σε 0% A, 85% B και 15% C από τα 60 min ως το τέλος της ανάλυσης. Στην περίπτωση των δειγμάτων (κρέμες, γαλακτώματα) που περιείχαν μη πολικές ενώσεις, όπως έλαια, χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της μεθόδου «Flan» η «Flan non polar» στην οποία υπήρχε και τέταρτος διαλύτης για πλύση της στήλης, η διάρκεια ανάλυσης ήταν 80 min και ο διαλύτης D ήταν βουτανόλη ποιότητας HPLC. Οι αντίστοιχες περιεκτικότητες στην σύνθεση της κινητής φάσης παραμένουν ίδιες με της μεθόδου “flan” για τα πρώτα 60 min της ανάλυσης. Στη συνέχεια για διάστημα 10 min από το 65° έως και το 75° λεπτό της ανάλυσης γίνεται πλύση της στήλης χρησιμοποιώντας 100% τον διαλύτη D με ροή 0,7 mL/min. Τέλος από το 76° λεπτό της ανάλυσης ως το πέρας αυτής η κινητή φάση αποτελείται από 85% B και 15% C με ροή 1 mL/min. Ο όγκος έγχυσης μεταβάλλονταν ανάλογα με το δείγμα, από 5 μL για το πιο πυκνά σε φαινολικά συστατικά δείγματα σε 10 και 20 μL για τα πιο αραιά. Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 280 nm.

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε τον προσδιορισμό των φαινολικών διτερπενίων και στο εξής θα διακρίνεται με την ονομασία «Carnosicref». Η συγκεκριμένη μέθοδος προτάθηκε από τους Okamura et al (1994). Η ροή των διαλυτών ορίζεται πάλι στο 1mL/min . Ο διαλύτης A ήταν νερό ποιότητας HPLC με 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και ο B διαλύτης ήταν ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC με 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Η αρχική σύνθεση της κινητής φάσης ήταν 40% A και 60% B και με γραμμική κλίση άλλαξε σε 0% A και 100% B σε διάστημα 16 min έως και τα 23 min διάρκειας της ανάλυσης. Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 230 nm για τα φαινολικά διτερπένια. Στην περίπτωση των δειγμάτων που περιείχαν μη πολικές ενώσεις όπως έλαια (κρέμες, γαλακτώματα) χρησιμοποιήθηκε παραλλαγή της μεθόδου «Carnosicref» η «Carnosic» στην οποία υπήρχε ως τρίτος διαλύτης η βουτανόλη ποιότητας HPLC για την πλύση της στήλης και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 40 min. Οι αντίστοιχες περιεκτικότητες στην αρχική σύνθεση της κινητής φάσης αρχικά ήταν 40% A και 60% B για τα πρώτα 16 min της ανάλυσης και μεταβάλλονταν σε 100% C στα 17 min της ανάλυσης ως τα 20 min. Στη συνέχεια μεταβαλλόταν η ροή του διαλύτη σε 0,8mL/min στα 21 min της ανάλυσης και συνεχιζόταν η πλύση της στήλης με τον διαλύτη C ως τα 32 min. Στα 32 min η κινητή φάση πλέον αποτελούνταν 100% από τον διαλύτη B με την ίδια ροή και στα 33 min η σύνθεση των διαλυτών ξανά μεταβάλλονταν σε 40% A και 60% B με ροή 1mL/min. Η ποσοτικοποίηση των επιμέρους ενώσεων βασίστηκε σε καμπύλες αναφοράς που έχουν κατασκευαστεί για χαρακτηριστικές ουσίες κάθε κατηγορίας, στα προαναφερθέντα μήκη κύματος για κάθε μέθοδο.

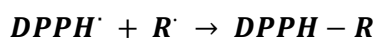
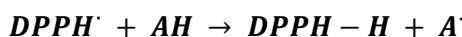
#### Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH



Εικόνα 43. Δομή της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η δοκιμή DPPH, όπως καλείται αλλιώς η μέτρηση της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίου ή προτάθηκε από τον Blois το 1958 και τροποποιήθηκε από τους Brand-Williams et al. το 1995. Είναι μία από τις πιο δημοφιλείς και συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων καθώς είναι σχετικά οικονομική, απλή και ταχεία. [Akar et al., 2017] Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην φασματομετρική μέτρηση της αποικοδόμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH κατά την αντίδραση

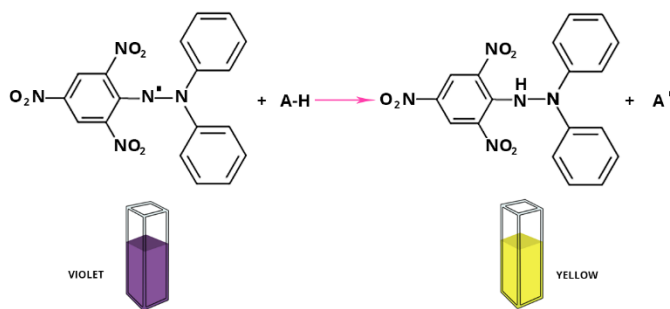
της με ένα αντιοξειδωτικό [Fadda et al., 2014]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αντιδράσεις σύμφωνα με τους Brand-Williams et al. (1995).



Η μέθοδος μετρά την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μειώνουν την ελεύθερη ρίζα 2,2-διφαινυλ-πικρυλυδραζιλίου (DPPH<sup>·</sup>), μία ρίζα που δεν απαντάται συνήθως στα βιολογικά συστήματα. [Moharram et al., 2014] Πιο αναλυτικά, η DPPH<sup>·</sup> είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα αζώτου, εμπορικά διαθέσιμη, που εμφανίζει χαρακτηριστική μωβ χρώση και ισχυρή απορρόφηση στα 515 nm. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μετατρέπουν τη ρίζα DPPH<sup>·</sup> σε ένα πιο σταθερό μόριο DPPH και συγκεκριμένα την ανάγουν σε 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίνη, δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Συνεπώς, παρατηρείται αλλαγή χρώματος από μωβ σε ανοιχτό κίτρινο, το οποίο επιτρέπει τον φωτομετρικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Συγκεκριμένα, ο βαθμός αποχρωματισμού του διαλύματος είναι ανάλογος της αντιοξειδωτικής δράσης του δείγματος [Akar et al., 2017].

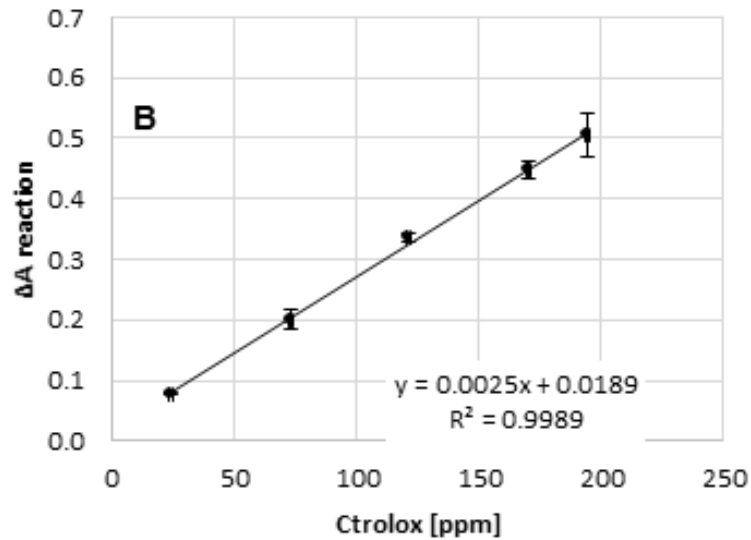
### 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl

### 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine



Εικόνα 44. Η αρχή της ικανότητας δέσμευσης των ριζών DPPH

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων αλλά και των καλλυντικών κρεμών αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH. Για τον σκοπό αυτό, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 0,0025 g DPPH και μεθανόλη. Ακολουθεί ανακίνηση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του DPPH και πλήρωση της φιάλης με μεθανόλη ως την χαραγή. Στην συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 3,9 mL του διαλύματος DPPH και 100 μL κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος, με παράλληλη παρασκευή τυφλού διαλύματος στο οποίο προστίθεται 100 μL του εκάστοτε διαλύτη. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 30 min. Τονίζεται ότι επειδή το αντιδραστήριο είναι φωτοευαίσθητο, τόσο το διάλυμα όσο και τα προς εξέταση δείγματα, διατηρούνταν στο σκοτάδι κατά τη διάρκεια της επώασης. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται σε φωτόμετρο στα 515 nm, αφού πρώτα γίνει μηδενισμός του οργάνου με καθαρή μεθανόλη. Για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η εξής καμπύλη αναφοράς:  $\Delta A = 0,0025 \cdot a \cdot C_{\text{antiox}} + 0,0189$  με  $R^2 = 0,9989$  όπου  $\Delta A = A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}$ , a: ο βαθμός αραιώσης του δείγματος και  $C_{\text{antiox}}$  σε mg<sub>antiox</sub>/L.



Διάγραμμα 6. Καμπύλη αναφοράς DPPH

### Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα

Για τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας της εκχύλισης, αλλά και την μετέπειτα κατεργασία των εκχυλισμάτων για την παραγωγή κόνεων είναι απαραίτητη η εύρεση της απόδοσης της σε στερεά συστατικά. Ο προσδιορισμός των στερεών υπολειμμάτων πραγματοποιείται με την εξής διαδικασία. Σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζονται 2 γυάλινα φιαλίδια και στην συνέχεια τοποθετούνται 5 mL του εκχυλίσματος σε καθένα από αυτά. Πραγματοποιείται ξήρανση σε φούρνο (Binder, Germany) στους 100 °C για χρονικό διάστημα 24 h και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρα για 20 min. Στη συνέχεια τα δείγματα ζυγίζονται και πάλι σε αναλυτικό ζυγό και η προκύπτουσα διαφορά μάζας των φιαλιδίων αντιστοιχεί στην μάζα των στερεών στα 5mL εκχυλίσματος. Έτσι, η συγκέντρωση των στερεών στο εκχύλισμα σε g/L προκύπτει πολλαπλασιάζοντας την προκύπτουσα διαφορά μάζας επί 200 ώστε να προσδιοριστούν τα στερεά στο 1L.

$$C_{\text{στερεών}} = \Delta m \cdot 200$$

### Προσδιορισμός υγρασίας κόνεων

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας των κόνεων τοποθετούνται 0,5 g σκόνης σε φούρνο (Binder, Germany) στους 100 °C για 3 h. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρα για 20 min και ακολουθεί η επαναζύγιση τους. Η διαφορά της μάζας που προκύπτει οφείλεται στην απομάκρυνση του νερού που περιέχονταν στις μικροκάψουλες. Η υγρασία υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$\text{Υγρασία σκόνης \%} = \frac{\Delta m}{\text{αρχική μάζα σκόνης}} \cdot 100\%$$

### Προσδιορισμός απόδοσης και αποτελεσματικότητας μικροεγκλεισμού

Για τον υπολογισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total phenolic content, TPC), δηλαδή των πολυφαινολών που έχουν εγκλειστεί στον πυρήνα της μικροκάψουλας (core)



αλλά και αυτών που βρίσκονται στην επιφάνεια αυτής (wall), σε 1 g σκόνης προσθέτονται 10 mL απιονισμένου H<sub>2</sub>O. Το δείγμα υφίσταται ανάδευση με συσκευή vortex για περίπου 30 s με σκοπό την διαλυτοποίηση της σκόνης. Στη συνέχεια προσθέτονται 15 mL αιθανόλης με σκοπό την κατακρήμνιση του εγκλειστικού μέσου. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και στην συνέχεια διήθηση με φίλτρα μικροπόρων 0,45 μm. Με αυτόν τον τρόπο έχει διαλυτοποιηθεί όλη η μικροκάψουλα (core & wall) και το δείγμα αναλύεται με την ίδια μέθοδο HPLC με το αρχικό εκχύλισμα. Η απόδοση μικροεγκλεισμού (microencapsulation yield, MEY(%)) προσδιορίζεται ως προς το αρχικό εκχύλισμα το οποίο έχει προηγουμένως αναλυθεί μέσω υγρής χρωματογραφίας. Η απόδοση των βιοδραστικών συστατικών που προσδιορίζονται βρίσκεται από τον εξής τύπο:

$$\text{MEY \%} = \frac{\text{Ενεργό συστατικό στην μικροκάψουλα } \left(\frac{g}{100 g \text{ στερεών}}\right)}{\text{Ενεργό συστατικό στο αρχικό μίγμα τροφοδοσίας } \left(\frac{g}{100 g \text{ στερεών}}\right)} \cdot 100\%$$

### Προσδιορισμός αποτελεσματικότητας εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό του επιφανειακού φαινολικού περιεχομένου (surface phenolic content, SPC), δηλαδή των πολυφαινόλων που βρίσκονται στην επιφάνεια της μικροκάψουλας (wall), υπολογίστηκε με βάση τους Tolun et al. (2016) με κάποιες τροποποιήσεις στην μέθοδο. Συγκεκριμένα, 1 g σκόνης εκπλύθηκε με 10 mL μίγματος αιθανόλης:μεθανόλης (1:1 v/v) και αναδεύτηκε σε vortex για 1 min. Στη συνέχεια το δείγμα υπέστη διήθηση με φίλτρα πόρων 0,45 μm.

Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί εν τέλει να προσδιοριστεί μέσω αφαίρεσης το φαινολικό περιεχόμενο της μικροκάψουλας στο εσωτερικό αυτής και κατά συνέπεια η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού (microencapsulation efficiency, MEE (%)) από τον τύπο:

$$\text{MEE \%} = \frac{TPC - SPC}{TPC} \cdot 100\% \rightarrow$$

$$\text{MEE \%} = \frac{\text{Εγκλεισμένο ενεργό συστατικό στον πυρήνα της μικροκάψουλας} \cdot 100\%}{\text{Ενεργό συστατικό στην μικροκάψουλα}}$$

Η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού είναι μια σημαντική παράμετρος καθώς καθορίζει τη σταθερότητα του ξηρού προϊόντος και την επιθυμητή ελεγχόμενη απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών.

## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

### Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών δεντρολίβανου

Στο πλαίσιο μελέτης της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου και σε λουτρό υπερήχων. Οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μίγμα ακετόνης:νερού (80:20), μίγμα αιθανόλης:νερού (60:40), ακετόνη 100% και νερό 100%. Μέσω της ανάλυσης Folin-Ciocalteu προσδιορίστηκε η απόδοση της κάθε εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μέσω της δοκιμής DPPH και πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) αυτών, που σκοπό είχε την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των συστατικών τους.

### Απόδοση εκχυλίσεων σε φαινολικά συστατικά

Στον πίνακα 15 καταγράφονται τα αποτελέσματα που έδωσε η δοκιμή Folin-Ciocalteu όσον αφορά όλους τους τύπους εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν στην παρούσα διπλωματική.

Πίνακας 15. Ποσοτικοποίηση ολικών φαινολών μέσω Folin-Ciocalteu, σε εκχυλίσματα που ελήφθησαν με διάφορες μεθόδους

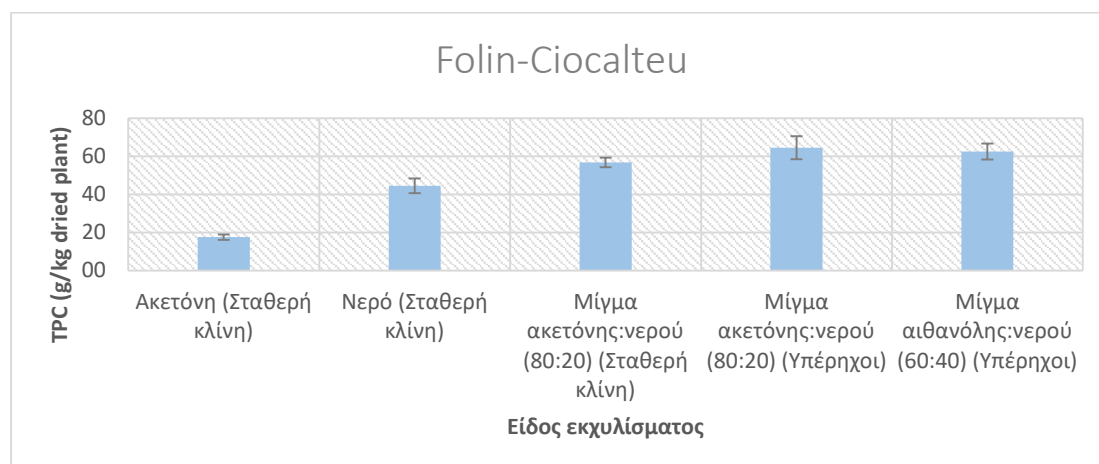
Εκχύλισμα	C <sub>επί ξηρού εκχυλίσματος</sub> (g GAE/kg)	C <sub>επί ξ.β. Φυτού</sub> (g GAE/kg)
Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Σταθερή κλίνη)	223,8±14,7	56,8±2,6
Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Υπέρηχοι)	267,8±19,4	64,5±6,0
Μίγμα Αιθανόλης : Νερού 60:40 (Υπέρηχοι)	262,8±21,0	62,5±4,2
Ακετονικό (Σταθερή κλίνη)	162,3±16,0	17,5±1,4
Υδατικό (Σταθερή κλίνη)	196,2±5,9	44,5±3,8

Αρχικά, αναφέρεται ότι πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εκχυλίσεις σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου με ακετόνη και νερό αλλά και εκχυλίσεις με μίγμα αυτών σε αναλογία (80:20). Είναι φανερό ότι η χρήση μίγματος διαλυτών δίνει καλύτερα αποτελέσματα με βάση την δοκιμή Folin-Ciocalteu, καθώς εκχυλίζονται με αυτό τον τρόπο και τα πολικά και τα μη πολικά βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου. Τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από διαδοχικές εκχυλίσεις της φυτόμαζας αποτελούν καλύτερη επιλογή μόνο στην περίπτωση που απαιτείται διαχωρισμός των πολικών και μη συστατικών.

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης Folin-Ciocalteu, παρατηρείται όσον αφορά τις εκχυλίσεις με μίγμα ακετόνης:νερού 80:20 ότι με χρήση υπερήχων αυξάνεται η απόδοση σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με την εκχύλιση σε σταθερή κλίνη.

Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση εκχυλισμάτων που έγιναν με χρήση υπερήχων αλλά με διαφορετικούς διαλύτες. Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες προέκυψε παρόμοια χρησιμοποιώντας ως διαλύτες εκχύλισης ακετόνη και νερό, σε αναλογία 80:20, σε σχέση με αιθανόλη και νερό, σε αναλογία 60:40.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που αναφέρονται σε συγκέντρωση TPC σε g/kg ξηρού φυτού, η οποία έχει την έννοια της απόδοσης της εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά, προκύπτει ότι η εκχυλιζόμενη ποσότητα με οποιοδήποτε από τα δύο μίγματα ανέρχεται περίπου σε 63 g GAE/kg ξηρής πρώτης ύλης.



Διάγραμμα 7. Συγκέντρωση ολικών φαινολών σε g/ kg ξηρού φυτού με βάση τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε εκχυλίσματα παραλαμβανόμενα με διαφορετικούς διαλύτες και μέθοδο εκχύλισης

#### Ανάλυση DPPH σε εκχυλίσματα

Στον πίνακα 16 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση κάθε τύπου εκχυλίσματος που παρασκευάστηκε στην παρούσα διπλωματική. Οι συγκεντρώσεις δίνονται σε ισοδύναμα trolox ανά kg ξηρού εκχυλίσματος και ανά kg ξηρού φυτού, με βάση την δοκιμή DPPH.

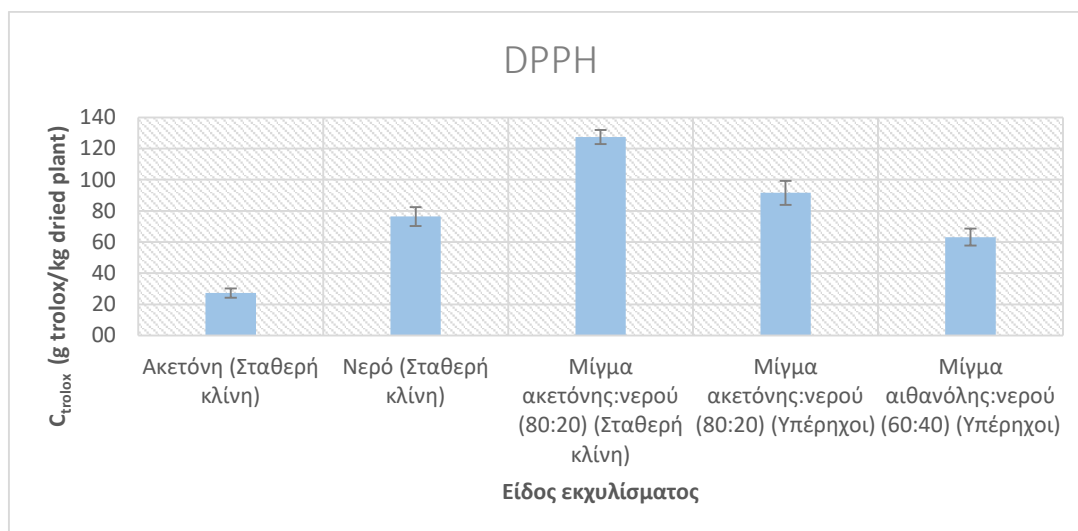
Πίνακας 16. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg) για κάθε τύπο εκχυλίσματος

Εκχύλισμα	Ξηρού εκχυλίσματος (g Trolox/kg)	Σεπί ξ.β. Φυτού (g Trolox/kg)
<b>Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Σταθερή κλίνη)</b>	522,4±18,8	127,3±4,5
<b>Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Υπέρηχοι)</b>	361,9±29,6	91,6±7,7
<b>Μίγμα Αιθανόλης : Νερού 60:40 (Υπέρηχοι)</b>	261,2±21,6	63,2±5,5
<b>Ακετονικό (Σταθερή κλίνη)</b>	234,1±31,3	27,2±2,9
<b>Υδατικό (Σταθερή κλίνη)</b>	338,9±18,0	76,3±6,1

Οι διαδοχικές εκχυλίσεις με καθαρή ακετόνη και καθαρό νερό δίνουν εκχυλίσματα με μικρότερη αντιοξειδωτική δράση αθροιστικά, σε σχέση με την εκχύλιση με μίγμα ακετόνης:νερού (80:20) σε σταθερή κλίνη, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι στην περίπτωση που δεν απαιτείται ο διαχωρισμός είναι πολύ πιο οικονομική, ταχεία και πιο εκλεκτική η εκχύλιση με μίγμα διαλυτών, αφού σε αυτή εκχυλίζονται όλα τα απαραίτητα αντιοξειδωτικά συστατικά.

Σχετικά με τον τρόπο εκχύλισης, παρατηρείται ότι εκχυλίσματα που προέκυψαν με υποβοήθηση από υπερήχους έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση, έναντι αυτών που προέκυψαν σε κλίνη ημιδιαλείποντος έργου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι με τους υπερήχους αυξάνεται η θερμοκρασία και υποβαθμίζεται σε κάποιο βαθμό το εκχύλισμα, συγκριτικά με την εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου που γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Συγκρίνοντας τώρα τους διαλύτες εκχύλισης, φαίνεται ότι το μίγμα ακετόνης:νερού υπερτερεί στην εκλεκτικότητα εκχύλισης αντιοξειδωτικών ενώσεων σε σχέση με το μίγμα αιθανόλης:νερού. Επιπλέον, τα μίγματα διαλυτών εκχυλίζουν μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών ενώσεων σε σχέση με το νερό ή την ακετόνη μεμονωμένα.



Διάγραμμα 8. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg ξηρού φυτού) σε εκχυλίσματα παραλαμβανόμενα με διαφορετικούς διαλύτες και μέθοδο εκχύλισης

### Στερεό υπόλειμμα στα εκχυλίσματα και εκλεκτικότητα εκχύλισης

Τα ολικά στερεά παρόλο που δεν αποτελούν κριτήριο προσδιορισμού καλύτερου διαλύτη εκχύλισης ή καλύτερης μεθόδου εκχύλισης, καθώς σε αυτά περιλαμβάνονται και στερεά που δεν αποτελούν συστατικά ενδιαφέροντος, είναι απαραίτητο να υπολογιστούν για τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας της εκχύλισης.

Με βάση την ανάλυση στερεών υπολειμμάτων, προκύπτει ότι το μίγμα διαλυτών ακετόνης:νερού εκχυλίζει μεγαλύτερη μάζα ολικών στερεών, όταν η εκχύλιση γίνεται σε σταθερή κλίνη και όχι με χρήση υπερήχων. Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα αναφορικά με την μάζα των εκχυλιζόμενων ολικών στερεών, ανεξάρτητα από το είδος του μίγματος διαλυτών (ακετόνη : νερό και αιθανόλη : νερό). Με τις διαδοχικές εκχυλίσεις (ακετόνη και στη συνέχεια νερό) προφανώς η συνολική εκχυλιζόμενη μάζα στερεών είναι μεγαλύτερη.

Η εκλεκτικότητα της εκχύλισης, ορίζεται ως ο λόγος της απόδοσης σε φαινορικά συστατικά προς την απόδοση σε ολικά στερεά. Η μονάδα μέτρησης αυτής είναι g GAE/g ολικών στερεών. Στον πίνακα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όσον αφορά την εκλεκτικότητα του κάθε τύπου εκχύλισης που πραγματοποιήθηκε, εκφρασμένα σε %, με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Εκλεκτικότητα (\%)} = \frac{C_{TRC} \text{ επί } \xi.\beta.\text{φυτού}}{C_{\text{ολικών στερεών επί } \xi.\beta.\text{φυτού}}} \cdot 100\%$$

Πίνακας 17. Εκλεκτικότητα εκχύλισης

Εκχύλισμα	Σολικών στερεών επί ξ.β. φυτού (g/kg)	C επί ξ.β. Φυτού (g GAE/kg)	Εκλεκτικότητα εκχύλισης (%)
<b>Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Σταθερή κλίνη)</b>	254,1±12,5	56,8±2,6	22,3±0,6
<b>Μίγμα Ακετόνης : Νερού 80:20 (Υπερήχοι)</b>	240,0±31,2	64,5±6,0	26,9±2,5
<b>Μίγμα Αιθανόλης : Νερού 60:40 (Υπερήχοι)</b>	237,9±5,0	62,5±4,2	26,3±1,8
<b>Ακετονικό (Σταθερή κλίνη)</b>	118,5±10,2	17,5±1,4	14,8±1,2
<b>Υδατικό (Σταθερή κλίνη)</b>	226,3±14,1	44,5±3,8	19,6±1,7

Από τις τιμές του πίνακα 17 φαίνεται ότι με χρήση υπερήχων αυξάνεται η εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Συγκεκριμένα, πιο εκλεκτική εκχύλιση χαρακτηρίστηκε αυτή με μίγμα ακετόνης:νερού (80:20) στους υπερήχους, ενώ η λιγότερο εκλεκτική είναι αυτή με καθαρή ακετόνη στην σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους εκχύλισης, σε υπερήχους και σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου, με χρήση του ίδιου διαλύτη εκχύλισης, φαίνεται ότι με τους υπερήχους παραλαμβάνονται πιο εκλεκτικά τα φαινολικά συστατικά του δεντρολίβανου. Ακόμη, συγκρίνοντας του διαλύτες, νερό, ακετόνη και μίγμα αυτών σε αναλογία 80:20, προκύπτει ότι η ακετόνη είναι ο λιγότερο εκλεκτικός διαλύτης, ακολουθεί το νερό, ενώ με μίγμα αυτών παραλαμβάνονται πιο εκλεκτικά οι βιοδραστικές ενώσεις. Τέλος, το μίγμα αιθανόλης νερού παρουσιάζει παρόμοια εκλεκτικότητα με αυτό της ακετόνης νερού, όταν η εκχύλιση γίνεται σε λουτρό υπερήχων, με το δεύτερο να είναι λίγο πιο εκλεκτικό.

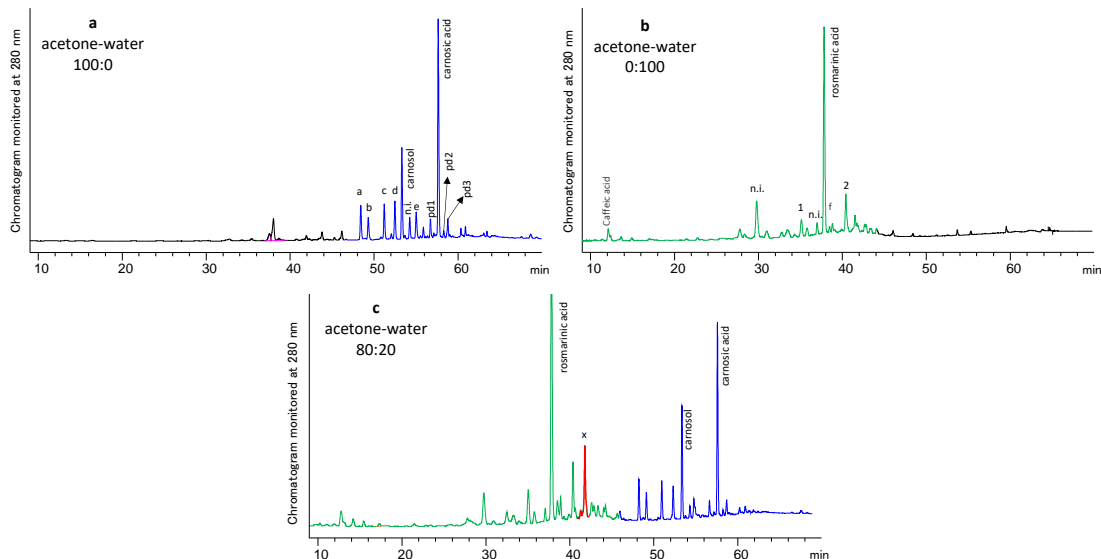
#### Ταυτοποίηση συστατικών μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Από διάφορες μελέτες έχουν ταυτοποιηθεί συγκεκριμένες ενώσεις που είναι παρούσες στο φυτό και η αναζήτηση γίνεται με βάση αυτά τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ανάλογα με τη χρωματογραφική μέθοδο (τους διαλύτες, την αναλογία αυτών, τη χρονική διάρκεια της μεθόδου κ.α.), μεταβάλλονται οι χρόνοι έκλουσης των ενώσεων και για τον λόγο αυτό δεν μπορεί να γίνει απόλυτη σύγκριση με βάση τη βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, η σειρά έκλουσης των συστατικών καθώς και το μοτίβο του χρωματογραφήματος παραμένει σταθερό και βάσει αυτών δύναται να γίνει η ταυτοποίηση.

Με ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) βρέθηκε ότι τα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου είναι το ροσμαρινικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη. Επιπλέον, στα συστατικά του δεντρολίβανου συγκαταλέγονται και φλαβονοειδή (αγλυκόνες και γλυκοζίτες), τα οποία όμως βρίσκονται σε πολύ μικρότερες περιεκτικότητες στο φυτό και επομένως αντιστοιχούν σε μικρότερες κορυφές στα χρωματογραφήματα. Η ταυτοποίηση του ροσμαρινικού οξέος, της καρνοσόλης και του καρνοσικού οξέος έγινε με χρήση πρότυπων ενώσεων και αντιστοίχιση των κορυφών των φασμάτων υπεριώδους και των χρόνων έκλουσης. Το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ παρουσίασαν τους ακόλουθους μέσους χρόνους έκλουσης με βάση το σύνολο των αναλύσεων μέσω της μεθόδου "flav": 35,31 ± 0,53 min, 53,14 ± 1,42 min και 55,40 ± 0,31 min αντίστοιχα.

### Ταυτοποίηση φλαβονοειδών

Στην Εικόνα 45 φαίνονται τα χρωματογραφήματα ενός ακετονικού εκχυλίσματος (a), ενός υδατικού εκχυλίσματος (b) και τέλος ενός εκχυλίσματος που προέκυψε από μίγμα διαλυτών ακετόνης: νερού (80:20) (c).



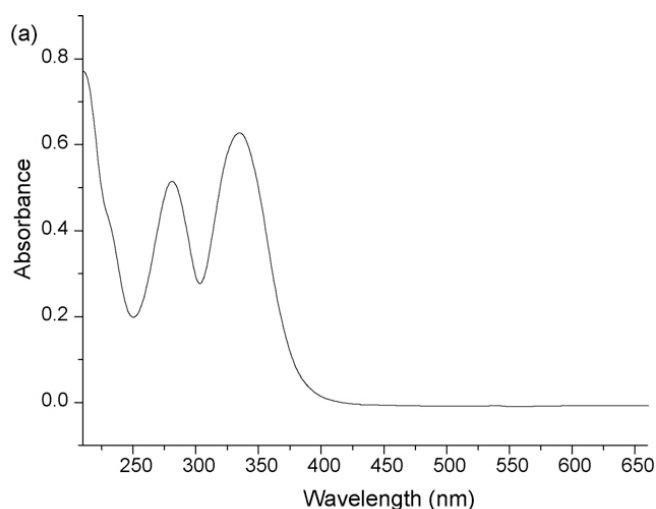
Εικόνα 45. Χρωματογραφήματα a) εκχυλίσματος ακετόνης:νερού (100:0) b) ακετόνης:νερού (0:100) c) ακετόνης:νερού (80:20)

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα φλαβονοειδή, η βιβλιογραφία εξετάστηκε όσον αφορά το πρότυπο έκλουσης των φλαβονοειδών (αγλυκόνων και γλυκοζιτών) [Almela et al., 2006; Borrás-Linares et al., 2014; Cuvelier et al., 1996; Del Baño et al., 2004; Mena et al., 2016; Mulinacci et al., 2011; Ozarowski et al., 2013]. Σε γενικές γραμμές, το ροσμαρινικό οξύ εκλύεται στη μέση των χρωματογραφήματων, τα φαινολικά διτερπένια (καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ) στο τέλος των χρωματογραφήματων, ενώ τα φλαβονοειδή εκλύονται από την αρχή των χρωματογραφήματων έως και πριν από την καρνοσόλη. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται δύο ζώνες έκλουσης φλαβονοειδών. Οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες εκλύονται στην πρώτη ζώνη έκλουσης, ενώ οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες στη δεύτερη. Οι δύο ζώνες μπορεί πολλές φορές να αλληλεπικαλύπτονται κυρίως μετά την έκλυση του ροσμαρινικού οξέος.

Με την εκχύλιση του δεντρολίβανου με ακετόνη ανακτώνται οι ενώσεις με τη χαμηλότερη πολικότητα. Στο χαρακτηριστικό χρωματογράφημα που απεικονίζεται στην Εικόνα 45a, είναι προφανές ότι τα ανακτώμενα διαχωρισμένα με κορυφές συστατικά εκλύονται στο τέλος του χρωματογραφήματος, λόγω της χαμηλής τους πολικότητας. Το κύριο συστατικό φαίνεται να είναι το καρνοσικό οξύ ακολουθούμενο από την καρνοσόλη. Επίσης, εντοπίστηκαν και άλλα φαινολικά διτερπένια σε ίχνη (pd1, pd2, pd3). Πολικές ενώσεις, όπως το ροσμαρινικό οξύ υπάρχουν σε ίχνη επίσης. Οι πέντε κορυφές «a» έως «e» παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά φάσματα υπεριώδους τύπου φλαβόνης, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 45, και δεδομένου ότι ανακτώνται με διαλύτη την ακετόνη, θεωρείται ότι είναι αγλυκόνες φλαβόνης. Μεταξύ των φλαβονών του δεντρολίβανου, είναι γνωστό ότι πολλά μέλη έχουν τρι-υδροξυ υποκατάσταση στον δακτύλιο A, και μονοϋδροξυ υποκατάσταση στον δακτύλιο B, όπως η σκουτελαρεΐνη (Scutellarein) (4',5,6,7-υδροξυλίωση).

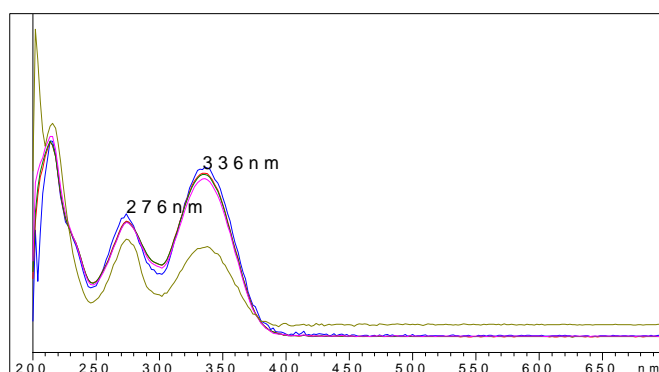


Η σκουτελαρεΐνη και τα παράγωγά της, παρουσιάζουν φάσματα UV όμοια με τις ενώσεις a, b και d των χρωματογραφημάτων που φαίνονται στην Εικόνα 45. Αυτή η θεώρηση συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με τα φάσματα υπεριώδους της σκουτελαρεΐνης και των παραγώγων που αναφέρονται σε μελέτες των Liu et al. (2018) και Ávila-Reyes et al. (2018).



Εικόνα 46. Φάσμα υπεριώδους της σκουτελαρεΐνης (*Scutellarein*)

Καθώς οι χρόνοι έκλουσης των κορυφών a, b και d είναι αρκετά υψηλοί, αυτό συνεπάγεται ότι μόνο μεθυλιωμένα παράγωγα της σκουτελαρεΐνης θα μπορούσαν να είναι υποψήφιες ενώσεις που αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες κορυφές. Η ισπιδουλίνη (*Hispidulin*) με μονο-μεθοξυ, τρι-υδροξυ υποκατάσταση θα μπορούσε να είναι μια πιθανή δομή για την κορυφή a. Συγκεκριμένα, το μέγιστο της ζώνης I της Ισπιδουλίνης έχει αναφερθεί μεταξύ 334-338 nm και το μέγιστο της ζώνης II αντίστοιχα μεταξύ 272-275 nm [Lee et al., 2015; Osei-Safo et al., 2009; Williams et al., 2003; Bojilov et al., 2017] ενώ οι αντίστοιχες τιμές της κορυφής a προσδιορίστηκαν στα 336 nm και 276 nm τιμές αρκετά κοντινές με τη βιβλιογραφία.

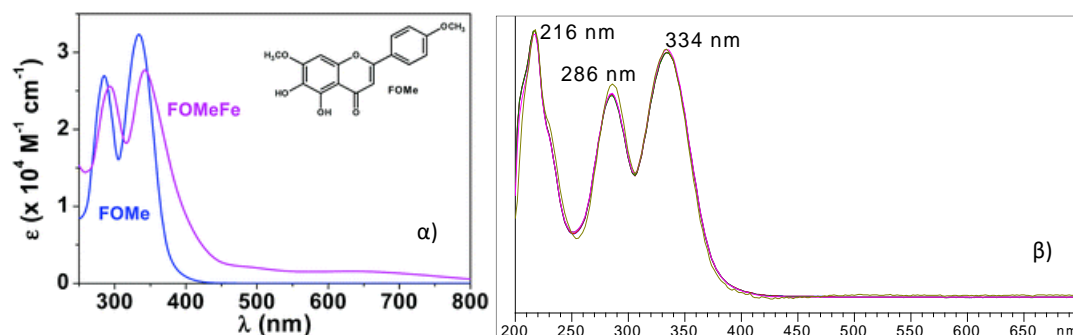


Εικόνα 47. Φάσμα υπεριώδους ένωσης a

Ένα πιο γνωστό παράγωγο της δι-μεθόξυ-σκουτελαρεΐνης στο δεντρολίβανο είναι η σιρσιμαριτίνη (*cirsimaritin* ή 6,7- δι-μεθόξυ-σκουτελαρεΐνη), της οποίας τα μέγιστα των δύο ζωνών κυμαίνονται μεταξύ 274-278 nm (Ζώνη II) και 334-336 nm (Ζώνη I). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Scoula et al. (2008) οι οποίοι ταυτοποίησαν φλαβονοειδή που είναι παρόντα σε ρίγανη, η σιρσιμαριτίνη (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone) παρουσιάζει μέγιστα στα 276 nm και 334 nm. Αντίστοιχα ήταν και τα ευρήματα των Herrero et al. (2010) σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου, όπου η σιρσιμαριτίνη ταυτοποιήθηκε με μέγιστα στα 274 nm και 334 nm. Τέλος, σε μελέτη των Almela et al. (2006) έγινε ταυτοποίηση των συστατικών

του δεντρολίβανου και η σιρσιμαριτίνη παρουσίασε μέγιστα στα 216 nm, 278 nm και 336 nm αντίστοιχα. Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι η κορυφή α θα μπορούσε να αντιστοιχεί είτε στην ισιδουλίνη είτε στην σιρσιμαριτίνη.

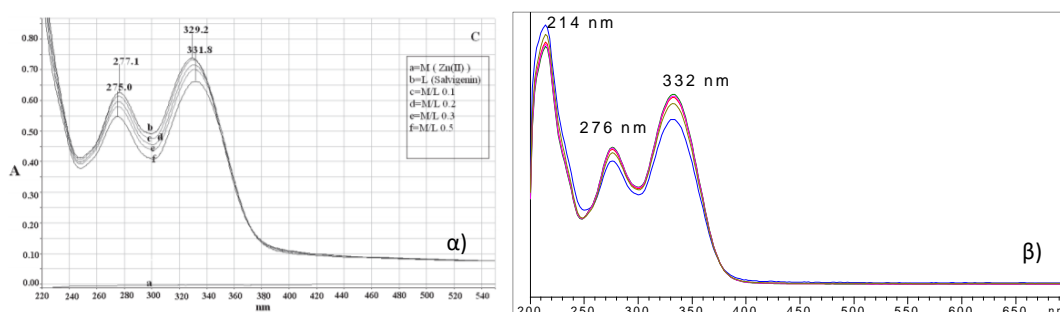
Η κορυφή β εκλούστηκε λιγότερο από 1 min μετά την κορυφή α, γεγονός που συνεπάγεται ότι η ένωση αυτή έχει παρόμοια πολικότητα με την ένωση α. Μια τρίτη μεθυλίωση της σκουτελαρεΐνης θα καθιστούσε την ένωση λιγότερο πολική και η έκλυση θα αναμενόταν αρκετά λεπτά αργότερα, για τον λόγο αυτό απορρίπτεται αυτή η εκδοχή. Η λαδανείνη (Ladanein ή 5,6-Dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone) είναι ένα παράγωγο διμεθυλ-σκουτελαρεΐνης, με μεθυλίωση στα 7- και 4'-υδροξύλια. Οι Martin-Benlloch et al. (2018) καθόρισαν για αυτή δύο μέγιστα στα 286 και 335 nm, τιμές που είναι πολύ κοντά στις αντίστοιχες που προέκυψαν (286, 334 nm). Επιπλέον, η εικόνα των δύο φασμάτων UV είναι πανομοιότυπη, υποδεικνύοντας ότι η κορυφή β μπορεί να αναγνωριστεί ως λαδανείνη.



Εικόνα 48. Φάσμα υπεριώδους της Λαδανείνης α) από βιβλιογραφία [Martin-Benlloch et al., 2018] β) προκύπτουν από χρωματογραφική ανάλυση

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Skoula et al. (2008), η λαδανείνη παρουσιάζει μέγιστα στα 286 και στα 337 nm και εκλύεται λιγότερο από 1 min αργότερα από την σιρσιμαριτίνη, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα η κορυφή α να αντιστοιχεί στην σιρσιμαριτίνη.

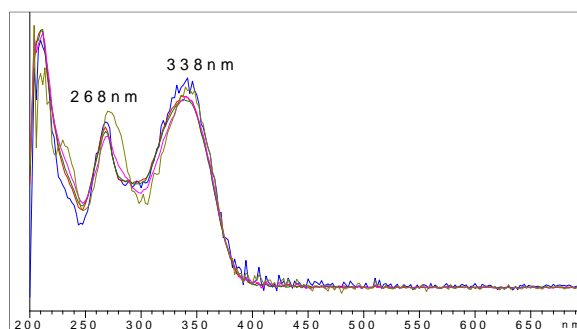
Η ένωση d είναι σαφώς λιγότερο πολική από τις α και β, αφού εκλύεται περισσότερο από 3 min μετά την κορυφή β. Το φάσμα UV της, που μοιάζει με σκουτελαρεΐνη, παρουσιάζει μέγιστα στα 276 και 332 nm. Ένα παράγωγο τριμεθυλ-σκουτελαρεΐνης θα μπορούσε να είναι υποψήφιο. Οι Martin-Benlloch et al. (2018) καθόρισαν για τη σαλβιγενίνη (salvigenin) δύο μέγιστα στα 276 και 332 nm, που προσεγγίζουν ακριβώς τα μέγιστα που προέκυψαν από την ανάλυση, καθώς και το μοτίβο φάσματος. Οι Del Pilar Sánchez-Camargo et al. (2014) καθόρισαν επίσης παρόμοιες τιμές, 276 και 331 nm ενώ οι Skoula et al. (2008) καθόρισαν για την 5-υδροξυ-6,7,4'-τριμεθόξυ-φλαβόνη (σαλβιγενίνη) την Ζώνη I στα 333 nm και την Ζώνη II στα 276 nm.



Εικόνα 49. Φάσματα σαλβιγενίνης α) από βιβλιογραφία [Moradkhani et al., 2012] β) από την χρωματογραφική ανάλυση

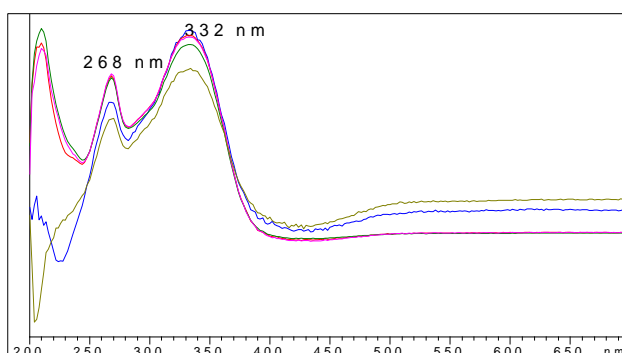
Οι ενώσεις c και e παρουσίασαν φάσματα τύπου απιγενίνης, η οποία παρουσιάζει φασματικά μέγιστα στα 268 και 338 nm. Η 4'-μεθυλ-απιγενίνη ή ακακετίνη (acacetin),

παρουσιάζει φάσμα τύπου απιγενίνης αλλά τα μέγιστα βρίσκονται στα 268 και 334 nm. Συνεπώς, η ένωση c θα μπορούσε να είναι ένα άλλο παράγωγο μονομεθυλιωμένης απιγενίνης, όπως η γενκβανίνη (Genkwainin). Η γενκβανίνη είναι ένα παράγωγο μονομεθυλιωμένης απιγενίνης, γνωστό συστατικό που ανιχνεύεται στο δεντρολίβανο [Almela et al., 2006; Del Baño et al., 2004; Cuvelier et al., 1996; Lee et al., 2015; Shu et al., 2014] με μέση τιμή μεγίστων στις παραπάνω αναφορές στα 268 και 338 nm, όπως στην κορυφή c (Εικόνα 50). Ο ελαφρώς υψηλότερος χρόνος έκλουσης της κορυφής c υποδεικνύει επίσης την γενκβανίνη σε σύγκριση με την ακακετίνη, κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί σύμφωνα με μελέτη των Anula et al. (2009), αναλύοντας εκχυλίσματα *Artemisia* που περιείχαν και τις δύο ενώσεις αντίστοιχα.



Εικόνα 50. Φάσμα γενκβανίνης (ένωση c) από την χρωματογραφική ανάλυση

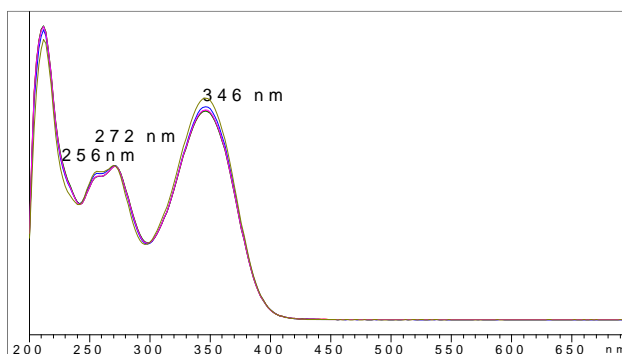
Η ένωση e, παρουσιάζει επίσης φάσμα τύπου απιγενίνης με  $\lambda_{\max}$  ίσα με 268 και 332 nm. Το χαρακτηριστικό της ένωσης είναι ότι αποτελεί το μόνο флаβονοειδές που εκλούεται μεταξύ καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος. Οι Cuvelier et al. (1996) καθώς και οι Almela et al. (2006) έχουν επίσης προσδιορίσει ένα флаβονοειδές που εκλούεται μεταξύ καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος. Και οι δύο ομάδες έχουν αναγνωρίσει την ένωση ως 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη (4'-Methoxytecto-chrysin) και οι τιμές  $\lambda_{\max}$  που προσδιορίστηκαν είναι αντίστοιχα 268, 332 nm και 270, 332 nm, που είναι πολύ κοντινές με των αναλύσεων. Η 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη έχει επίσης αναγνωριστεί από άλλους ερευνητές ως το μόνο флаβονοειδές που εκλούεται μεταξύ καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος [Mulinacci et al., 2011; Vaquero et al., 2012].



Εικόνα 51. Φάσμα 4-μεθόξυτεκτοχρυσίνης (ένωση e) από την χρωματογραφική ανάλυση

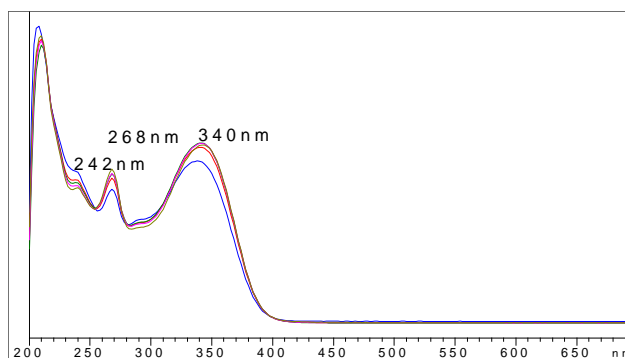
Με εκχύλιση του δεντρολίβανου με νερό ανακτώνται οι ενώσεις με την υψηλότερη πολικότητα και το αντίστοιχο χρωματογράφημα απεικονίζεται στην Εικόνα 45b. Το κύριο συστατικό είναι το ροσμαρινικό οξύ, ακολουθούμενο από δύο δευτερεύοντα και διάφορα άλλα συστατικά σε ίχνη. Η ένωση 1 παρουσιάζει φάσμα υπεριώδους τύπου λουτεολίνης με τιμές  $\lambda_{\max}$  προσδιοριζόμενες στα 272 και 346 nm. Η ένωση ταυτοποιήθηκε ως νεπιτρίνη (nepitrin ή 6-methoxyluteolin-7-glucoside) λόγω των τιμών  $\lambda_{\max}$  και του φασματικού μοτίβου που ταιριάζουν με τη βιβλιογραφία [Lee et al., 2018; Olennikov et al., 2019; Ren et al., 2014]

καθώς και την αναμενόμενη έκλυση πριν από το ροσμαρινικό οξύ [Lee et al., 2018; Ren et al., 2014].



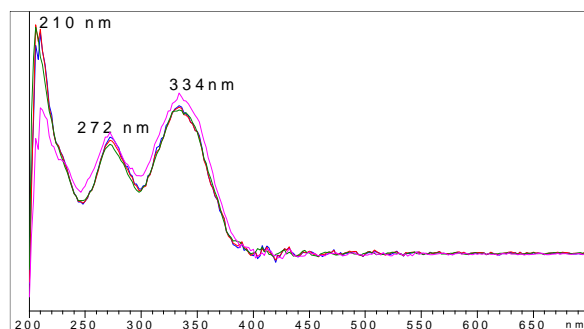
Εικόνα 52. Φάσμα φλαβονοειδούς (ένωση 1)

Η ένωση 2 παρουσιάζει φάσμα υπεριώδους τύπου φλαβόνης, με τα αντίστοιχα μέγιστα στα 268 και 340 nm. Η ένωση ταυτοποιήθηκε ως ισοσκοτελαρείνη (4',5,7,8-τετραϋδροξυφλαβόνη). Η ένωση αυτή έχει ανιχνευθεί επίσης από τους Cuvelier et al. (1996) ( $\lambda_{\max}$  268, 340 nm) και τους Almela et al. (2006) ( $\lambda_{\max}$  272, 340 nm) σε εκχυλίσματα δεντρολίβανου και εκλύεται λίγο μετά το ροσμαρινικό οξύ, όπως και στην προκειμένη περίπτωση. Η έκλυση της ισοσκοτελαρείνης συμφωνεί με την παραπάνω συζήτηση για τη σειρά έκλυσης των φλαβονών σύμφωνα με το σχήμα υδροξυλίωσής τους.

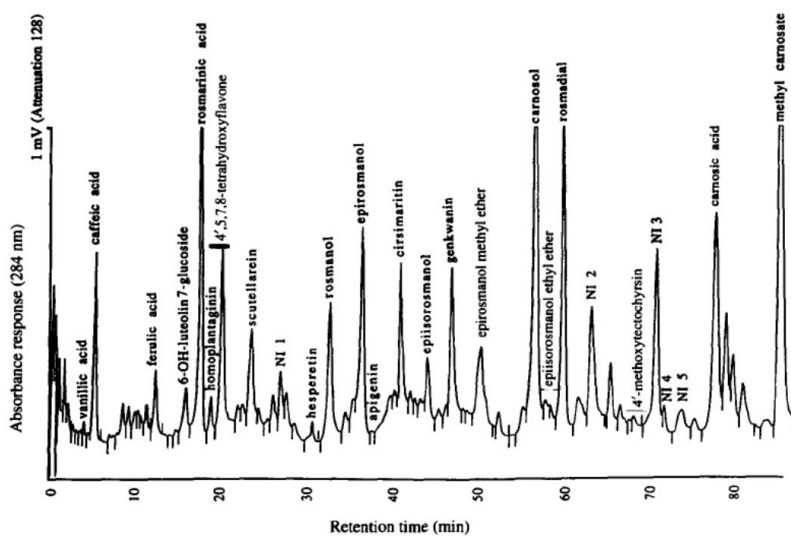


Εικόνα 53. Φάσμα φλαβονοειδούς (ένωση 2)

Όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα που προέκυψε με βάση τους Cuvelier et al. (1996) (Εικόνα 55), η ένωση που εκλύεται μετά από το ροσμαρινικό οξύ και πριν την 4',5,7,8-τετραϋδροξυφλαβόνη είναι ο 7-O-γλυκοζίτης της ισπιδουλίνης ή ομοπλανταγενίνη (homoplantagin). Η ομοπλανταγενίνη ταυτοποιήθηκε με μέση τιμή μεγίστων στα 273 και 334 nm [Seon-Hye Lee et al., 2018; Herrero et al., 2010; Vaquero et al., 2012]. Λαμβάνοντας υπόψη, ότι σε όλες τις αναλύσεις εκλύεται ένα φλαβονοειδές αμέσως μετά το ροσμαρινικό οξύ και πριν την ταυτοποιημένη ένωση 2 (ισοσκοτελαρείνη ή 4',5,7,8-τετραϋδροξυφλαβόνη), καθώς επίσης ότι το φάσμα υπεριώδους αυτού παρουσιάζει μέγιστα στα 272 και 334 nm, η κορυφή αυτή μπορεί πιθανότατα να ταυτοποιηθεί ως ομοπλανταγενίνη.

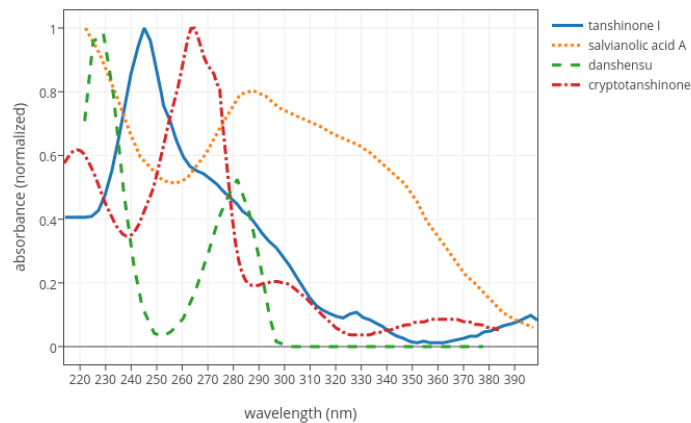


Εικόνα 54. Φάσμα υπεριώδους ένωσης f



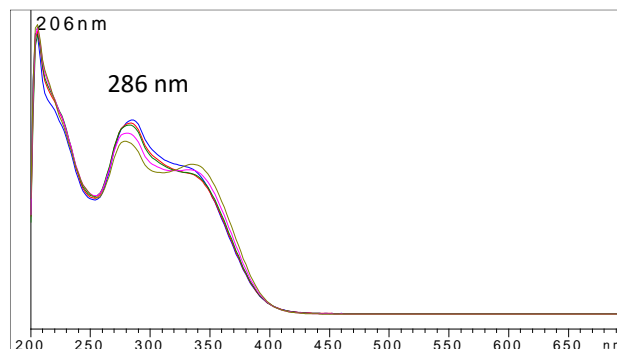
Εικόνα 55. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δεντρολίβανου [Cuvelier et al., 1996]

Τα χρωματογραφικά προφίλ των εκχυλισμάτων που ανακτώνται με διαλύτη μίγμα ακετόνης:νερού, μοιάζουν και με αυτά των εκχυλισμάτων καθαρής ακετόνης αλλά και με αυτά του καθαρού νερού. Για παράδειγμα, το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος ακετόνης:νερού (80:20) απεικονίζεται στην Εικόνα 45c. Το χρωματογράφημα c ταιριάζει σχεδόν με μια επικάλυψη των a και b χρωματογραφημάτων, με μόνη διαφοροποίηση την μεταβολή στα ύψη (εμβαδά) των διαφόρων κορυφών. Μόνο μία νέα ένωση έχει εμφανιστεί, η κορυφή x, που εμφανίζεται σε όλα τα εκχυλίσματα ακετόνης:νερού. Το φάσμα της ένωσης μοιάζει με συγκεκριμένα μέλη ολιγομερών του καφεϊκού οξέος, όπως τα σαλβιανολικά οξέα (salvianolic acids). Συγκεκριμένα, η ένωση εμφανίζει πανομοιότυπο φάσμα με το σαλβιανολικό οξύ A (salvianolic acid A), λαμβάνοντας υπόψη τα αντίστοιχα φάσματα που παρουσιάζονται από τους Xu et al. (2008) και τους Zhang et al. (2013).



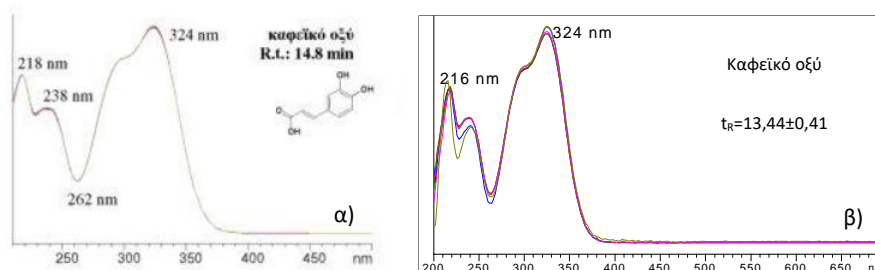
Εικόνα 56. Απεικόνιση φάσματος UV του σαλβιανολικού οξέος A ( $\lambda_{max}$  286nm)

Στα δείγματα που αναλύθηκαν το φάσμα της συγκεκριμένης ένωσης δεν ήταν καθαρό, διότι υπήρχαν συνεκλούσεις με άλλες ενώσεις. Παρόλα αυτά, σε δείγμα που υπέστη ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying), το φάσμα υπεριώδους της ένωσης ήταν καθαρό και η κορυφή  $\lambda$  εκλύεται περίπου 2 min μετά την ισοσκουτελαρεΐνη (κορυφή 2 στην Εικόνα 45b).



Εικόνα 57. Φάσμα ένωσης  $\lambda$  από δείγμα freeze dried

Εκτός των φλαβονοειδών με τη συγκεκριμένη μέθοδο, δύναται να προσδιοριστούν και φαινολικά οξέα. Εν προκειμένω, το δεύτερο σημαντικότερο φαινολικό οξύ του εκχυλίσματος δεντρολίβανου είναι το καφεϊκό οξύ, το οποίο είναι και ο πρωτογενής μεταβολίτης του ροσμαρινικού οξέος. Ταυτοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μέσω του φάσματος υπεριώδους του [Τσιμογιάννης, 2008; Kowalski & Wolski, 2003]. Το καφεϊκό οξύ εκλύεται στην αρχή όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα και συγκεκριμένα έχει μέσο χρόνο έκλυσης  $t_R=13,44\pm 0,41$  και εμφανίζει φάσμα υπεριώδους με μέγιστο στα 324nm.



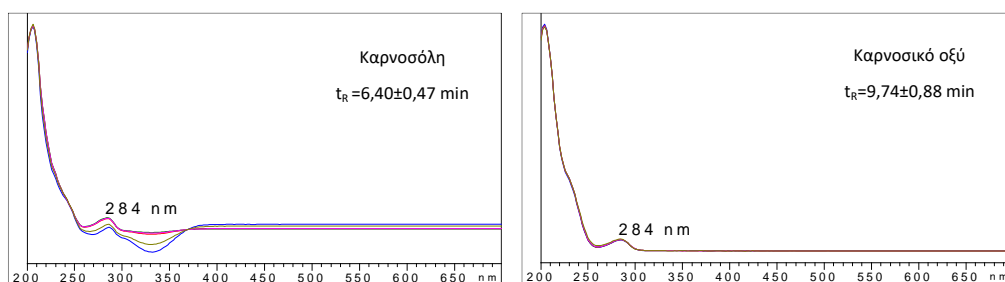
Εικόνα 58. Φάσμα καφεϊκού οξέος α) από βιβλιογραφία [Τσιμογιάννης, 2008] και β) προκύπτουν από χρωματογραφική ανάλυση



### Ταυτοποίηση φαινολικών διτερπενίων

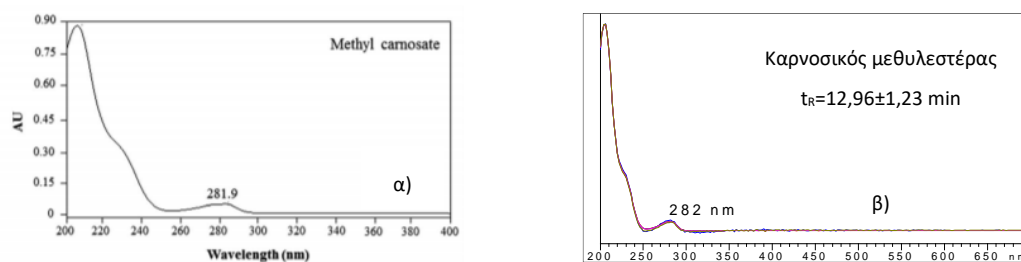
Στις χρωματογραφικές αναλύσεις με την μέθοδο “flav” δεν ενδείκνυται η ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων, αλλά αυτά που βρίσκονται σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες είναι εμφανή στο χρωματογράφημα όπως φαίνεται στην Εικόνα 45. Συγκεκριμένα, στην ανάλυση με αυτή τη μέθοδο, πρώτα εκλούεται η καρνοσόλη και ακολουθεί το καρνοσικό οξύ. Την έκλουση του καρνοσικού οξέος ακολουθεί ο καρνοσικός μεθυλεστέρας (methyl carnosate), λόγω χαμηλότερης πολικότητας. Αυτός είναι το τρίτο σε σειρά περιεκτικότητας φαινολικό διτερπένιο και γι’ αυτό και εμφανίζει υψηλότερη κορυφή στο χρωματογράφημα (pd3). Αυτό επιβεβαιώνεται και στη μελέτη των Cuvelier et al. (1996), όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα της Εικόνας 55, όπου μάλιστα στην προκειμένη ο καρνοσικός μεθυλεστέρας εμφανίζει υψηλότερη κορυφή από το καρνοσικό οξύ, λόγω αποικοδόμησης του τελευταίου.

Η μέθοδος προσδιορισμού των φαινολικών διτερπενίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι η “Carnosicref”. Σε μελέτη των Zhang et al. (2012), που σκοπό είχε τον προσδιορισμό των παραγώγων αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος σε εκχύλισμα δεντρολίβανου, το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη εμφάνισαν μέγιστο στα 284 nm, όπως και στα προκύπτοντα φάσματα που προσδιορίζονται μέσω της ανάλυσης HPLC ως αυτά τα συστατικά.



Εικόνα 59. Φάσματα υπεριώδους καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος από την χρωματογραφική ανάλυση

Επιπρόσθετα, και σε αυτή τη μελέτη μετά το καρνοσικό οξύ εκλούεται ο καρνοσικός μεθυλεστέρας. Σχετικά με το φάσμα υπεριώδους αυτού, με βάση τους Zabol et al. (2014) εμφανίζεται μέγιστο στα 281,9 nm. Το προκύπτον φάσμα από την ανάλυση συμφωνεί με αυτό του καρνοσικού μεθυλεστέρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 60 α) και 60 β) αντίστοιχα.



Εικόνα 60. Φάσμα υπεριώδους καρνοσικού μεθυλεστέρα α) από βιβλιογραφία [Zabol et al., 2014] και β) προκύπτον από χρωματογραφική ανάλυση

Στον πίνακα 18 βρίσκονται όλες οι φαινολικές ενώσεις του δεντρολίβανου που ταυτοποιήθηκαν και οι αντίστοιχοι μέσοι χρόνοι έκλουσης τους με βάση την μέθοδο “Flav”.

Πίνακας 18. Κυριότερες φαινολικές ενώσεις δεντρολίβανου και αντίστοιχοι χρόνοι έκλουσης με βάση την μέθοδο "Flav"

Φαινολικές ενώσεις εκχυλισμάτων	Μέσος χρόνος έκλουσης (R <sub>t</sub> ) <sup>a</sup>
Καφεϊκό οξύ	13,44±0,41
Νεπιτρίνη	31,88±0,44
Ροσμαρινικό οξύ	35,31±0,53
Ομοπλανταγενίνη	36,33±0,30
Ισοσκουτελαρεΐνη	38,45±0,31
Σαλβιανολικό οξύ A	40,56±0,50
Φλαβονοειδές <sup>b</sup>	40,96±0,26
Φλαβονοειδές <sup>b</sup>	41,25±0,26
Φλαβονοειδές <sup>b</sup>	42,14±0,24
Φλαβονοειδές <sup>b</sup>	42,83±0,40
Σιρσιμαριτίνη	46,79±0,20
Φαινολικό διτερπένιο <sup>b</sup>	47,61±0,72
Λαδανειΐνη	47,73±0,21
Γενκβανίνη	49,44±0,25
Σαλβιγενίνη	50,97±0,26
Καρνοσόλη	53,14±1,42
4'-μεθόξυτεκτοχρυσίνη	53,47±0,17
Καρνοσικό οξύ	55,40±0,31
Καρνοσικός μεθυλεστέρας	57,63±0,11

a: με βάση την μέθοδο Flav, b: Μη ταυτοποιημένες ενώσεις

## Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών μέσω χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

### Ποσοτικοποίηση φαινολικών διτερπενίων

Με βάση την ανάλυση με τη μέθοδο “Carnosicref” έγινε ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων σε όλους τους τύπους εκχυλισμάτων. Η εξίσωση ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιήθηκε, ήταν η εξής:  $E_{230}=34,567 \cdot C+32,475$  με  $R^2=0,9999$  όπου  $E_{230}$  : το εμβαδόν της κορυφής του κάθε φαινολικού διτερπενίου στα 230 nm και C η συγκέντρωση του στο εκχύλισμα σε g/L. Στον πίνακα 19 οι συγκεντρώσεις είναι δοσμένες σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος και στον πίνακα 20 σε g/kg ξηρού φυτού, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση.

Πίνακας 19. Συγκεντρώσεις φαινολικών διτερπενίων σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος

Είδος εκχυλίσματος	Καρνοσικό οξύ (g/kg)	Καρνοσόλη (g/kg)	Λοιπά φαινολικά διτερπένια (g/kg)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (g/kg)
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Σταθερή κλίνη)	54,9±5,2	9,6±0,1	7,0±0,6	71,5±4,7
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Υπέρηχοι)	60,6±2,9	13,3±0,6	9,0 ±0,5	82,9±3,8
<b>Μίγμα Αιθανόλης:Νερού 60:40</b> (Υπέρηχοι)	29,8±1,1	21,2±1,4	7,3±0,3	58,3±2,8
<b>Ακετονικό</b> (Σταθερή κλίνη)	82,9±0,9	18,0±0,9	13,6±0,2	114,4±1,6

Αρχικά, συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους εκχύλισης, με υπερήχους και σε σταθερή κλίνη, ως προς τα ολικά φαινολικά διτερπένια ανά kg ξηρού εκχυλίσματος προκύπτει ότι με χρήση υπερήχων, η εκχύλιση είναι πιο ποσοτική. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και εξετάζοντας τα βασικά διτερπένια, αφού τα εκχυλίσματα με υπερήχους έχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη αλλά και σε λοιπά φαινολικά διτερπένια. Αυτό, σημαίνει ότι η διάρρηξη που προκαλούν οι υπέρηχοι στο φυτό, είναι μείζονος σημασίας για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών. Επιπλέον, η ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας είναι σύμφωνη με την ταχεία δοκιμή Folin-Ciocalteu.

Σχετικά με τους διαλύτες εκχύλισης, προκύπτει ότι το μίγμα αιθανόλης:νερού παρουσιάζει μικρότερη απόδοση εκχύλισης σε σχέση με το μίγμα ακετόνης:νερού. Επιπρόσθετα, παρατηρείται μετατροπή μεγάλης ποσότητας καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη, πράγμα που αιτιολογείται από το γεγονός ότι η οξείδωση του καρνοσικού οξέος παρουσία νερού και διαλυτών με υδρόξυ ομάδες είναι ταχύτερη.

Τέλος, όσον αφορά το ακετονικό εκχύλισμα, αυτό προφανώς έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά διτερπένια, καθώς η ακετόνη ως μη πολικός διαλύτης εκχυλίζει

σε μεγαλύτερο βαθμό τις πιο άπολες ενώσεις, όπως τα φαινολικά διτερπένια. Για τον λόγο αυτό δεν θεωρήθηκε σκόπιμη η ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων με αυτή τη μέθοδο.

Πίνακας 20. Συγκεντρώσεις φαινολικών διτερπενίων εκφρασμένες ως g καρνοσικού οξέος /kg ξηρού φυτού ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος

Είδος εκχυλίσματος	Καρνοσικό οξύ (g/kg)	Καρνοσόλη (g/kg)	Λοιπά φαινολικά διτερπένια (g/kg)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (g/kg)
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20 (Σταθερή κλίνη)</b>	13,9±0,5	2,4±0,1	1,9±0,2	18,2±0,3
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20 (Υπέρηχοι)</b>	12,7±0,5	2,8±0,1	1,9±0,1	17,4±0,7
<b>Μίγμα Αιθανόλης:Νερού 60:40 (Υπέρηχοι)</b>	7,0±0,3	5,0±0,3	1,7±0,1	13,7±0,7
<b>Ακετονικό (Σταθερή κλίνη)</b>	9,5±0,5	2,1±0,2	1,5±0,0	13,1±0,7

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών διτερπενίων που εκχυλίζονται ανά kg ξηρού φυτού, προκύπτει ότι ο διαλύτης ακετόνη:νερό (80:20) εκχυλίζει μεγαλύτερες ποσότητες αυτών, όταν η εκχύλιση γίνεται σε σταθερή κλίνη και όχι σε υπερήχους. Η θερμοκρασιακή αύξηση που υφίσταται το εκχύλισμα στο λουτρό υπερήχων, επιδρά αρνητικά, υποβαθμίζοντας την περιεκτικότητα του σε φαινολικά διτερπένια. Συγκεκριμένα, το καρνοσικό οξύ είναι αυτό που υποβαθμίζεται περισσότερο, αφού με αύξηση της θερμοκρασίας μετατρέπεται σε άλλα φαινολικά διτερπένια, μέσω οξειδωσης. Σχετικά με το είδος του διαλύτη, το μίγμα ακετόνης:νερού δίνει πλουσιότερα εκχυλίσματα σε φαινολικά διτερπένια έναντι του μίγματος αιθανόλης:νερού.

Στον πίνακα 21, φαίνεται η εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν οι εκχυλίσεις ως προς τα φαινολικά διτερπένια. Είναι φανερό ότι η πιο εκλεκτική εκχύλιση σε φαινολικά διτερπένια, είναι αυτή που γίνεται με διαλύτη την ακετόνη. Αντίστοιχα, η λιγότερο εκλεκτική είναι αυτή που γίνεται με μίγμα αιθανόλης:νερού (60:40) και αυτό αιτιολογείται από την μεγαλύτερη αναλογία σε νερό, συγκριτικά με τα άλλα εκχυλίσματα. Η εκλεκτικότητα ως προς τα ολικά φαινολικά διτερπένια δεν επηρεάζεται από την μέθοδο εκχύλισης αλλά μόνο από το είδος του διαλύτη.

Πίνακας 21. Εκλεκτικότητα εκχυλίσεων σε φαινολικά διτερπένια

Είδος εκχυλίσματος	Εκλεκτικότητα (%) σε			
	Καρνοσικό οξύ	Καρνοσόλη	Λοιπά φαινολικά διτερπένια	Ολικά φαινολικά διτερπένια
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Σταθερή κλίνη)	5,5±0,2	1,0±0,0	0,7±0,1	7,2±0,1
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Υπέρηχοι)	5,3±0,2	1,2±0,1	0,8±0,0	7,3±0,3
<b>Μίγμα Αιθανόλης:Νερού 60:40</b> (Υπέρηχοι)	2,9±0,1	2,1±0,1	0,7±0,0	5,8±0,3
<b>Ακετονικό</b> (Σταθερή κλίνη)	8,0±0,4	1,7±0,2	1,3±0,0	11,0±0,6

#### Ποσοτικοποίηση ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών

Με βάση την ανάλυση με τη μέθοδο “Flav”, έγινε ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών και του ροσμαρινικού οξέος, που έχουν εκχυλιστεί σε όλους τους τύπους εκχυλισμάτων. Αναφορικά με τα φλαβονοειδή, αυτά παρατίθενται αρχικά ως ολικά φλαβονοειδή. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα ταυτοποιημένα αλλά και τα μη ταυτοποιημένα φλαβονοειδή στην παρούσα εργασία. Για την ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ένωση η ρουτίνη και οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσω της εξίσωσης:  $E_{280}=12,879 \cdot C-2,0857$  με  $R^2=0,9923$  όπου  $E_{280}$ : το εμβαδόν της κορυφής του κάθε φλαβονοειδούς στα 280 nm και C η συγκέντρωση του στο εκχύλισμα σε mg/L. Για το ροσμαρινικό οξύ η εξίσωση υπολογισμού που χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα ήταν η:  $E_{280}=30,708 \cdot C+5,4717$  με  $R^2=0,9992$ . Οι συγκεντρώσεις είναι δοσμένες σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος στον πίνακα 22 και σε g/kg ξηρού φυτού στον πίνακα 23, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των εκχυλίσεων.

Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε g/kg ξηρού εκχυλίσματος ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος

Είδος εκχυλίσματος	Ροσμαρινικό οξύ (g/kg)	Φλαβονοειδή (g/kg)
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Σταθερή κλίνη)	83,9±0,2	139,9±4,2
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Υπέρηχοι)	96,6±7,8	224,7±16,4
<b>Μίγμα Αιθανόλης:Νερού 60:40</b> (Υπέρηχοι)	76,4±1,1	141,0±7,2
<b>Ακετονικό</b> (Σταθερή κλίνη)	27,5±2,5	79,8±5,1
<b>Υδατικό (Σταθερή κλίνη)</b>	72,1±2,8	120,9±6,6

Αναφορικά με τον τύπο εκχύλισης, προκύπτει ότι με χρήση υπερήχων, η εκχύλιση είναι πιο ποσοτική λαμβάνοντας υπόψη το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή που εκχυλίζονται ανά kg ξηρού εκχυλίσματος. Το μίγμα ακετόνης:νερού εκχυλίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων συστατικών σε σχέση με το μίγμα αιθανόλης:νερού. Τα υδατικά εκχυλίσματα είναι πλουσιότερα σε ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή από ότι τα ακετονικά, λόγω της υψηλής τους πολικότητας. Τέλος, συγκρίνοντας την διαδοχική εκχύλιση με την εκχύλιση με μίγμα διαλυτών, προκύπτει πιο συμφέρουσα αυτή με το μίγμα, ειδικότερα όταν υποβοηθάται από υπερήχους.

Πίνακας 23. Συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε g/kg ξηρού φυτού ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος

Είδος εκχυλίσματος	Ροσμαρινικό οξύ (g/kg)	Φλαβονοειδή (g/kg)
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Σταθερή κλίνη)	21,3±1,2	35,6±3,1
<b>Μίγμα Ακετόνης:Νερού 80:20</b> (Υπέρηχοι)	20,7±1,4	47,4±4,7
<b>Μίγμα Αιθανόλης:Νερού 60:40</b> (Υπέρηχοι)	18,0±0,2	33,3±1,8
<b>Ακετονικό</b> (Σταθερή κλίνη)	3,2±0,3	9,4±0,6
<b>Υδατικό (Σταθερή κλίνη)</b>	16,3±1,7	27,4±2,6

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των συστατικών ανά kg ξηρού φυτού, προκύπτει ότι μεγαλύτερη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος εκχυλίζεται μέσω εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου, ενώ μεγαλύτερη ποσότητα φλαβονοειδών με υπερήχους. Επιπλέον, σχετικά με το είδος του διαλύτη, το μίγμα ακετόνης:νερού δίνει πλουσιότερα εκχυλίσματα σε ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή. Τέλος, σχετικά με τις διαδοχικές εκχυλίσεις, παρατηρείται πάλι ότι το μίγμα ακετόνης:νερού δίνει καλύτερα αποτελέσματα και συνάμα αποτελεί πιο οικονομική και ταχύτερη εκχύλιση. Επιπρόσθετα, στους πίνακες 24-28 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανά τύπο εκχυλίσματος.

Πίνακας 24. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου

Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή	Σεπί ξηρού εκχυλίσματος (g/kg)	Σεπί ξηρού φυτού (g/kg)
<b>Νεπιτρίνη</b>	13,7±0,8	1,6±0,1
<b>Ομοπλανταγενίνη</b>	7,0±0,6	0,8±0,1
<b>Ισοσκουτελαρεΐνη</b>	8,2±0,5	1,0±0,1
<b>Σιρσιμαριτίνη</b>	3,8±0,2	0,4±0,0
<b>Λαδανεΐνη</b>	6,0±0,4	0,7±0,0
<b>Γενκβανίνη</b>	1,9±0,0	0,2±0,0
<b>Σαλβιγενίνη</b>	20,5±0,6	2,3±0,2
<b>4'-Μεθόξυτεκτοχρυσίνη</b>	4,8±0,1	0,6±0,0



Πίνακας 25. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα νερού σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου

Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή	Σεπί ξηρού εκχυλίσματος (g/kg)	Σεπί ξηρού φυτού (g/kg)
Νεπιτρίνη	42,0±2,4	9,5±0,9
Ομοπλανταγενίνη	21,9±1,6	5,0±0,6
Ισοσκοουτελαρεΐνη	26,7±3,0	6,1±1,0
Σιρσιμαριτίνη	0,8±0,0	0,2±0,0
Λαδανεΐνη	0,5±0,0	0,1±0,0
Γενκβανίνη	0,5±0,0	0,1±0,0
Σαλβιγενίνη	0,4±0,0	0,1±0,0
4'-Μεθόξυτεκτοχρυσίνη	-	-

Πίνακας 26. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης:νερού 80:20 σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου

Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή	Σεπί ξηρού εκχυλίσματος (g/kg)	Σεπί ξηρού φυτού (g/kg)
Νεπιτρίνη	52,5±2,3	13,4±1,4
Ομοπλανταγενίνη	17,8±1,5	4,5±0,1
Ισοσκοουτελαρεΐνη	22,9±1,4	5,8±0,7
Σιρσιμαριτίνη	4,2±0,1	1,1±0,0
Λαδανεΐνη	5,5±0,1	1,4±0,1
Γενκβανίνη	2,2±0,1	0,6±0,0
Σαλβιγενίνη	13,4±0,7	3,4±0,1
4'-Μεθόξυτεκτοχρυσίνη	3,1±0,3	0,8±0,0

Πίνακας 27. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα ακετόνης:νερού 80:20 σε υπερήχους

Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή	Σεπί ξηρού εκχυλίσματος (g/kg)	Σεπί ξηρού φυτού (g/kg)
Νεπιτρίνη	65,2±8,5	13,7±1,8
Ομοπλανταγενίνη	24,2±0,6	5,1±0,1
Ισοσκουτελαρεΐνη	39,9±4,8	8,4±1,0
Σιρσιμαριτίνη	3,3±0,1	0,7±24
Λαδανειΐνη	5,3±0,0	1,1±0,0
Γενκβανίνη	1,1±0,0	0,2±0,0
Σαλβιγενίνη	13,3±0,1	2,8±0,0
4'-Μεθόξυτεκτοχρυσίνη	2,7±0,0	0,6±0,0

Πίνακας 28. Ποσοτικοποίηση ταυτοποιημένων φλαβονοειδών σε εκχυλίσματα αιθανόλης:νερού 60:40 σε υπερήχους

Ταυτοποιημένα φλαβονοειδή	Σεπί ξηρού εκχυλίσματος (g/kg)	Σεπί ξηρού φυτού (g/kg)
Νεπιτρίνη	51,8±0,4	12,2±0,2
Ομοπλανταγενίνη	20,7±1,8	4,9±0,4
Ισοσκουτελαρεΐνη	31,2±3,5	7,3±0,9
Σιρσιμαριτίνη	2,6±0,0	0,6±0,0
Λαδανειΐνη	4,5±0,1	1,1±0,0
Γενκβανίνη	1,0±0,0	0,2±0,0
Σαλβιγενίνη	10,8±0,6	2,6±0,1
4'-Μεθόξυτεκτοχρυσίνη	1,7±0,0	0,4±0,0

Αρχικά, η νεπιτρίνη, η ομοπλανταγενίνη και η ισοσκουτελαρεΐνη ως πιο πολικές ενώσεις, εκχυλίζονται με πολικούς διαλύτες (π.χ. νερό) και για τον λόγο αυτό βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα υδατικά εκχυλίσματα αλλά και στα μίγματα οργανικού διαλύτη:νερού. Αντίθετα, τα υπόλοιπα πέντε ταυτοποιημένα φλαβονοειδή, είναι πιο άπολες ενώσεις και όπως φαίνεται στον πίνακα 25, η πιο άπολη εξ αυτών, δηλαδή η 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη, δεν εκχυλίζεται καθόλου με καθαρό νερό. Γενικότερα, το σύνολο των παραπάνω φλαβονοειδών, δύναται να εκχυλιστεί με χρήση μιγμάτων ενός άπολου και ενός πολικού διαλύτη συνδυαστικά. Το παραπάνω τεκμηριώνεται και μέσω της σύγκρισης των εκχυλισμάτων ακετόνης, νερού και ακετόνης:νερού (80:20), που πραγματοποιήθηκαν σε

σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου με ίδιες τις υπόλοιπες συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή: νεπιτρίνη, σιρσιμαριτίνη και γενκβανίνη φαίνεται ότι εκχυλίστηκαν βέλτιστα με χρήση μίγματος διαλυτών. Τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, ανάλογα με την πολικότητα τους, βρίσκονταν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο αντίστοιχο ξηρό εκχύλισμα, υδατικό ή ακετονικό. Για παράδειγμα, υπολογίστηκε η μεγαλύτερη περιεκτικότητα ισοσκουτελαρεΐνης στα υδατικά εκχυλίσματα ( $26,7 \pm 3,0$  g/kg ξηρού εκχυλίσματος), που δικαιολογείται αφού αυτή είναι πολικό μόριο. Αντίστοιχα, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σαλβιγενίνης υπολογίστηκε στα ακετονικά εκχυλίσματα ( $20,5 \pm 0,6$  g/kg ξηρού εκχυλίσματος).

Με βάση τις συγκεντρώσεις φλαβονοειδών που εκχυλίζονται ανά kg ξηρού φυτού, προκύπτει ότι βέλτιστη μέθοδος, είναι αυτή των υπερήχων με διαλύτη ακετόνη:νερό (80:20) για τα πολικά φλαβονοειδή: νεπιτρίνη, ομοπλανταγενίνη και ισοσκουτελαρεΐνη και η εκχύλιση σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου με την ίδια αναλογία διαλύτη ακετόνης:νερού, θεωρήθηκε καλύτερη για τα υπόλοιπα φλαβονοειδή.

Συγκρίνοντας, τις μεθόδους εκχύλισης, με υπερήχους και σε σταθερή κλίση ημιδιαλείποντος έργου, διατηρώντας το είδος διαλύτη σταθερό (ακετόνη:νερό 80:20), φαίνεται ότι τα πολικά φλαβονοειδή, βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα εκχυλίσματα που προέκυψαν με υπερήχους. Αντίθετα, η σιρσιμαριτίνη, η λαδανεΐνη, η γενκβανίνη, η σαλβιγενίνη και η 4'-μεθοξυτεκτοχρυσίνη εκχυλίστηκαν καλύτερα στην σταθερή κλίση.

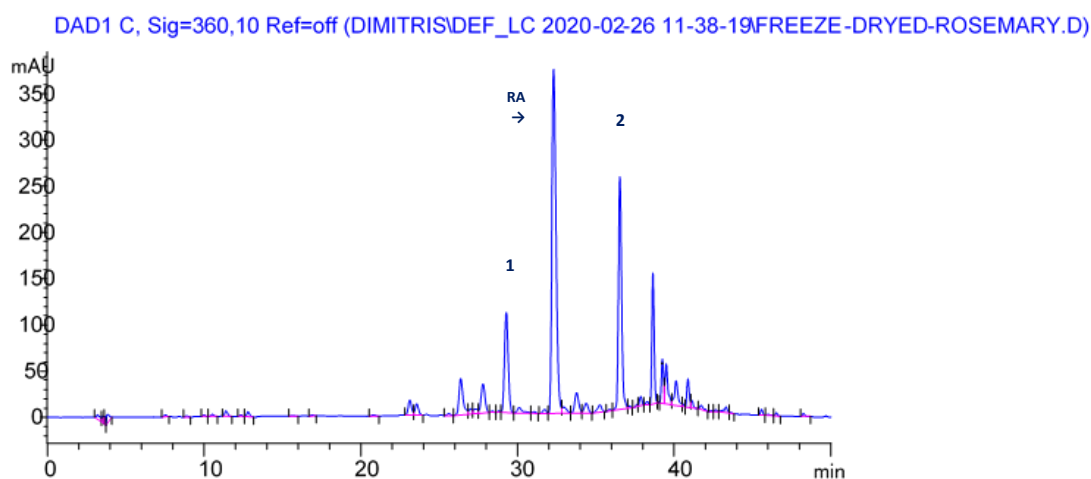
Σχετικά με την επίδραση του διαλύτη, από τους πίνακες 27 και 28, φαίνεται ότι στα εκχυλίσματα ακετόνης:νερού (80:20) το σύνολο των ταυτοποιημένων φλαβονοειδών, βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα εκχυλίσματα αιθανόλης:νερού (60:40).

## Ενθυλάκωση εκχυλισμάτων δενδρολίβανου.

Τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου υποβλήθηκαν σε ξήρανση με ψεκασμό, με σκοπό την ενθυλάκωση των συστατικών τους. Στο κεφάλαιο αυτό, μελετάται η απόδοση (MEY%) και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού (MEE%) των συστατικών, ανάλογα με τον φορέα εγκλεισμού, τη θερμοκρασία ή την περιεκτικότητα των κόνεων σε βιοδραστικά συστατικά. Οι αναλύσεις των κόνεων γίνονται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

## Υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου συγκέντρωσης σε ολικά στερεά 32 g/L, το οποίο εκχυλίστηκε με θερμό νερό σε κλίμη μεγαλύτερης κλίμακας από την εργαστηριακή. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας μαζί με τις επιθυμητές ουσίες, ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή, εκχυλίστηκαν πιθανότατα και άλλες ουσίες, όπως σάκχαρα, με αποτέλεσμα να είναι δυσκολότερη η ταυτοποίηση των ενώσεων μέσω των φασμάτων Uv-Vis τους. Μια προσπάθεια αναγνώρισης των κορυφών του φάσματος, έγινε μέσω ανάλυσης ενός δείγματος αυτού του εκχυλίσματος, αφού αυτό υπέστη ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying). Ακολουθεί το χρωματογράφημα του συγκεκριμένου εκχυλίσματος.



Εικόνα 61. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος μεγαλύτερης κλίμακας που έχει υποστεί ξήρανση με κατάψυξη

Η περιεκτικότητα του υδατικού εκχυλίσματος σε ροσμαρινικό οξύ, υπολογίστηκε μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης ίση με 47.615 ppm επί ξηρού εκχυλίσματος ή 1.524 mg/L αρχικού υγρού εκχυλίσματος. Οι αντίστοιχες περιεκτικότητες σε φλαβονοειδή ήταν 131.562 ppm επί ξηρού εκχυλίσματος ή 4.210 mg/L αρχικού υγρού εκχυλίσματος. Τα πειράματα αυτά θεωρούνται δοκιμαστικά, καθώς έγιναν κατά την εκμάθηση της μεθόδου. Τα ποσοστά MEY% και MEE% ανάλογα το εγκλειστικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και την περιεκτικότητα σε πυρήνα (core%), φαίνονται στον πίνακα 29. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 160 °C.

Πίνακας 29. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού φαινολικών συστατικών από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας με φορέα εγκλεισμού μαλτοδεξτρίνη (MD) και αραβικό κόμμα (GA) σε διάφορες αναλογίες, διαφορετική περιεκτικότητα στερεών του εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας (core %), με σταθερή θερμοκρασία αέρα εισόδου 160°C και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%.

Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων μεγαλύτερης κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)		
	1:0	1:0	2:1
	Περιεκτικότητα core%		
	10	20	10
	Απόδοση μικροεγκλεισμού MEY (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	96,32±2,71%	100,00±0,55%	100,00±2,94%
Φλαβονοειδή	82,68±0,03%	89,82±8,56%	95,06±4,58%
	Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού MEE (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	97,28±0,20%	97,48±0,14%	97,64±0,25%
Φλαβονοειδή	97,78±0,14%	98,55±0,14%	98,34 ±0,14%
Υγρασία κόνων	3,40±0,06%	2,85±0,04%	3,90±0,00%

Όλες οι παραγόμενες κόνειες είχαν περιεκτικότητα υγρασίας χαμηλότερη από 5,25%, εξασφαλίζοντας έτσι τη μικροβιολογική σταθερότητα [Κορ et al., 2011; Da Silva et al., 2013]. Η υγρασία των κόνων επηρεάζεται από το εγκλειστικό μέσο. Συγκεκριμένα, οι σκόνης που έχουν GA έχουν μεγαλύτερα ποσοστά υγρασίας από αυτές που παρασκευάστηκαν μόνο με MD. Το υψηλότερο ποσοστό υγρασίας στις κόνειες που περιείχαν GA, μπορεί να αποδοθεί στην διακλαδισμένη δομή αυτού, η οποία έχει μεγάλο αριθμό υδρόφιλων ομάδων που μπορούν να απορροφήσουν νερό από τον αέρα του περιβάλλοντος [Da Silva et al., 2013]. Σχετικά με την περιεκτικότητα της μικροκάψουλας σε επικαλυπτόμενο υλικό (core), προκύπτει ότι οι κόνειες με υψηλότερη περιεκτικότητα παρουσίαζαν χαμηλότερες τιμές υγρασίας.

Η παρουσία του GA φαίνεται ότι επιδρά θετικά στην απόδοση μικροεγκλεισμού των συστατικών, αλλά και στην αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού, δίνοντας τις πιο ποιοτικές κόνειες συγκριτικά με όταν ο φορέας είναι μόνο MD. Αναφορικά με τις σκόνης που παρασκευάστηκαν μόνο με επικαλυπτικό μέσο την MD, τα αποτελέσματα απόδοσης κρίνονται καλύτερα στην περίπτωση που η περιεκτικότητα σε core είναι 20%, συμπέρασμα που συμφωνεί με την μελέτη των Vidonić et al. (2014). Παρόλα αυτά, όπως προαναφέρθηκε κρίνεται αναγκαία η επανεξέταση της περιεκτικότητας σε core 10%, καθώς τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αρχικό στάδιο.

#### Υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας

Αρχικά, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση των στερεών του εκχυλίσματος επί των ολικών στερεών της μικροκάψουλας ίση με 10% για λόγους οικονομίας και για την επανεξέταση της συγκεκριμένης περιεκτικότητας. Το υδατικό εκχύλισμα πειραματικής κλίμακας, περιέχει 73.144 ppm ροσμαρινικού οξέος και 119.907 ppm φλαβονοειδών επί ξηρού εκχυλίσματος και στον πίνακα 30 παρατίθενται οι αποδόσεις μικροεγκλεισμού, καθώς και η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού για τα συγκεκριμένα συστατικά.

Πίνακας 30. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού βιοδραστικών συστατικών υδατικών εκχυλισμάτων πειραματικής κλίμακας με φορέα εγκλεισμού MD και GA σε διάφορες αναλογίες, διαφορετική θερμοκρασία αέρα εισόδου, σταθερή περιεκτικότητα σε 10% και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%.

Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων πειραματικής κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)			
	1:0	4:1	4:1	2:1
	Θερμοκρασία (°C)			
	140	140	160	140
	Απόδοση μικροεγκλεισμού MEY (%)			
Ροσμαρινικό οξύ	95,41±4,49%	100,00±3,28%	100,00±4,40%	98,93±0,12%
Φλαβονοειδή	84,19±4,52%	95,30±8,41%	96,90±0,01%	90,90±3,17%
	Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού MEE (%)			
Ροσμαρινικό οξύ	96,94±0,18%	96,81±1,50%	97,93±0,13%	97,36±0,28%
Φλαβονοειδή	96,49±0,17%	97,19±0,53%	97,41±0,22%	97,59±0,23%
Υγρασία κόνεων	3,32±0,02%	4,23±0,26%	3,06±0,03%	4,13±0,13%

Οι αναλογίες MD προς GA (MD:GA) που εξετάστηκαν στην περίπτωση μικροεγκλεισμού του υδατικού εκχυλίσματος πειραματικής κλίμακας, ήταν οι 1:0, 4:1 και 2:1, διατηρώντας τις άλλες παραμέτρους της διεργασίας σταθερές και συγκεκριμένα θερμοκρασία αέρα ξήρανσης ίση με 140 °C και περιεκτικότητα σε υλικό προς επικάλυψη 10%. Οι αναλογίες 4:1 και 2:1 σε MD:GA, επιλέχθηκαν με βάση την έρευνα των Garofulic et al. (2017), όπου εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αναλογία σε μαλτοδεξτρίνη έναντι αραβικού κόμματος πρέπει να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση δημιουργίας ενός μίγματος τροφοδοσίας με αυτούς τους φορείς εγκλεισμού. Το παραπάνω αιτιολογείται, καθώς η μαλτοδεξτρίνη ως φορέας εγκλεισμού, επιτυγχάνει ικανοποιητική απόδοση εγκλεισμού και φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών, ενώ το αραβικό κόμμα, αντίστοιχα, δεν δίνει καλές αποδόσεις εγκλεισμού σε φαινολικά οξέα. Επιπρόσθετα, η μεγαλύτερη αναλογία σε MD είναι επιθυμητή και λόγω του χαμηλότερου κόστους αυτής σε σύγκριση με το GA.

Με βάση τα πειράματα, προέκυψε μεγαλύτερη απόδοση μικροεγκλεισμού στην περίπτωση που το εγκλειστικό μέσο ήταν MD:GA σε αναλογία 4:1, συμπέρασμα που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα έρευνας των Tolun et al. (2016) στην ίδια θερμοκρασία. Διατηρώντας την αναλογία του εγκλειστικού μέσου σταθερή και ίση με MD:GA (4:1), ερευνηθήκε και η παράμετρος της θερμοκρασίας όσον αφορά την απόδοση μικροεγκλεισμού των συστατικών στις μικροκάψουλες. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν οι 140 και οι 160 °C και προέκυψαν μεγαλύτερες αποδόσεις στην περίπτωση της υψηλότερης θερμοκρασίας. Το παραπάνω, μπορεί να αποδοθεί στην καλύτερη μεταφορά θερμότητας και μάζας στην περίπτωση χρήσης υψηλότερων θερμοκρασιών αέρα εισόδου.

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού των βιοδραστικών συστατικών, αυτή είναι πολύ ικανοποιητική, ανεξάρτητα από την αναλογία του φορέα εγκλεισμού σε MD και GA. Προκύπτει βέλτιστη, όσον αφορά τον εγκλεισμό του ροσμαρινικού οξέος, όταν η αναλογία MD:GA είναι 4:1, ενώ για τα φλαβονοειδή προκύπτει βέλτιστη όταν η αντίστοιχη αναλογία είναι 2:1. Παρόλα αυτά, η διαφορά είναι τόσο μικρή που είναι εύλογο



να προτιμηθεί η αναλογία MD:GA 4:1, καθώς ως πρώτη ύλη το GA είναι πιο ακριβό σε σχέση με την MD.

Η θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης, είναι παράγοντας που επιδρά και στην υγρασία των κόνεων και όπως φαίνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας, μειώνεται η υγρασία. Επιπλέον, σχετικά με την αναλογία του φορέα εγκλεισμού σε GA, παρατηρείται ότι η παρουσία αυτού δίνει κόνεις με υψηλότερη υγρασία, αλλά δεν μπορεί να ειπωθεί ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του GA από 4:1 σε 2:1 σε σχέση με την MD, έχει κάποια επίδραση στο ποσοστό της υγρασίας, καθώς οι κόνεις μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν παρόμοια υγρασία.

### Εκχυλίσματα από μίγματα διαλυτών

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων, τα εκχυλίσματα από μίγμα ακετόνης:νερού οδηγήθηκαν προς ξήρανση με ψεκασμό, αφού πρώτα απομακρύνθηκε η ακετόνη μέσω εξάτμισης καθώς και ορισμένη ποσότητα νερού, για να επιτευχθεί η επιθυμητή συμπύκνωση του εκχυλίσματος. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, μέρος των μη υδατοδιαλυτών στερεών του εκχυλίσματος να καταβυθιστούν στη φιάλη. Σε αυτά τα στερεά συγκαταλέγονται κυρίως τα φαινολικά διτερπένια, τα οποία και εκχυλίζονται με την ακετόνη. Για τον λόγο αυτό, στα πειράματα είναι αναμενόμενη η χαμηλότερη ανάκτηση αυτών των συστατικών, λόγω των προηγούμενων χειρισμών. Επιπρόσθετα, η διεργασία της ξήρανσης με ψεκασμό, συντελείται σε υψηλή θερμοκρασία της τάξης των 140-160 °C και είναι γνωστό ότι το καρνοσικό οξύ οξειδώνεται σε αυτές τις συνθήκες σε καρνοσόλη ή και σε άλλα δευτερεύοντα φαινολικά διτερπένια (ροσμανόλη, ισοροσμανόλη κ.λπ.). Έτσι τα αποτελέσματα ανάκτησης του καρνοσικού οξέος δεν είναι αντιπροσωπευτικά, καθώς αυτό έχει μετατραπεί σε άλλες ενώσεις και είναι λογικό να αναμένονται εξαιρετικά χαμηλά. Για τον λόγο αυτό, υπολογίζεται μια συνολική ανάκτηση όλων των φαινολικών διτερπενίων του εκχυλίσματος.

Για τα εκχυλίσματα από μίγματα διαλυτών, καθώς αυτά περιέχουν ευοξειδωτα συστατικά, όπως τα φαινολικά διτερπένια, επιλέχθηκε όλα τα πειράματα να γίνουν στην πιο χαμηλή θερμοκρασία, δηλαδή αυτή των 140 °C. Το εκχύλισμα ακετόνης:νερού (80:20) που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε 60.609 ppm καρνοσικού οξέος, 13.341 ppm καρνοσόλης, 8.987 ppm λοιπών φαινολικών διτερπενίων, 103.252 ppm ροσμαρινικού οξέος και 224.712 ppm φλαβονοειδών. Οι συγκεντρώσεις είναι δοσμένες επί ξηρού εκχυλίσματος.

Επιπρόσθετα, έγινε σειρά πειραμάτων και με εκχυλίσματα αιθανόλης:νερού ώστε να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των συστατικών, όταν αυτά προέρχονται από άλλο είδος εκχυλίσματος. Αντίστοιχα το εκχύλισμα αιθανόλης:νερού (60:40) που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε 26.507 ppm καρνοσικού οξέος, 22.275 ppm καρνοσόλης, 5.842 ppm λοιπών φαινολικών διτερπενίων, 75.310 ppm ροσμαρινικού οξέος και 141.014 ppm φλαβονοειδών. Οι συγκεντρώσεις είναι δοσμένες επί ξηρού εκχυλίσματος.

Πίνακας 31. Απόδοση και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού εκχυλισμάτων από μίγματα διαλυτών με φορέα εγκλεισμού MD και GA σε διάφορες αναλογίες, σταθερή θερμοκρασία αέρα εισόδου ίση με 140°C, διαφορετική περιεκτικότητα core και συνολική περιεκτικότητα στερεών στο μίγμα τροφοδοσίας 30%.

Φαινολικά συστατικά Μιγμάτων	Είδος εκχυλίσματος		
	Ακετόνη: νερό 80:20	Ακετόνη: νερό 80:20	Αιθανόλη : νερό 60:40
	Φορέας Εγκλεισμού (MD:GA)		
	1:0	4:1	4:1
	Περιεκτικότητα core(%)		
	10	10	5
	Απόδοση μικροεγκλεισμού MEY (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	98,72±0,38%	100,00±0,18%	99,09±1,19%
Φλαβονοειδή	91,27±0,01%	86,29±0,07%	95,48±8,03%
Ολικά φαινολικά διτερπένια	64,53±0,80%	68,57±0,29%	84,79±1,32%
Καρνοσικό οξύ	57,78±1,11%	62,29±0,61%	65,65±1,17%
Καρνοσόλη	93,17±6,84%	98,04±1,47%	100,00±0,80%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	67,59±4,75%	67,18±0,81%	94,88±3,83%
	Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού MEE (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	92,40±0,04%	95,06±0,50%	97,20±0,71%
Φλαβονοειδή	90,36±0,04%	91,80±0,21%	91,52±0,86%
Ολικά φαινολικά διτερπένια	36,26±0,18%	35,08±0,48%	52,59±0,95%
Καρνοσικό οξύ	26,42±2,79%	31,75±0,05%	34,31±0,65%
Καρνοσόλη	64,53±3,85%	43,48±2,07%	66,74±1,09%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	35,16±4,57%	37,71±0,75%	52,97±1,90%
Υγρασία κόνεων	3,77±0,48%	3,89±0,00%	5,24±0,05%

Σχετικά με τα εκχυλίσματα που προέκυψαν με μίγμα διαλυτών ακετόνης και νερού αντίστοιχα, φαίνεται ότι η παρουσία GA ως φορέα εγκλεισμού δίνει καλύτερες ποιοτικά κόνεις. Συγκεκριμένα, αυξάνεται η απόδοση εγκλεισμού του ροσμαρινικού οξέος και των φαινολικών διτερπενίων συνολικά, αλλά και ξεχωριστά του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης. Επιπλέον, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού όσον αφορά το ροσμαρινικό οξύ, τα φλαβονοειδή, το καρνοσικό οξύ και τα λοιπά φαινολικά διτερπένια. Δεν μπορεί βέβαια να αγνοηθεί το γεγονός, ότι η απόδοση και η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των φαινολικών διτερπενίων, είναι εξαιρετικά χαμηλή, ειδικότερα συγκρινόμενη με τις αντίστοιχες των πολικών βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι είναι απαραίτητη μια διαφορετική διαχείριση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων.

Όταν το εκχύλισμα προς ξήρανση με ψεκασμό ήταν από μίγμα αιθανόλης:νερού, η απόδοση μικροεγκλεισμού των φλαβονοειδών ήταν μεγαλύτερη, όπως και αυτή των ολικών

φαινολικών διτερπενίων. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε κατά 60%, όση ήταν η περιεκτικότητά του σε αιθανόλη. Έτσι, λόγω του αζεότροπου που σχηματίζει το νερό με την αιθανόλη, εξατμίστηκε το 96% της περιεχόμενης αιθανόλης, με αποτέλεσμα η εναπομείνασα μικρή ποσότητα αιθανόλης (V=4,8 mL) να διατηρεί διαλυτοποιημένα σε ικανοποιητικό βαθμό τα πιο άπολα συστατικά του εκχυλίσματος. Για τον λόγο αυτό, τα φαινολικά διτερπένια καταβυθίστηκαν σε πολύ μικρότερο βαθμό στην φιάλη εξάτμισης κατά την συμπύκνωση του εκχυλίσματος αυτού, σε σχέση με τα εκχυλίσματα ακετόνης:νερού. Πιο αναλυτικά, και μεμονωμένα όσον αφορά το καρνοσικό οξύ, την καρνοσόλη και τα λοιπά φαινολικά διτερπένια, η απόδοση είναι ικανοποιητική. Σχετικά με την αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού, αυτή είναι υψηλότερη για όλα τα βιοδραστικά συστατικά. Συνεπάγεται ότι, τα εκχυλίσματα από μίγματα αιθανόλης:νερού δίνουν καλύτερης ποιότητας κόνεις μέσω ξήρανσης με ψεκασμό. Επιπρόσθετο ρόλο σε αυτό πιθανότατα έπαιξε και η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε υλικό προς επικάλυψη που χρησιμοποιήθηκε λόγω οικονομίας.

### Ακετονικά εκχυλίσματα

Στο στάδιο αυτό, οι κόνεις παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ελαιοδιάλυμα συγκέντρωσης 2,5% σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη που παρασκευάστηκε από ακετονικά εκχυλίσματα. Στον πίνακα 32 παρουσιάζονται η απόδοση και η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού κόνεων 5% και 10% σε υλικό προς επικάλυψη (ελαιοδιάλυμα συγκέντρωσης 2,5% σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη) σε θερμοκρασία 140 °C και αναλογία μέσων εγκλεισμού MD:GA 2:1. Η MD παρουσιάζει χαμηλή ικανότητα γαλακτωματοποίησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κακή συγκράτηση σε περιπτώσεις που ο πυρήνας είναι λιπόφιλος, όπως στην προκειμένη που εγκλείεται ελαιοδιάλυμα φαινολικών διτερπενίων. Για τον λόγο αυτό, ενδείκνυται η χρήση GA σε συνδυασμό. Ο λόγος που επιλέχτηκε υψηλότερη περιεκτικότητα σε GA, είναι λόγω της δυσκολίας εγκλεισμού των φαινολικών διτερπενίων. Επιπρόσθετα, η επιλογή μικρότερης αναλογίας core:wall έγινε για τον ίδιο λόγο.

*Πίνακας 32. Απόδοση και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού κόνεων από ακετονικά εκχυλίσματα με σταθερή αναλογία φορέα εγκλεισμού MD:GA 2:1, σταθερή θερμοκρασία εισόδου 140°C, διαφορετική περιεκτικότητα ελαιοδιαλύματος (core%) στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας και συνολική περιεκτικότητα στερεών ίση με 30%.*

Φαινολικά συστατικά Ακετονικών εκχυλισμάτων	Περιεκτικότητα core	
	5%	10%
	Φορέας Εγκλεισμού (MD:GA)	
	2:1	2:1
	Απόδοση μικροεγκλεισμού MEY (%)	
Ολικά φαινολικά διτερπένια	89,70±1,00%	43,61±1,71%
Καρνοσικό οξύ	72,84±0,91%	44,44±1,44%
Καρνοσόλη	100,00±0,01%	49,37±3,31%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	100,00±0,05%	30,47±1,71%
	Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού MEE (%)	
Ολικά φαινολικά διτερπένια	76,35±0,76%	70,13±0,09%
Καρνοσικό οξύ	75,24±0,51%	72,95±0,82%
Καρνοσόλη	70,84±2,03%	60,71±3,57%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	88,68±0,15%	65,75±1,35%
Υγρασία κόνεων	3,31±0,11%	2,28±0,05%

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 32, η περιεκτικότητα του πυρήνα της κάψουλας είναι καθοριστική για την απόδοση και την αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού των βιοδραστικών συστατικών. Στην σκόνη με 5% περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας, έχουν εγκλειστεί πιο αποτελεσματικά όλα τα συστατικά, καθώς επίσης και οι αποδόσεις εγκλεισμού τους είναι πιο αυξημένες έναντι της σκόνης με περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα 10%. Επιπλέον, όσον αφορά την υγρασία, όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα της μικροκάψουλας σε επικαλυπτόμενο υλικό, τόσο χαμηλότερη είναι η υγρασία της σκόνης.

### Αναλύσεις διατηρησιμότητας βιοδραστικών συστατικών στις κόνειες

Οι αναλύσεις των κόνεων επαναλήφθηκαν σε διάστημα ενός ή έξι μηνών, με σκοπό την εξέταση της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου που έχουν ενθυλακωθεί.

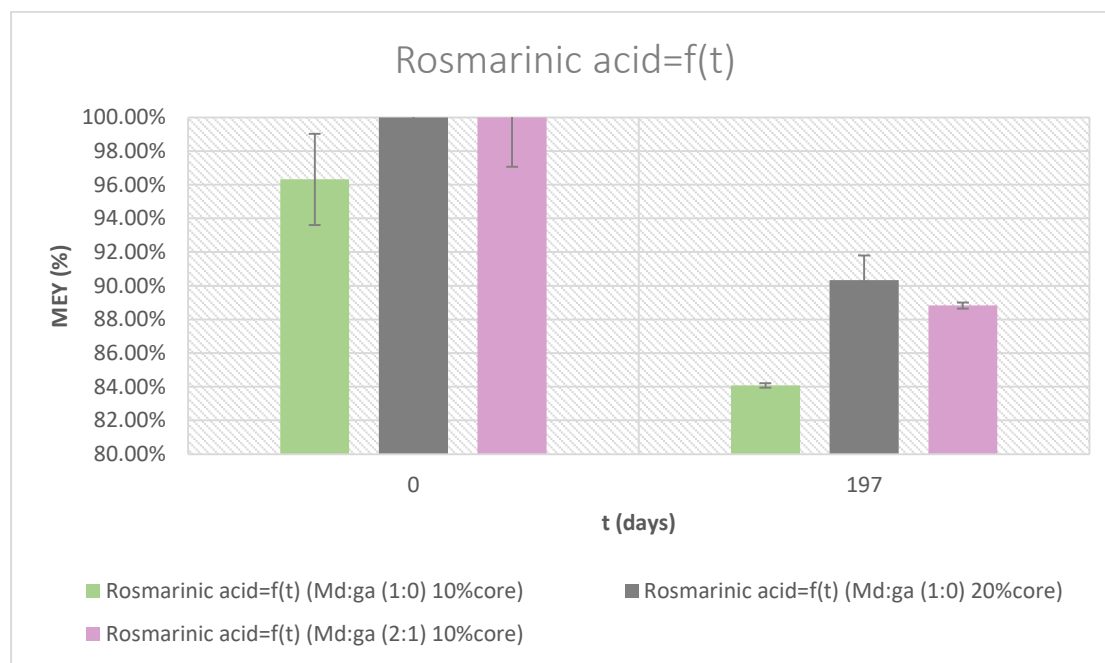
### Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας

Οι αναλύσεις των κόνεων που προέρχονται από υδατικό εκχύλισμα μεγαλύτερης κλίμακας, επαναλήφθηκαν μετά από έξι μήνες από την παρασκευή τους. Η υγρασία των κόνεων έχει αυξηθεί σημαντικά, καθώς η αποθήκευση δεν έγινε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N<sub>2</sub>. Παρόλα αυτά, οι κόνειες που δεν περιείχαν GA, είχαν χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας και μάλιστα εντός των ορίων μικροβιολογικής σταθερότητας [Κοζ et al., 2011; Da Silva et al., 2013]. Συγκρίνοντας τις αναλύσεις των κόνεων που είχαν ίδια περιεκτικότητα σε υδατικό εκχύλισμα, και κατά συνέπεια βιοδραστικά συστατικά (10% core), προκύπτει ότι το ροσμαρινικό οξύ διατηρήθηκε εξίσου σε ποσοστό της τάξης του 84%, ανεξάρτητα του φορέα εγκλεισμού. Αντίθετα, τα φλαβονοειδή φαίνεται ότι διατηρήθηκαν καλύτερα απουσία GA. Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού, δηλαδή το ποσοστό των δραστικών ουσιών που παραμένει στο εσωτερικό της μικροκάψουλας ως προς το συνολικό ποσό στη μικροκάψουλα (εσωτερικό και επιφάνεια), αυτή διαφέρει σημαντικά στις δύο περιπτώσεις και συγκεκριμένα είναι καλύτερη στην περίπτωση που το εγκλειστικό μέσο είναι μόνο MD. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με την αυξημένη υγρασία, που οφείλεται στην παρουσία του GA. Όσον αφορά την περιεκτικότητα του πυρήνα στις μικροκάψουλες, 10 και 20% αντίστοιχα, προκύπτει παρόμοια αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού, αλλά καλύτερη διατήρηση του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών, στην περίπτωση της μεγαλύτερης περιεκτικότητας. Στον πίνακα 33 βρίσκονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων σχετικά με την απώλεια του κάθε συστατικού στο διάστημα αποθήκευσης, την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού αυτών αλλά και την υγρασία των κόνεων.

Πίνακας 33. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνεις από υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας σε διάστημα 197 ημερών.

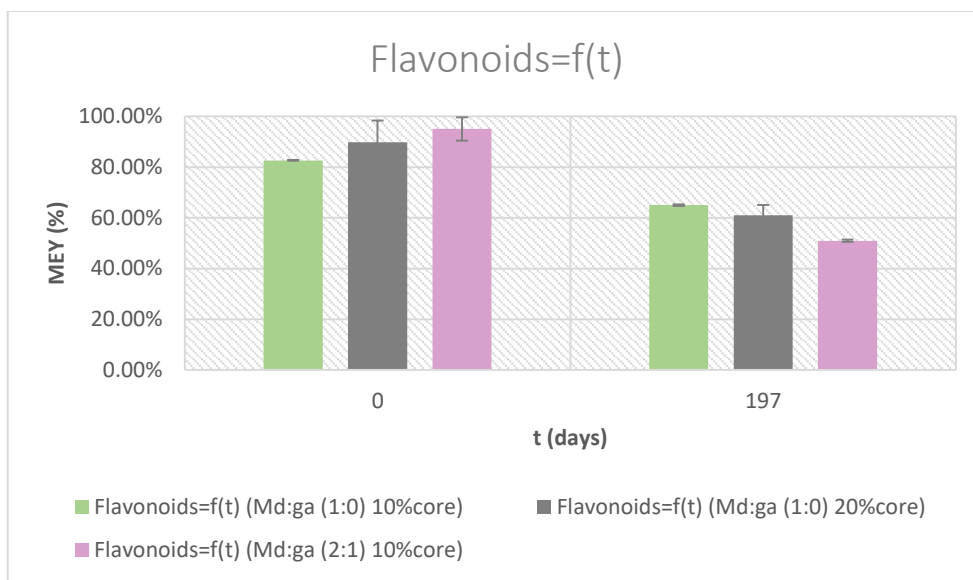
Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων μεγαλύτερης κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)		
	1:0	1:0	2:1
	Περιεκτικότητα core%		
	10	20	10
	Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού κατά το χρονικό διάστημα αποθήκευσης		
Ροσμαρινικό οξύ	12,71%	9,66%	15,08%
Φλαβονοειδή	21,39%	32,09%	46,37%
	Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού ΜΕΕ (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	97,06±0,08%	96,42±0,48%	88,37±2,00%
Φλαβονοειδή	96,27±0,17	97,59±0,46%	89,30±0,39%
Υγρασία κόνεων	4,44±0,21%	3,69±0,03%	7,52±0,02%

Στα διαγράμματα 9 και 10 φαίνεται η διατηρησιμότητα των συστατικών των εκχυλισμάτων στο διάστημα που εξετάστηκαν. Στο παράρτημα βρίσκονται τα αποτελέσματα της επανάληψης των αναλύσεων, στις 197 ημέρες από την παρασκευή των κόνεων.



Διάγραμμα 9. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. \*

Το ροσμαρινικό οξύ έχει διατηρηθεί αρκετά ικανοποιητικά σε διάστημα εξαμήνου στις κόνεις, αφού η μικρότερη απόδοση εγκλεισμού μετρήθηκε ίση με  $84,08 \pm 0,13\%$ , όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9, τιμή αρκετά υψηλή, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η αποθήκευση δεν έγινε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα  $N_2$ . Τη μεγαλύτερη υποβάθμιση σχετικά με την αρχική εγκλεισμένη ποσότητα RA έχει υποστεί η σκόνη που έχει ως φορέα εγκλεισμού και GA. Αυτό αιτιολογείται από την περιεχόμενη υγρασία αυτής που είναι αρκετά υψηλή ( $7,52 \pm 0,02\%$ ).

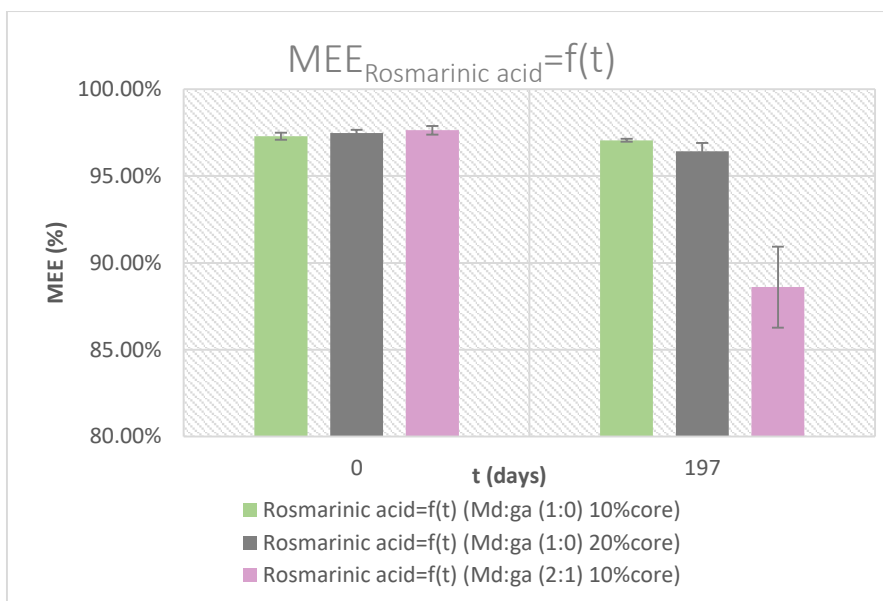


Διάγραμμα 10. Διατηρησιμότητα φλαβονοειδών σε διάστημα 197 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας

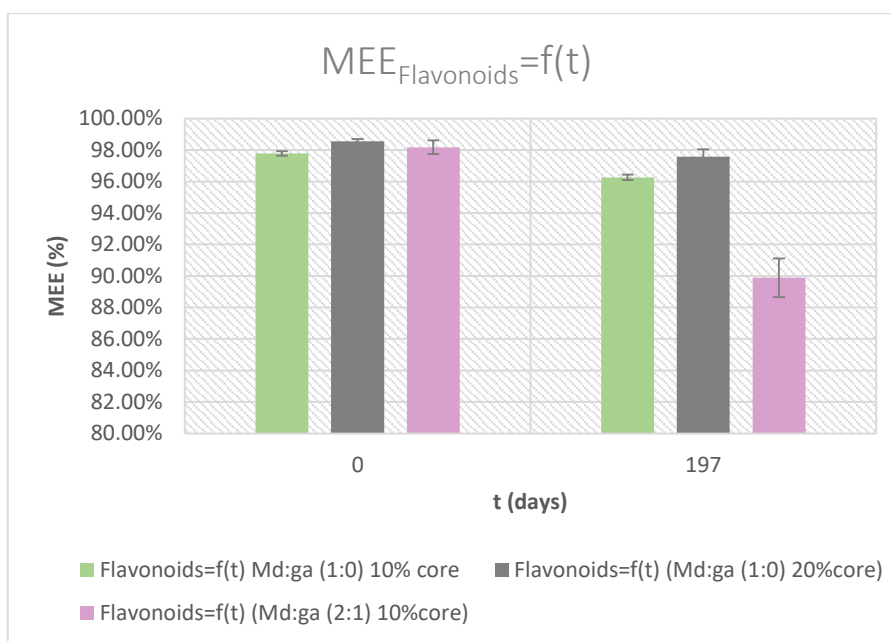
Αντίθετα με το ροσμαρινικό οξύ, στα φλαβονοειδή παρατηρείται μεγαλύτερη υποβάθμιση στις σκόνες σε διάστημα ενός εξαμήνου. Την μικρότερη μείωση σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση, φαίνεται να έχουν οι υποστεί οι σκόνες με φορέα εγκλεισμού μόνο την MD και περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά 10%.

Σχετικά με την διατήρηση των εγκλεισμένων ενώσεων στις μικροκάψουλες, στα Διαγράμματα 11 και 12 φαίνεται η μείωση της αποτελεσματικότητας εγκλεισμού στο διάστημα μελέτης. Από το διάγραμμα 11, είναι φανερό, ότι η εγκλεισμένη ποσότητα ροσμαρινικού οξέος μειώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στην περίπτωση των κόνεων που παρασκευάστηκαν με μίγμα φορέων εγκλεισμού MD:GA. Το παραπάνω δικαιολογείται καθώς το GA λειτουργεί σαν ημιπερατή μεμβράνη, με αποτέλεσμα τα βιοδραστικά συστατικά να διαπερνούν το κέλυφος της μικροκάψουλας. Αντίθετα, στις άλλες κόνεις που έχουν παρασκευαστεί με φορέα εγκλεισμού μόνο την MD, τα εγκλεισμένα συστατικά διατηρούνται καλύτερα, λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει γρήγορα ένα πυκνό φιλμ γύρω από τον πυρήνα κατά την ξήρανση με ψεκασμό. Ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στην περίπτωση των φλαβονοειδών με βάση το διάγραμμα 12.





Διάγραμμα 11. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 197 ημερών στις κόνες από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. \*



Διάγραμμα 12. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φλαβονοειδών σε διάστημα 197 ημερών στις κόνες από υδατικά εκχυλίσματα δεντρολίβανου μεγαλύτερης κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών και στερεών εκχυλίσματος στο μίγμα τροφοδοσίας. \*

### Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνων από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας

Οι αναλύσεις των κόνων, που προέρχονται από υδατικό εκχύλισμα πειραματικής κλίμακας, επαναλήφθηκαν σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή τους. Όπως φαίνεται, η θερμοκρασία του αέρα ξήρανσης αποτελεί παράμετρο στην ταχύτητα που θα αυξηθεί η υγρασία των κόνων, καθώς σε διάστημα 28 ημερών οι κόνες που παρασκευάστηκαν στους 140°C, είχαν υψηλότερα ποσοστά υγρασίας από αυτές που παρασκευάστηκαν στους 160°C. Αυτό επιβεβαιώνεται και με βάση τις αναλύσεις των κόνων

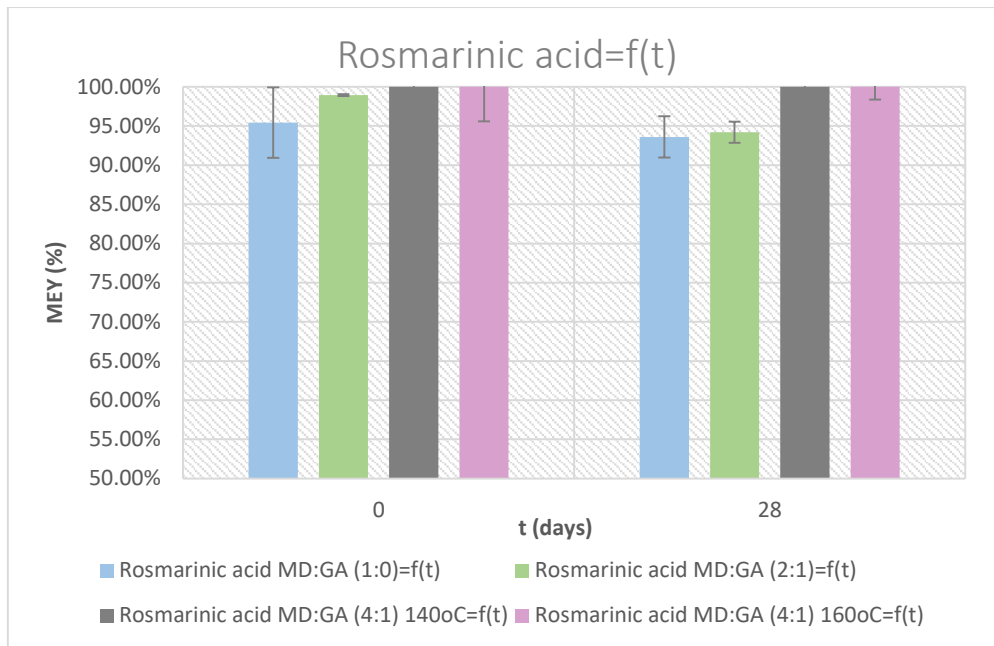
του υδατικού εκχυλίσματος μεγαλύτερης κλίμακας, που παρασκευάστηκαν στους 160°C και είχαν τέτοια επίπεδα υγρασίας στο εξάμηνο και όχι σε διάστημα μήνα.

Σχετικά με την διατηρησιμότητα του ροσμαρινικού οξέος, φαίνεται ότι αυτό διατηρείται καλύτερα όταν το εγκλειστικό μέσο είναι MD:GA σε αναλογία 4:1 ανεξαρτήτου θερμοκρασίας αέρα ξήρανσης, καθώς δεν παρατηρήθηκε απώλεια κατά την επανάληψη της ανάλυσης των κόνεων, μετά από 28 ημέρες. Σχετικά με τα φλαβονοειδή, η παρουσία του GA ως φορέα εγκλεισμού, οδήγησε σε μεγαλύτερες απώλειες αυτών στο διάστημα αυτό. Αντίθετα, τα φλαβονοειδή έχουν διατηρηθεί καλύτερα όταν το εγκλειστικό μέσο είναι μόνο MD, όπου το ποσοστό μείωσης αυτών ήταν μόλις 1,5% μετά από 28 ημέρες από την παρασκευή. Η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού δεν έχει υποστεί σημαντική μείωση στην διάρκεια των 28 ημερών και βρίσκεται σε πολύ ικανοποιητικά επίπεδα σε όλες τις κόνεις. Τα παραπάνω φαίνονται στον πίνακα 34.

Πίνακας 34. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή

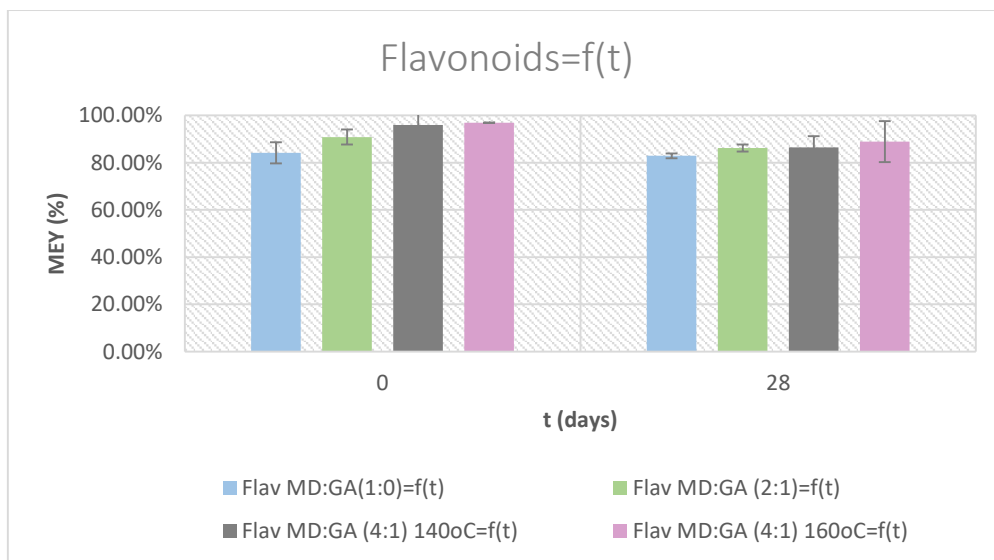
Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων πειραματικής κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)			
	1:0	4:1	4:1	2:1
	Θερμοκρασία (°C)			
	140	140	160	140
	Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού κατά το χρονικό διάστημα αποθήκευσης			
Ροσμαρινικό οξύ	1,90%	0,00%	0,00%	4,78%
Φλαβονοειδή	1,50%	9,21%	8,25%	5,13%
	MEE (%)			
Ροσμαρινικό οξύ	97,74±0,19%	97,87±0,96%	98,34±0,07%	98,81±0,21%
Φλαβονοειδή	96,86±0,11%	97,01±1,25%	96,61±0,29%	98,02±0,12%
Υγρασία κόνεων	5,90±0,19%	7,04±0,00%	3,70±0,00%	5,94±0,01%

Στα διαγράμματα 13 και 14 απεικονίζεται η απόδοση μικροεγκλεισμού των συστατικών την ημέρα παρασκευής των κόνεων και μετά από 28 ημέρες και κατά συνέπεια η διατηρησιμότητα αυτών στο διάστημα αυτό. Στο παράρτημα βρίσκονται και τα αποτελέσματα της επανάληψης των αναλύσεων, στις 28 ημέρες.



Διάγραμμα 13. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. \*

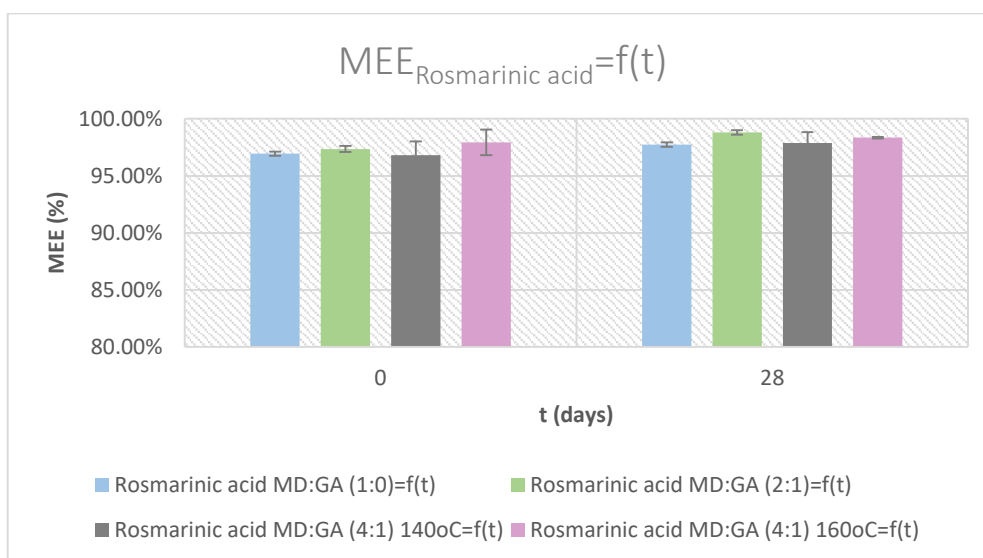
Ο ρυθμός που μειώνεται το ροσμαρινικό οξύ είναι μεγαλύτερος στις κόνες με εγκλειστικό μέσο MD:GA (2:1), καθώς η μείωση της απόδοσης μικροεγκλεισμού είναι μεγαλύτερη σε αυτή την περίπτωση. Αντίθετα οι κόνες με εγκλειστικό μέσο MD:GA (4:1) δεν έχουν υποστεί μεταβολή όσον αφορά την συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος στη διάρκεια μελέτης. Έτσι μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αύξηση της αναλογίας του φορέα σε GA έχει αντίθετη επίδραση στην απόδοση, κάτι που συμφωνεί με τους Tolun et al (2016).



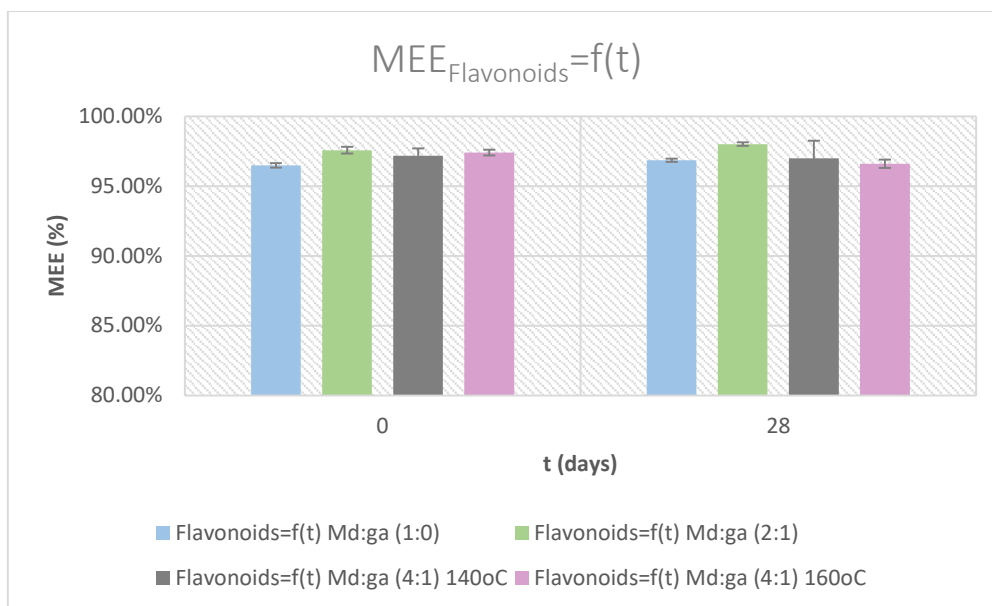
Διάγραμμα 14. Διατηρησιμότητα φλαβονοειδών σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία.

Τα φλαβονοειδή υφίστανται σχετικά ταχεία υποβάθμιση και πιο συγκεκριμένα μεγαλύτεροι ρυθμοί μείωσης παρατηρούνται στην περίπτωση των κόνεων που ως εγκλειστικό μέσο έχουν συνδυασμό φορέων MD και GA. Παρόλα αυτά, αυτές οι κόνεις συνεχίζουν να διατηρούν σε αυτό το χρονικό διάστημα υψηλότερες συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών συγκριτικά με τις κόνεις που παρασκευάστηκαν μόνο με MD.

Στα διαγράμματα 15 και 16 φαίνεται η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των συστατικών στις σκόνες σε διάστημα 28 ημερών. Συγκεκριμένα, επειδή στο διάστημα αυτό δεν έχει επέλθει ουσιαστικά υποβάθμιση των συστατικών στο εσωτερικό της μικροκάψουλας αλλά αυτή έχει ξεκινήσει μόνο στην εξωτερική επιφάνεια, φαίνεται η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού είτε να παραμένει σταθερή είτε να αυξάνεται.



Διάγραμμα 15. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ροσμαρινικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. \*



Διάγραμμα 16. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού φλαβονοειδών σε διάστημα 28 ημερών στις κόνειες από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας που παραλήφθηκαν με διαφορετικές αναλογίες επικαλυπτικών μέσων στο μίγμα τροφοδοσίας και διαφορετική θερμοκρασία. \*

#### Ανάλυση διατηρησιμότητας κόνεων από ακετονικά εκχυλίσματα

Μια δεύτερη σειρά αναλύσεων έγινε στις κόνειες από ακετονικά εκχυλίσματα σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή τους. Παρατηρείται ότι η υγρασία στις σκόνες δεν έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό και συγκεκριμένα εξασφαλίζεται η μικροβιακή σταθερότητα στο διάστημα αυτό. Η υποβάθμιση των φαινολικών διτερπενίων είναι αναμενόμενη, καθώς και η μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη και άλλα φαινολικά διτερπένια. Έτσι, πιο ασφαλή είναι τα συμπεράσματα μέσω της ανάλυσης των ολικών φαινολικών διτερπενίων.

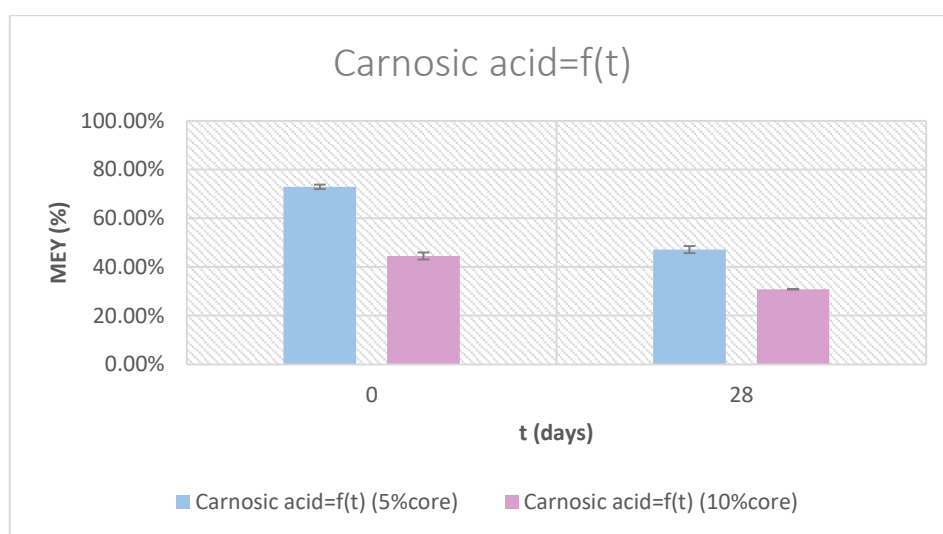
Πίνακας 35. Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού στη μικροκάψουλα και αποτελεσματικότητα εγκλεισμού σε κόνειες από ακετονικά εκχυλίσματα σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή

Φαινολικά συστατικά Ακετονικών εκχυλισμάτων	Περιεκτικότητα core	
	5%	10%
	Φορέας Εγκλεισμού (MD:GA)	
	2:1	2:1
<b>Ποσοστό απώλειας κάθε συστατικού κατά το χρονικό διάστημα αποθήκευσης</b>		
Ολικά φαινολικά διτερπένια	28,67%	18,14%
Καρνοσικό οξύ	35,28%	30,74%
Καρνοσόλη	0,00%	15,35% <sup>a</sup>
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	55,02%	21,00% <sup>a</sup>
<b>MEE (%)</b>		
Ολικά φαινολικά διτερπένια	69,29±6,32%	55,01±0,12%
Καρνοσικό οξύ	72,99±1,74%	52,37±0,77%
Καρνοσόλη	64,48±13,34%	51,28±1,91%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	67,62±7,07%	76,69±4,90%
Υγρασία κόνεων	3,45±0,06%	2,72±0,21%

a: Ποσοστό αύξησης λόγω οξειδωσης του καρνοσικού οξέος και μετατροπής αυτού σε καρνοσόλη και άλλα φαινολικά διτερπένια

Στην περίπτωση της καρνοσόλης και των λοιπών φαινολικών διτερπενίων στις κόνεις με περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα 10%, στο ποσοστό απώλειας αναγράφεται ουσιαστικά το ποσοστό αύξησης των συστατικών στο διάστημα μελέτης σε σχέση με την αρχική μέτρηση. Αυτή η αύξηση οφείλεται όπως έχει προαναφερθεί στην οξείδωση του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη και άλλα φαινολικά διτερπένια. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της ανάλυσης της σκόνης με 5% περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα, φαίνεται ότι η καρνοσόλη δεν υποβαθμίζεται καθόλου. Η εικόνα αυτή αιτιολογείται από τις παράλληλες αντιδράσεις υποβάθμισης της υπάρχουσας καρνοσόλης και της παραγωγής νέας από το καρνοσικό οξύ, με αποτέλεσμα αυτή να διατηρείται στα ίδια αρχικά επίπεδα, εν προκειμένω 100% απόδοση εγκλεισμού.

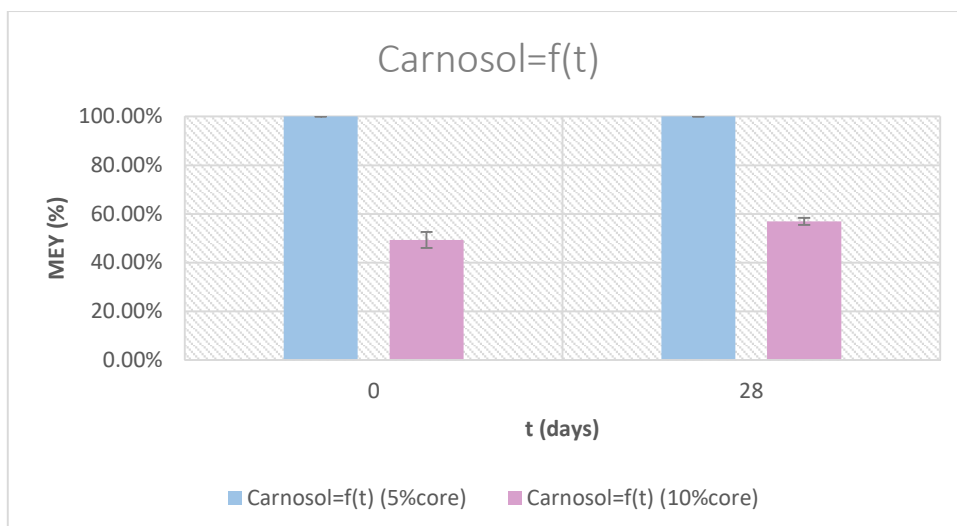
Στα διαγράμματα 17-20 απεικονίζεται η απόδοση μικροεγκλεισμού των φαινολικών διτερπενίων την ημέρα παρασκευής των κόνενων και μετά από 28 ημέρες και κατά συνέπεια η διατηρησιμότητα αυτών στο διάστημα αυτό. Στο παράρτημα βρίσκονται και τα αποτελέσματα της επανάληψης των αναλύσεων, στις 28 ημέρες.



Διάγραμμα 17. Διατηρησιμότητα καρνοσικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας.

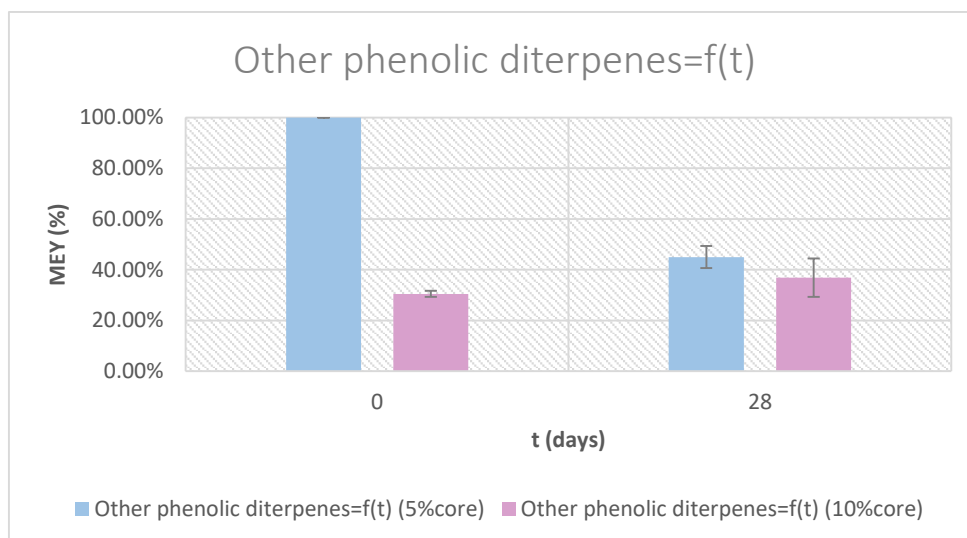
Στο διάγραμμα 17 φαίνεται η μείωση του καρνοσικού οξέος στο διάστημα των 28 ημερών. Ειδικότερα, παρόλο που οι σκόνες με περιεκτικότητα core (5%) έχουν υψηλότερη απόδοση σε καρνοσικό οξύ από τις σκόνες υψηλότερης περιεκτικότητας (10% core), φαίνεται ότι η υποβάθμιση του καρνοσικού οξέος είναι πιο ταχεία σε αυτές.





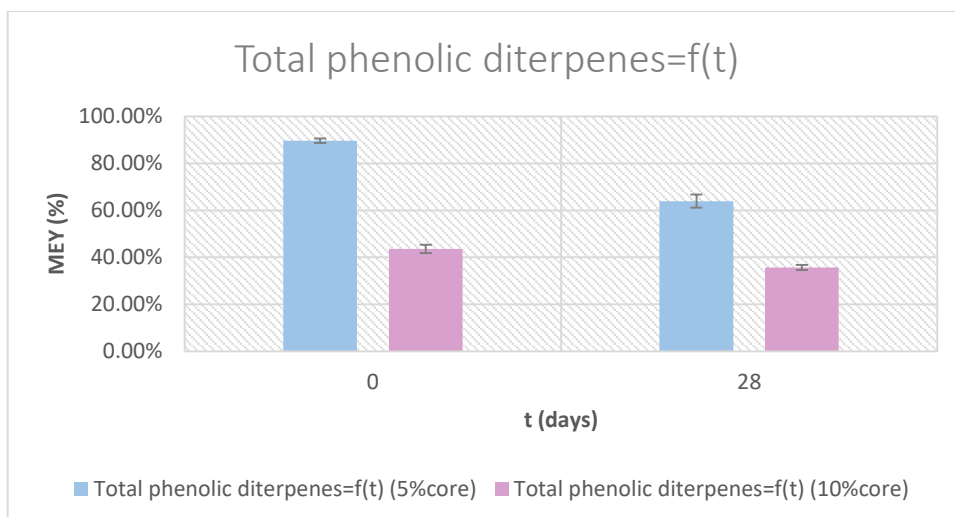
Διάγραμμα 18. Διατηρησιμότητα καρνοσόλης σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

Όπως προαναφέρθηκε η καρνοσόλη, λόγω των μετατροπών του καρνοσικού οξέος σε αυτήν, δεν υφίσταται φαινομενικά υποβάθμιση στην αρχή. Το παραπάνω φαίνεται στο διάγραμμα 18 όπου και συγκεκριμένα στο διάστημα μελέτης παρατηρείται ακόμη και αύξηση της καρνοσόλης, στις σκόνες με περιεκτικότητα core 10%.



Διάγραμμα 19. Διατηρησιμότητα λοιπών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνεις από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

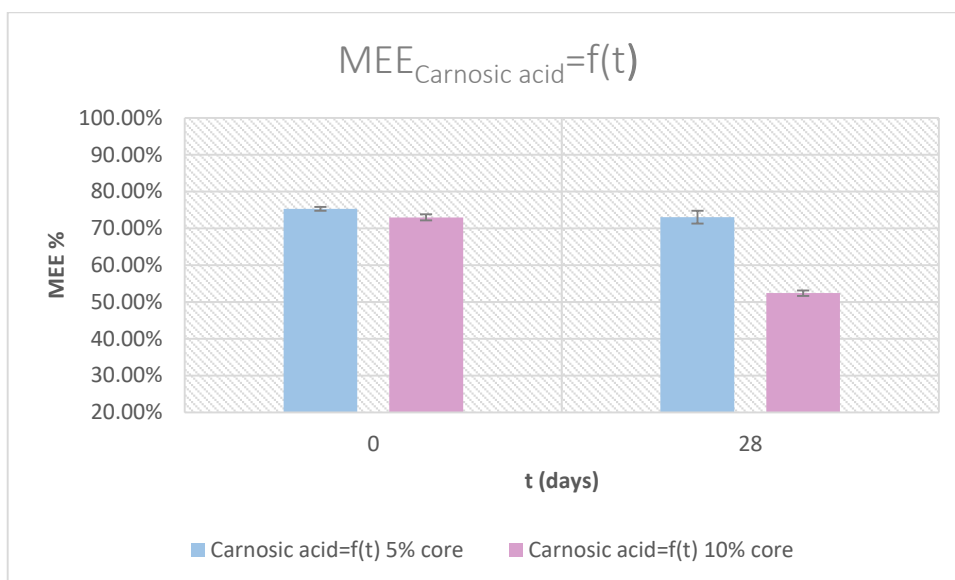
Το χρονικό διάστημα των 28 ημερών φαίνεται ότι δεν είναι αρκετό για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών του καρνοσικού οξέος, εκτός της καρνοσόλης, όταν η περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά είναι 5%, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι τα λοιπά φαινολικά διτερπένια υφίστανται μείωση στις σκόνες αυτές. Στην περίπτωση της μεγαλύτερης περιεκτικότητας ενεργών συστατικών (10% core) φαίνεται ότι έχει ξεκινήσει αυτή η μετατροπή.



Διάγραμμα 20. Διατηρησιμότητα ολικών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

Σε διάστημα 28 ημερών με βάση το διάγραμμα 20 φαίνεται ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών διτερπενίων μειώθηκε λιγότερο στις κόνες με περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά 10%. Παρόλα αυτά οι κόνες με μικρότερη περιεκτικότητα (5% core) εξακολουθούν να διατηρούν υψηλότερες αποδόσεις εγκλεισμού φαινολικών διτερπενίων.

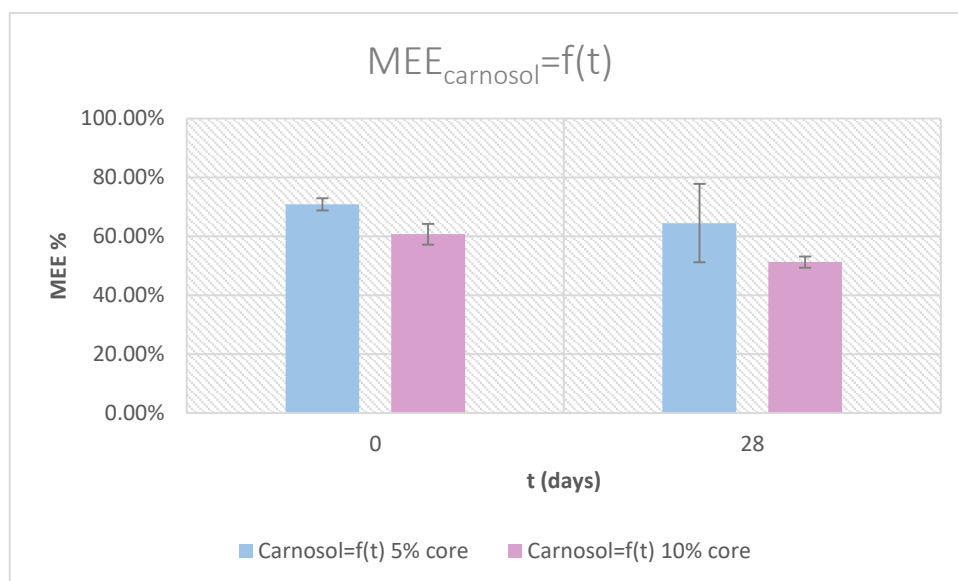
Στα διαγράμματα 21-24 φαίνεται η διατήρηση των φαινολικών διτερπενίων στο εσωτερικό της μικροκάψουλας μέσω της μέτρησης της αποτελεσματικότητας στο διάστημα των 28 ημερών.



Διάγραμμα 21. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού καρνοσικού οξέος σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας. \*

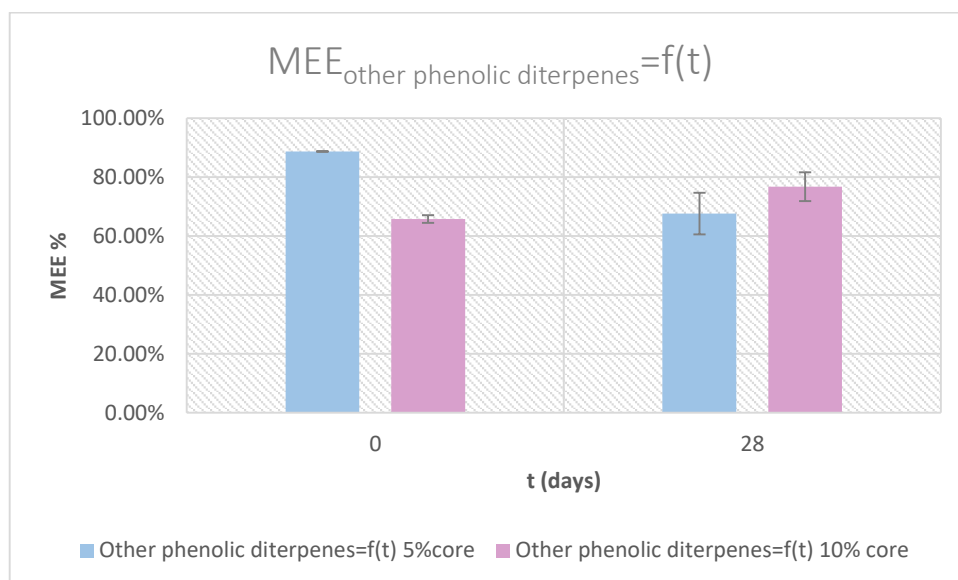
Στην περίπτωση των κόνων με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα (10% core), η αποικοδόμηση του καρνοσικού οξέος δεν υφίσταται μόνο στην εξωτερική επιφάνεια αλλά έχει ξεκινήσει ήδη και στο εσωτερικό της μικροκάψουλας. Αντίθετα, για τις κόνες με

περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά 5% η υποβάθμιση του καρνοσικού οξέος συμβαίνει ως επί το πλείστον στην εξωτερική επιφάνεια.



Διάγραμμα 22. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού καρνοσόλης σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

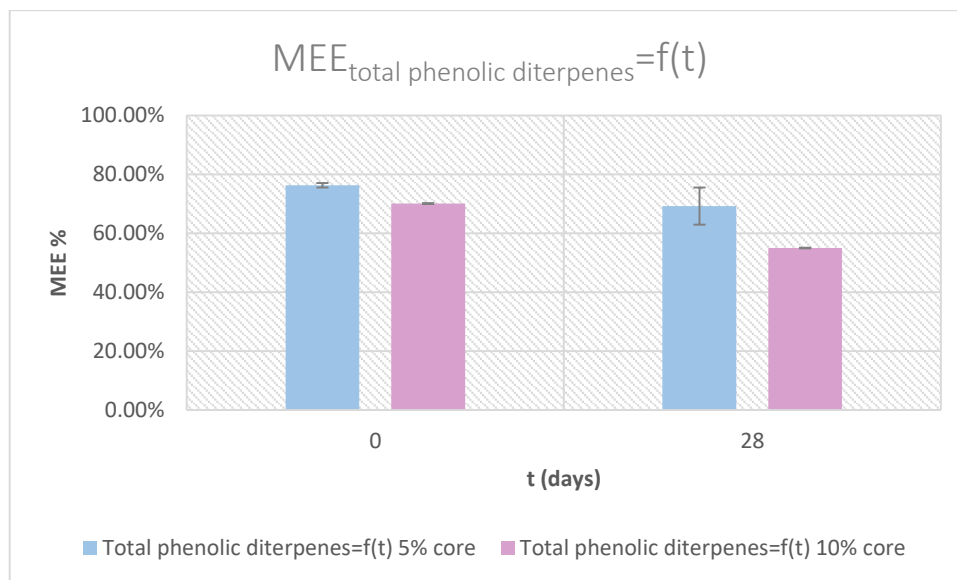
Η εγκλεισμένη ποσότητα καρνοσόλης μειώνεται με τον χρόνο, καθώς η νέα παραγόμενη ποσότητα αυτής βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται παρουσία οξυγόνου αρχικά σε καρνοσόλη και έτσι παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης αυτής στην επιφάνεια των μικροκαψουλών και επακόλουθα μείωση της αποτελεσματικότητας μικροεγκλεισμού.



Διάγραμμα 23. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού λοιπών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

Στο χρονικό διάστημα των 28 ημερών τα δευτερεύοντα φαινολικά διτερπένια που βρίσκονται στις κόνες με περιεκτικότητα 5% σε ελαιοδιάλυμα, έχουν αρχίσει να αποικοδομούνται, χωρίς ταυτόχρονη μετατροπή του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης

σε αυτά όπως προαναφέρθηκε. Έτσι καθώς το αραβικό κόμμα δρα σαν ημιπερατή μεμβράνη, απελευθερώνεται ποσότητα των δευτερευόντων φαινολικών διτερπενίων στην εξωτερική επιφάνεια των μικροκαψουλών, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μειωμένη η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού. Αντίθετα, στις κόνες με περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα 10% καθώς έχει ξεκινήσει η μετατροπή των κύριων φαινολικών διτερπενίων στα δευτερεύοντα, αυξάνεται η συγκέντρωση αυτών στο εσωτερικό της μικροκάψουλας και έτσι η αποτελεσματικότητα εμφανίζει αύξηση.



Διάγραμμα 24. Αποτελεσματικότητα εγκλεισμού ολικών φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 28 ημερών στις κόνες από ακετονικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με διαφορετικές περιεκτικότητες ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων στο γαλάκτωμα τροφοδοσίας

Τα ολικά φαινολικά διτερπένια που παραμένουν εγκλεισμένα μετά από 28 ημέρες, φαίνεται ότι μειώνονται, με μεγαλύτερη μείωση στην περίπτωση των κόνων με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές είναι ευοξειδωτές και όπως προαναφέρθηκε η παρουσία του GA παρουσιάζει περιορισμένη προστασία έναντι των οξειδωτικών αντιδράσεων.

Αναφέρεται ότι, στα διαγράμματα του υποκεφαλαίου με τη σήμανση (\*) στην λεζάντα έχει γίνει τροποποίηση του άξονα γ και συγκεκριμένα μεγέθυνση αυτού, έτσι ώστε να είναι πιο διακριτές οι διαφορές των αποτελεσμάτων.

## Καλλυντικές συνθέσεις εμπλουτισμένες με εκχυλίσματα δεντρολίβανου

Τελικό στάδιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η παρασκευή συνθέσεων που προσομοιάζουν τα καλλυντικά. Αρχικά, παρασκευάστηκαν γαλακτώματα (o/w) στα οποία μελετήθηκε η διατηρησιμότητα των φαινολικών ενώσεων σε θερμοκρασίες 15 και 37°C. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικές αναλύσεις, αλλά και οπτικός έλεγχος σταθερότητας. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν καλλυντικές κρέμες (w/o), εμπλουτισμένες με βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου (φαινολικά διτερπένια ή/και ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή). Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε μία κρέμα χωρίς βιοδραστικά συστατικά (κρέμα Blank), μία κρέμα εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια (κρέμα 1), μία με ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή (κρέμα 3) και τέλος μία με το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου (κρέμα 2). Στις κρέμες πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, ανάλυση Folin-Ciocalteu, DPPH αλλά και μέτρηση pH.

## Μελέτη διατηρησιμότητας φαινολικών ενώσεων σε γαλακτώματα

Ακετονικό εκχύλισμα ενσωματώθηκε σε ελαιώδη φορέα (έλαιο MCT) με σκοπό την παρασκευή ελαιοδιαλυμάτων 2,5 και 5% σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, τα οποία αντίστοιχα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ενός γαλακτώματος (o/w) και για την παρασκευή κρεμών (w/o).

Αρχικά, το ακετονικό εκχύλισμα αναλύθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά διτερπένια. Υπολογίστηκε η συγκέντρωση της καρνοσόλης ίση με 209 mg/L, του καρνοσικού οξέος ίση 939 mg/L και των λοιπών φαινολικών διτερπενίων ίση με 151 mg/L επί του αρχικού υγρού εκχυλίσματος. Παρασκευάστηκε ελαιοδιάλυμα περιεκτικότητας 2,5% w/w σε καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ, καθώς αυτά αποτελούν τα πιστοποιημένα αντιοξειδωτικά συστατικά. Η παρασκευή έγινε με προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας ελαίου MCT στο εκχύλισμα και το μίγμα οδηγήθηκε για συμπύκνωση προς απομάκρυνση όλης της ακετόνης σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα. Με βάση τον νόμο αραιώσης προκύπτουν οι θεωρητικές τιμές των συγκεντρώσεων των φαινολικών διτερπενίων όπως φαίνεται παρακάτω.

$$c_{\text{carnosic acid}_{\text{extract}}} \cdot V_{\text{extract}} = c_{\text{carnosic acid}_{\text{oil solution}}} \cdot m_{\text{MCT}} \rightarrow$$
$$939 \frac{\text{mg καρνοσικού οξέος}}{\text{L εκχυλίσματος}} \cdot 400 \text{ mL εκχυλίσματος} = c \cdot 182,96 \text{ g MCT} \rightarrow$$
$$c = 2.052,91 \frac{\text{mg καρνοσικού οξέος}}{\text{kg ελαιοδιαλύματος}}$$

Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που υποβλήθηκε το ελαιοδιάλυμα για την απομάκρυνση της ακετόνης, θεωρήθηκε απαραίτητη η επιπλέον ανάλυσή του με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τον επαναπροσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά διτερπένια, καθώς αυτά τα συστατικά οξειδώνονται με τη θερμοκρασία με αποτέλεσμα αυτή τελικά να είναι χαμηλότερη από 2,5%.

Πίνακας 36. Θεωρητική συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων στο ελαιοδιάλυμα

Δείγμα	Καρνοσικό οξύ (mg/L)	Καρνοσόλη (mg/L)	Λοιπά φαινολικά διτερπένια (mg/L)
Θεωρητική τιμή στο ελαιοδιάλυμα	2.053	457	330

Συγκεκριμένα, η υποβάθμιση του ελαιοδιαλύματος κρίνεται μέσω της συγκέντρωσης καρνοσικού οξέος, που είναι ένας πιο ασφαλής δείκτης, καθώς αυτό δύναται μόνο να μειωθεί, σε αντίθεση με τα άλλα φαινολικά διτερπένια που η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί από την μετατροπή του πρώτου σε αυτά λόγω της οξείδωσης που υφίσταται από τη θερμοκρασία. Η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος στο ελαιοδιάλυμα προσδιορίστηκε από την ανάλυση ίση με  $1.820 \pm 3$  mg/L δηλαδή είχε μια ανάκτηση ίση με 88,7%, ενώ η καρνοσόλη λόγω της οξείδωσης του καρνοσικού οξέος είχε ανάκτηση 120,4% σε σχέση με την θεωρητική τιμή. Το προκύπτον ελαιοδιάλυμα αποτέλεσε την ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων, στα οποία μελετήθηκε η διατηρησιμότητα των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διατηρησιμότητας, πραγματοποιήθηκε συγχρόνως έλεγχος της σταθερότητας του γαλακτώματος σε  $T=15^{\circ}\text{C}$ , τοποθετώντας 10 mL αυτού σε βαθμονομημένα σωληνάκια και ελέγχοντας για τυχόν διαχωρισμό. Στο διάστημα από 30/6/20 έως και 13/7/20 δεν υπήρξε διαχωρισμός των γαλακτωμάτων, ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε καταβύθιση, πιθανότατα των μονογλυκεριδίων, χωρίς όμως να επηρεάζεται η σύσταση των γαλακτωμάτων, καθώς οι αναλύσεις γίνονταν μετά από έντονη ανάδευση με vortex, οπότε και επέρχονταν η ομοιογένεια του γαλακτώματος.



Εικόνα 62. Οπτικός έλεγχος σταθερότητας γαλακτώματος σε θερμοκρασία  $T=15^{\circ}\text{C}$   
α)  $t=0$ , b)  $t=6$  days, c)  $t=10$  days, d)  $t=13$  days

Το γαλάκτωμα αμέσως μετά την παρασκευή του (30/6/2020) αναλύθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπου και η συγκέντρωση των φαινολικών διτερπενίων



στην ελαιώδη φάση δεν είχε μειωθεί συγκριτικά με αυτή του ελαιοδιαλύματος. Η ανάλυση επαναλήφθηκε σε τακτικά χρονικά διαστήματα, μέχρι 21 ημέρες, με σκοπό τον έλεγχο της υποβάθμισης των φαινολικών συστατικών σε συνθήκες περιβάλλοντος και επιταχυνόμενης γήρανσης. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των αναλύσεων σε θερμοκρασίες 15 και 37°C για το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων.

Πίνακας 37. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων, ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 37°C

Χρόνος αποθήκευσης (days)	Καρνοσικό οξύ (mg/L)	Καρνοσόλη (mg/L)	Λοιπά φαινολικά διτερπένια (mg/L)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (mg/L)
0	1.824±6	553±6	214±3	2.592±9
6	635±3	858±2	996±16	2.490±17
8	610±6	640±9	1.154±49	2.405±50
10	436±17	615±35	1.165±57	2.216±70
13	200±12	626±57	1.059±75	1.885±95
15	0±0	272±21	1.509±214	1.781±215
20	0±0	46±0	1.451±10	1.498±10

Πίνακας 38. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών (ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή) στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων, ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 37°C

Χρόνος αποθήκευσης (days)	Ροσμαρινικό οξύ (mg/L)	Φλαβονοειδή (mg/L)
0	477±13	522±12
7	368±2	503±6
9	361±11	447±9
10	350±3	435±16
13	338±4	419±28
16	325±1	389±16
21	304±6	383±8

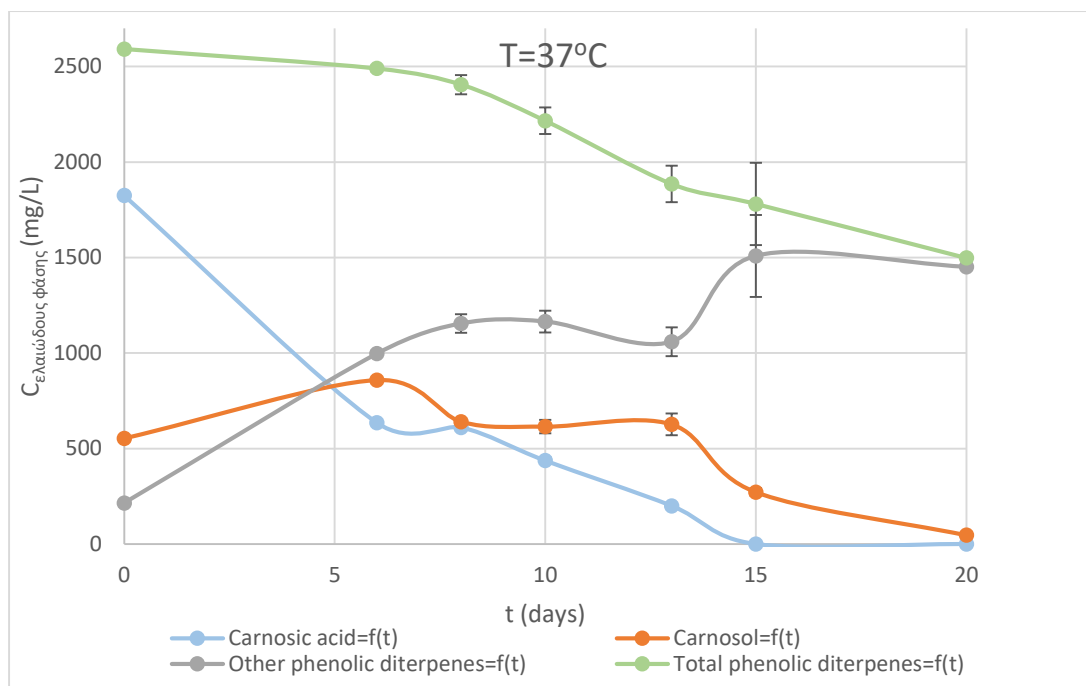
Πίνακας 39. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 15°C

Χρόνος αποθήκευσης (days)	Καρνοσικό οξύ (mg/L)	Καρνοσόλη (mg/L)	Λοιπά φαινολικά διτερπένια (mg/L)	Ολικά φαινολικά διτερπένια (mg/L)
0	1.824±6	553±6	214±3	2.592±9
6	1.518±13	624±5	201±2	2.343±14
10	1.491±22	575±12	203±1	2.270±25
13	1.194±7	543±4	349±2	2.086±9
16	1.111±12	397±3	562±12	2.070±18
20	887±3	466±1	461±3	1.815±4

Πίνακας 40. Συγκεντρώσεις βιοδραστικών συστατικών (ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή) στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων ως συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης στους 15°C

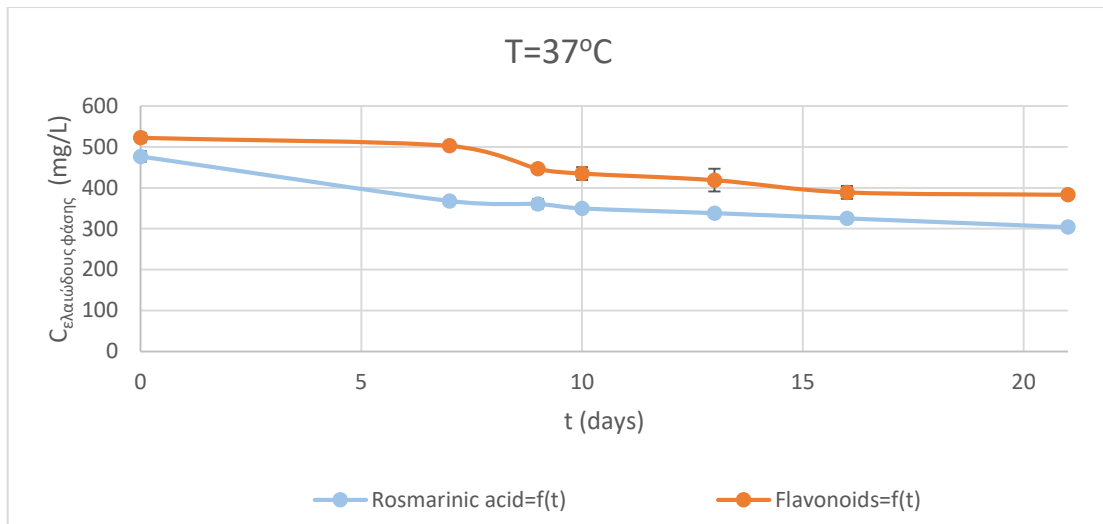
Χρόνος αποθήκευσης (days)	Ροσμαρινικό οξύ (mg/L)	Φλαβονοειδή (mg/L)
0	477±13	522±12
7	376±13	509±7
10	366±33	440±4
13	361±9	434±5
16	342±25	432±41
21	334±12	407±32

Ακολουθούν τα διαγράμματα συγκέντρωσης-χρόνου των βιοδραστικών συστατικών στις θερμοκρασίες των 15 και 37°C, για την απεικόνιση των πειραματικών μετρήσεων που βρίσκονται στους πίνακες 37 - 40.



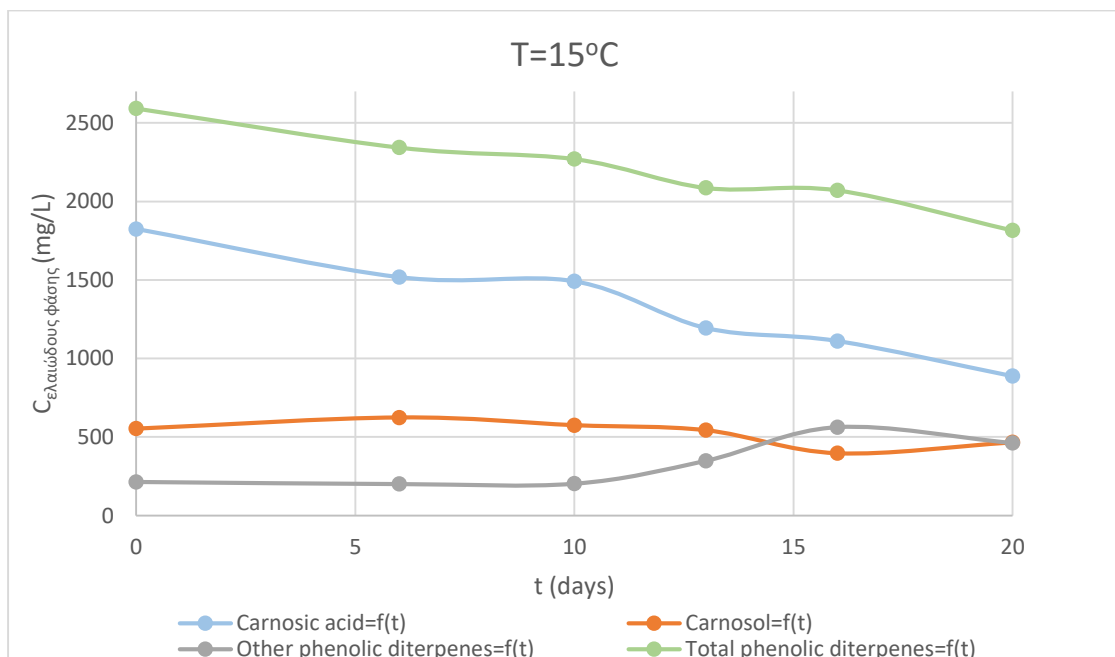
Διάγραμμα 25. Διατηρησιμότητα φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 20 ημερών στους 37°C

Στο διάγραμμα 25 είναι εμφανής η μετατροπή του καρνοσικού οξέος αρχικά σε καρνοσόλη και μετέπειτα σε άλλα παράγωγα φαινολικά διτερπένια. Συγκεκριμένα, σε διάστημα μόλις 15 ημερών όλο το καρνοσικό οξύ έχει μετατραπεί σε παράγωγα φαινολικά διτερπένια. Η καρνοσόλη ως συστατικό, παρουσιάζει μια αυξομείωση στην συγκέντρωσή της, λόγω των πιο σύνθετων μετατροπών του καρνοσικού οξέος σε αυτή, αλλά και της μετατροπής αυτής σε άλλα δευτερεύοντα φαινολικά διτερπένια. Έτσι, αρχικά παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση μέχρι την 6<sup>η</sup> ημέρα, λόγω της μετατροπής του καρνοσικού οξέος σε αυτή. Στη συνέχεια όμως, η ίδια υφίσταται υποβάθμιση, με αυτή να είναι εξαιρετικά ταχεία από την 13<sup>η</sup> ημέρα και μετά. Η συγκέντρωση των λοιπών φαινολικών διτερπενίων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της μελέτης και από την 15<sup>η</sup> ημέρα και μετά, όπως φαίνεται από την τελευταία σειρά μετρήσεων (ημέρα 20), ξεκινάει η αποικοδόμηση και αυτών των συστατικών.



Διάγραμμα 26. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε διάστημα 21 ημερών στους 37°C

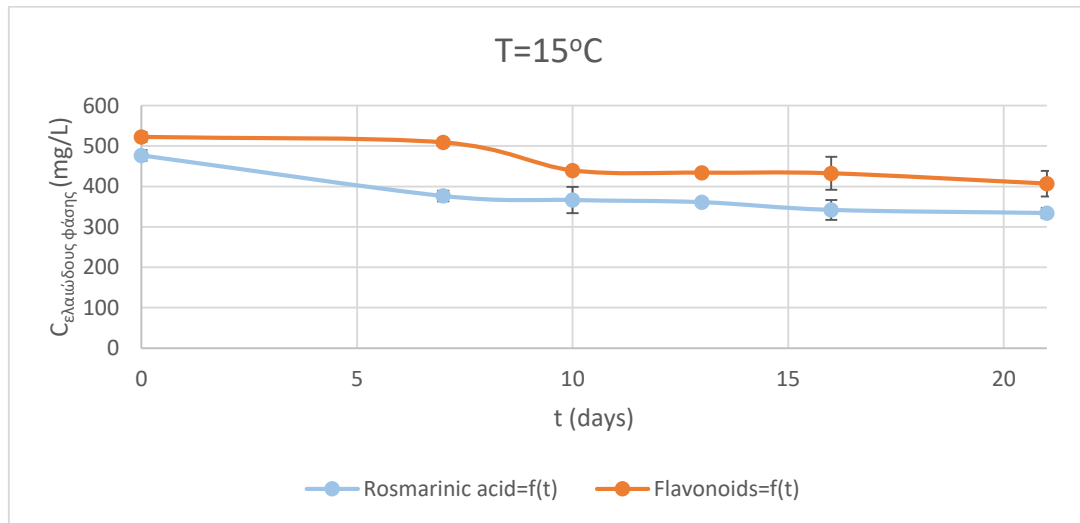
Το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή βρίσκονται σε σχετικά μικρές περιεκτικότητες στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων και υφίστανται μια σχετικά ταχεία υποβάθμιση στη θερμοκρασία των 37°C.



Διάγραμμα 27. Διατηρησιμότητα φαινολικών διτερπενίων σε διάστημα 20 ημερών στους 15°C

Στην μελέτη διατηρησιμότητας σε θερμοκρασία 15°C, παρατηρείται μια πιο αργή μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε λοιπά παράγωγα φαινολικά διτερπένια. Συγκεκριμένα, μέχρι την τελευταία ημέρα των αναλύσεων, η συγκέντρωση αυτού στα γαλακτώματα είχε μειωθεί κατά 51,29%. Φαίνεται ότι το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη, αλλά και αυτή η παράγωγη ουσία υφίσταται μετατροπή σε άλλα παράγωγα με τον χρόνο και για τον λόγο αυτό υπάρχει η αυξομείωση της συγκέντρωσης της στην ελαιώδη φάση του γαλακτώματος. Ακόμη, μέχρι την 16<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται αύξηση των λοιπών φαινολικών διτερπενίων, καθώς τα δύο κύρια φαινολικά διτερπένια, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη,

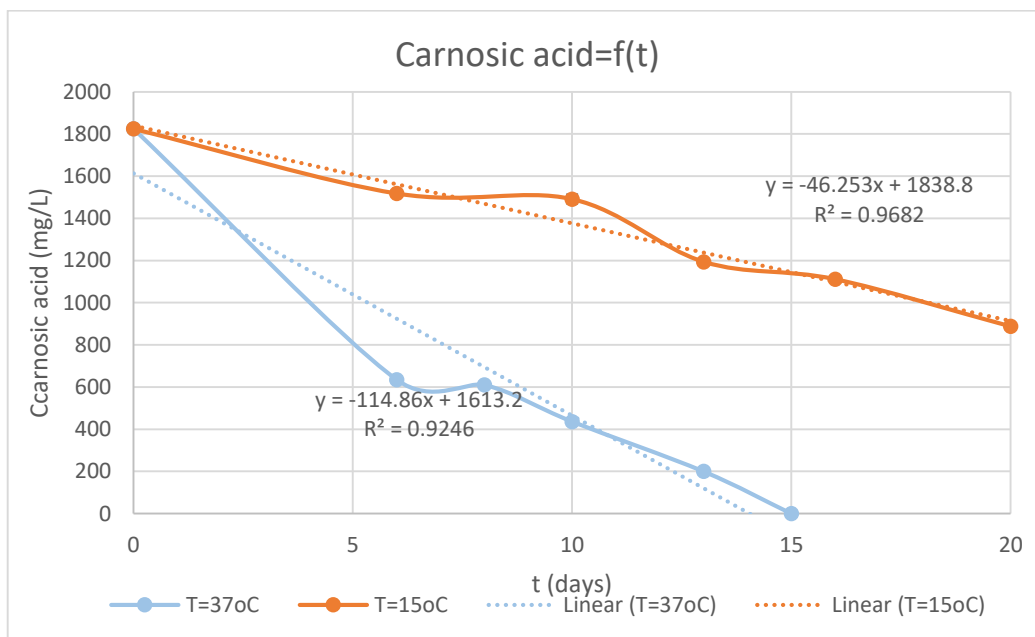
μετατρέπονται σε αυτά. Από την 16<sup>η</sup> ημέρα και μετά ξεκινάει μείωση της συγκέντρωσης και αυτών, καθώς τα γαλακτώματα υποβαθμίζονται περεταίρω.



Διάγραμμα 28. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος και φλαβονοειδών σε διάστημα 21 ημερών στους 15°C

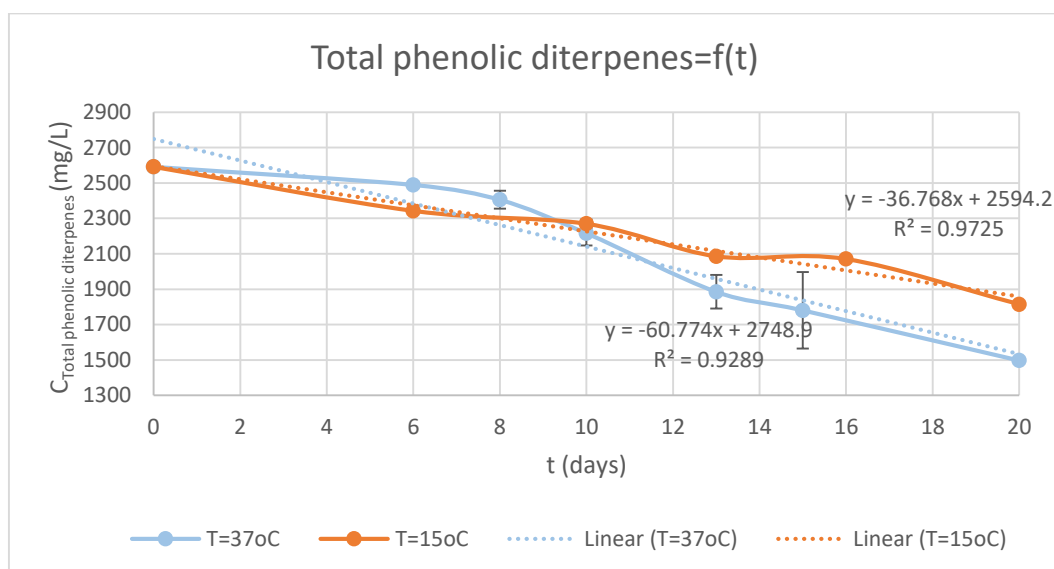
Η υποβάθμιση των φλαβονοειδών και του ροσμαρινικού οξέος στους 15°C συγκριτικά με τους 37°C είναι λιγότερο ταχεία.

Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση της υποβάθμισης που υφίσταται κάθε βιοδραστικό ή ομάδα βιοδραστικών συστατικών, ανάλογα με τη θερμοκρασία αποθήκευσης των γαλακτωμάτων. Με προσαρμογή των πειραματικών σημείων, ελέγχεται η τάξη της αντίδρασης υποβάθμισης κάθε συστατικού ή ομάδας συστατικών. Συγκεκριμένα, ελέγχεται αν ακολουθείται κινητική μηδενικής ή πρώτης τάξης και η καλύτερη προσαρμογή δίνεται στα διαγράμματα του υποκεφαλαίου. Στο παράρτημα βρίσκονται τα διαγράμματα με την λιγότερο ικανοποιητική προσαρμογή.



Διάγραμμα 29. Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 20 ημερών

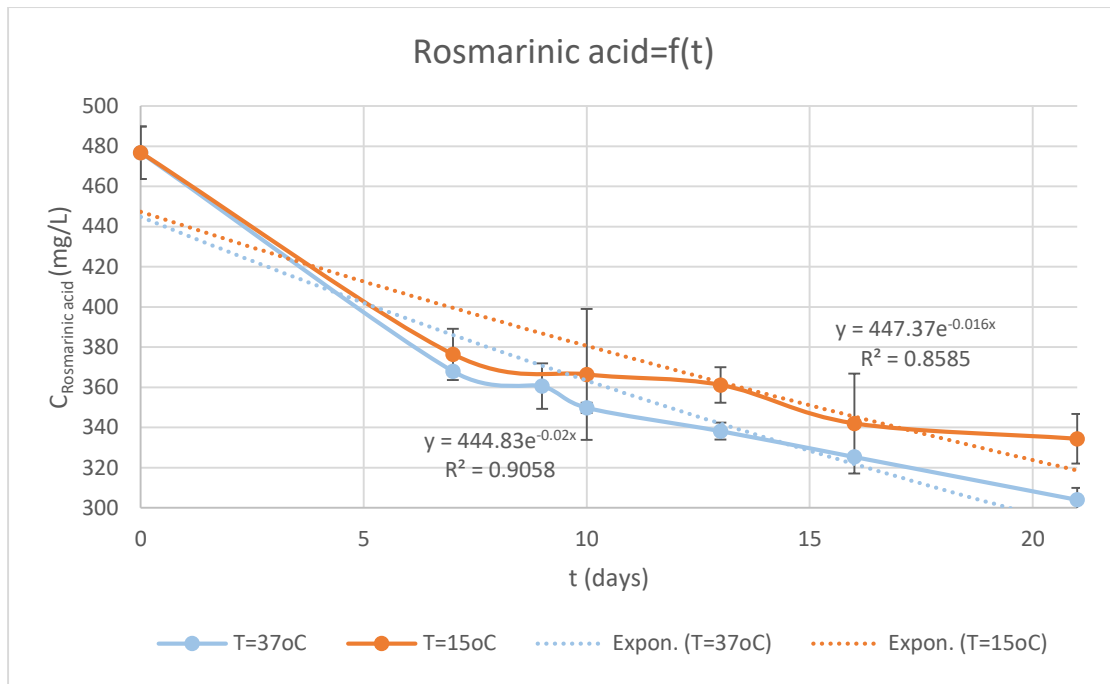
Στο διάγραμμα 29 είναι εμφανής η ταχύτερη υποβάθμιση του καρνοσικού οξέος στους 37°C συγκριτικά με τους 15°C, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η θερμοκρασία επιδράει καθοριστικά στην μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε άλλα λιγότερο δραστικά φαινολικά διτερπένια. Στην περίπτωση των 15°C, δοκιμάσθηκε κινητική μηδενικής και πρώτης τάξης και τα αποτελέσματα έδειξαν συντελεστή συσχέτισης  $R^2=0,9682$  και  $R^2=0,9467$  αντίστοιχα. Καλύτερη προσαρμογή, με μικρή διαφορά, έχει λοιπόν η κινητική μηδενικής τάξης και η σταθερά του ρυθμού αντίδρασης υποβάθμισης του καρνοσικού οξέος θεωρείται ότι είναι  $k_{\text{Carnosic acid},15}=46,253 \text{ days}^{-1}$ . Στην περίπτωση των 37°C όπου έχει υποστεί πλήρη αποικοδόμηση το καρνοσικό οξύ, η σταθερά του ρυθμού υποβάθμισης υπολογίστηκε ίση με  $k_{\text{Carnosic acid},37}=114,860 \text{ days}^{-1}$ . Η σταθερά ρυθμού με αύξηση της θερμοκρασίας από 15 στους 37°C υφίσταται μεγάλη αύξηση, περίπου 2,5 φορές, και για τον λόγο αυτό αιτιολογείται και η ταχύτερη υποβάθμιση του καρνοσικού οξέος στην υψηλότερη θερμοκρασία.



Διάγραμμα 30. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών διτερπενίων στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 20 ημερών

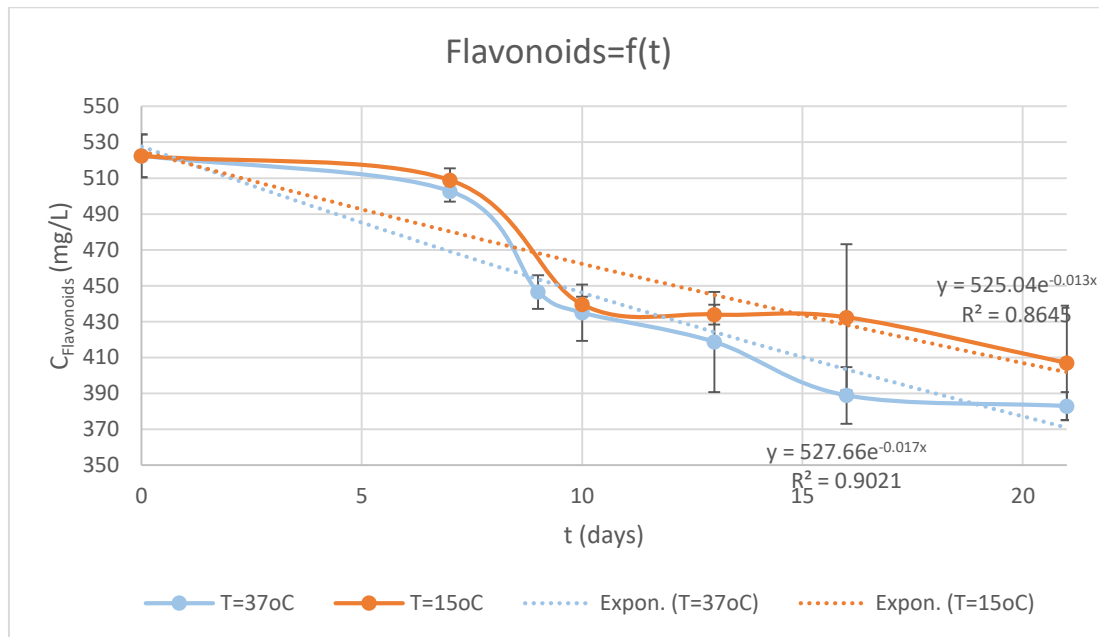
Στα πειραματικά σημεία που αφορούσαν τα ολικά φαινολικά διτερπένια, εφαρμόστηκε και γραμμικό και εκθετικό μοντέλο, δηλαδή εξετάστηκε αν ακολουθείται κινητική μηδενικής ή πρώτης τάξης αντίστοιχα. Στους 37°C προέκυψαν οι συντελεστές συσχέτισης για κινητική μηδενικής τάξης  $R^2=0,9289$  και για πρώτης  $R^2=0,9147$ . Αντίστοιχα, στους 15°C οι συντελεστές συσχέτισης ήταν  $R^2=0,9725$  και  $R^2=0,9599$ . Και στις δύο θερμοκρασίες, καλύτερη προσαρμογή, με μικρή διαφορά, έχει η κινητική μηδενικής τάξης και οι σταθερές του ρυθμού υποβάθμισης των ολικών φαινολικών διτερπενίων δίνονται στον πίνακα 41, που βρίσκεται στο τέλος της υποκεφαλαίου.





Διάγραμμα 31. Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 21 ημερών

Εφαρμόζοντας κινητική μηδενικής και πρώτης τάξης στα πειραματικά σημεία που αφορούν τη συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος με τον χρόνο στους 37°C, προέκυψαν οι συντελεστές συσχέτισης αντίστοιχα ίσοι με  $R^2=0,8613$  και  $R^2=0,9058$ . Αντίστοιχα, στους 15°C οι προκύπτοντες συντελεστές συσχέτισης ήταν  $R^2=0,8270$  και  $R^2=0,8585$ . Και στις δύο θερμοκρασίες καλύτερη προσαρμογή επιτυγχάνεται μέσω της κινητικής 1<sup>ης</sup> τάξης και οι σταθερές του ρυθμού υποβάθμισης του ροσμαρινικού οξέος δίνονται στον πίνακα 41, που βρίσκεται στο τέλος της υποκεφαλαίου.



Διάγραμμα 32. Συγκέντρωση φλαβονοειδών στους 37 και τους 15°C σε διάστημα 21 ημερών

Για την μελέτη των φλαβονοειδών, εφαρμόζοντας κινητική μηδενικής και πρώτης τάξης στα πειραματικά σημεία στους 37°C προέκυψαν οι συντελεστές συσχέτισης αντίστοιχα  $R^2=0,8928$  και  $R^2=0,9021$ . Οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης στη θερμοκρασία των 15°C ήταν  $R^2=0,8567$  και  $R^2=0,8645$ . Και στις δύο θερμοκρασίες καλύτερη προσαρμογή επιτυγχάνεται, με μικρή διαφορά, μέσω της κινητικής 1<sup>ης</sup> τάξης και οι σταθερές του ρυθμού υποβάθμισης των φλαβονοειδών δίνονται στον πίνακα 41 που βρίσκεται, στο τέλος της υποκεφαλαίου.

Στον πίνακα 41 καταγράφονται οι ρυθμοί που υποβαθμίζονται τα βιοδραστικά συστατικά μέσα στα γαλακτώματα, ανάλογα τη θερμοκρασία αποθήκευσης, καθώς και η κινητική τάξη που φαίνεται να ακολουθούν με βάση τα πειραματικά δεδομένα στο χρονικό διάστημα της μελέτης.

Πίνακας 41. Ρυθμός υποβάθμισης συστατικών με βάση την θερμοκρασία αποθήκευσης

Βιοδραστικά συστατικά	Τάξη κινητικής αντίδρασης (-)	Ρυθμός αντίδρασης k (days <sup>-1</sup> )	
		T=37°C	T=15°C
<b>Ολικά φαινολικά διτερπένια</b>	0 <sup>η</sup>	60,774	36,768
<b>Καρνοσικό οξύ</b>	0 <sup>η</sup>	114,860	46,253
<b>Ροσμαρινικό οξύ</b>	1 <sup>η</sup>	0,020	0,016
<b>Φλαβονοειδή</b>	1 <sup>η</sup>	0,017	0,013

Ο ρυθμός υποβάθμισης όλων των συστατικών είναι μεγαλύτερος στην υψηλότερη θερμοκρασία, όπως και είναι αναμενόμενο. Επιπλέον, αναφέρεται ότι τα ολικά φαινολικά διτερπένια καθώς και το καρνοσικό οξύ μεμονωμένα, φαίνεται να έχουν γραμμική υποβάθμιση στο διάστημα που εξετάστηκαν τα γαλακτώματα, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι διατηρούν αυτόν τον τρόπο υποβάθμισης στην συνέχεια.

## Καλλυντικές κρέμες

### Ποιοτικός χαρακτηρισμός κρεμών

Όπως προαναφέρθηκε, παρασκευάστηκε μία κρέμα χωρίς βιοδραστικά συστατικά (κρέμα Blank), μία κρέμα εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια (κρέμα 1), μία με ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή (κρέμα 3) και τέλος μία με το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου (κρέμα 2). Αρχικά, ως προς την ομοιογένεια όλες οι κρέμες είναι ικανοποιητικές. Στις κρέμες 2 και 3 έχει γίνει ομοιόμορφη κατανομή του υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την εμφάνιση τους αλλά και με την εξέταση της υφής τους. Οι κρέμες σε υφή θυμίζουν ενυδατικές κρέμες χεριών. Πιο συγκεκριμένα, οι κρέμες 2 και 3 είναι πιο λεπτόρρευστες λόγω της προσθήκης του υδατικού εκχυλίσματος, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υφή στο δέρμα. Οι κρέμα blank καθώς και η κρέμα 1 είναι πιο παχύρρευστες. Επιπλέον, αναφέρεται ότι όλες οι κρέμες διαθέτουν καλές μαλακτικές ιδιότητες. Ως προς την λιπαρότητα, περισσότερο λιπαρή χαρακτηρίστηκε η κρέμα blank και λιγότερο η κρέμα 3. Τέλος ως προς την ευκολία απομάκρυνσης της κρέμας

από το δέρμα, που είναι μια σημαντική παράμετρος για τους καταναλωτές, κρίθηκε ευκολότερη η απομάκρυνση για τις κρέμες 2 και 3 και δυσκολότερη για τις κρέμες blank και 1, επιβεβαιώνοντας την θετική επίδραση της προσθήκης υδατικού εκχυλίσματος στις συνθέσεις. Τα παραπάνω φαίνονται στον πίνακα 42.

Πίνακας 42. Ποιοτικά χαρακτηριστικά κρεμών (κρέμα Blank: χωρίς βιοδραστικά συστατικά, κρέμα 1: εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια, κρέμα 3: εμπλουτισμένη με ροσμαρινικό οξύ και φλαβονοειδή και κρέμα 2: εμπλουτισμένη με το σύνολο των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου

Κρέμα	Χρώμα	Αίσθηση- Υφή	Εμφάνιση	Ευκολία απομάκρυνσης <sup>a</sup>
Blank	Λευκή White	Αρκετά Λιπαρή & Παχύρευστη	Ικανοποιητική Ομοιογένεια	I
1	Λευκό-κρεμ (Yellowish White)	Αρκετά Λιπαρή & Παχύρευστη	Ικανοποιητική Ομοιογένεια	II
2	Σκούρο Κρεμ (Dark Cream)	Λεπτόρρευστη	Ικανοποιητική Ομοιογένεια & Γυαλιστερή υφή	III
3	Ανοιχτό Κρέμ (Light Cream)	Λεπτόρρευστη	Ικανοποιητική Ομοιογένεια & Γυαλιστερή υφή	IV

a: Οι δείκτες I-IV δείχνουν αύξουσα ευκολία απομάκρυνσης



Κρέμα Blank

Κρέμα 1

Κρέμα 2

Κρέμα 3



Εικόνα 63. Κρέμα : blank, 1,2 και 3 (από αριστερά προς τα δεξιά)

## pH κρεμών

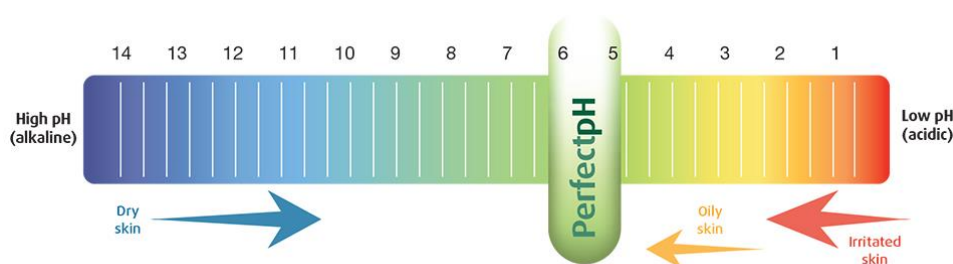
Στον πίνακα 43 καταγράφονται οι τιμές pH των κρεμών την ημέρα παρασκευής τους.

Πίνακας 43. Τιμή pH κάθε είδους κρέμας

Είδος κρέμας <sup>a</sup>	pH
blank	7,43±0,09
1	7,00±0,01
2	6,58±0,10
3	6,79±0,03

a: ο εμπλουτισμός κάθε κρέμας είναι όπως αναφέρεται στον Πίνακα 42

Το pH του ανθρώπινου δέρματος κυμαίνεται κανονικά από 4,5 έως 6,0. Ως εκ τούτου, προκειμένου μια καλλυντική φόρμουλα να μπορέσει να έχει βιομηχανική εφαρμογή, θα πρέπει να έχει ένα pH που βρίσκεται κοντά σε αυτό το εύρος [Matousek et al., 2003]. Οι κρέμες που παρασκευάστηκαν είχαν ελαφρώς υψηλότερες τιμές pH από το δέρμα, χωρίς όμως να υπερβαίνουν την τιμή του ουδέτερου pH, εξαιρώντας την κρέμα blank που άλλωστε παρασκευάστηκε ως τυφλό δείγμα. Σχετικά με τις άλλες κρέμες, οι τιμές είναι αποδεκτές όσον αφορά την μη ερεθιστικότητα για το δέρμα και βρίσκονται εντός του εύρους του επιτρεπόμενου pH για τα καλλυντικά γενικότερα (pH=5-8) [Reveny et al., 2016]. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι δεν έγινε προσθήκη κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος για την τροποποίηση του pH και ότι οι κρέμες προσώπου ρυθμίζονται έτσι ώστε να βρίσκονται σε εύρος pH μεταξύ των τιμών 6,5 με 7 [Αυγουστάκης, 2003]. Τέλος, σύμφωνα με μελέτη των Smaoui et al. (2017) το pH των κρεμών υφίσταται μείωση με τον χρόνο, κάτι το οποίο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την παρασκευή.



Εικόνα 64. Κλίμακα pH όσον αφορά τον τύπο του κάθε δέρματος

Η κρέμα που δεν διαθέτει ελαιώδη φάση εμπλουτισμένη σε φαινολικά διτερπένια, ούτε υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου σε διασπορά (κρέμα blank), παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή pH. Η κρέμα που διαθέτει μόνο την ελαιώδη φάση εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια (κρέμα 1), παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερο pH. Με την προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος σε διασπορά παρασκευάζεται η κρέμα 3, η οποία διαθέτει ακόμη χαμηλότερο pH και από την κρέμα 1. Τέλος, η κρέμα 2 η οποία διαθέτει και ελαιώδη φάση εμπλουτισμένη με φαινολικά διτερπένια αλλά και υδατικό εκχύλισμα σε διασπορά, παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή pH, η οποία και είναι πιο κοντά στα όρια των προδιαγραφών της βιομηχανίας. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε σε μελέτη των Varka et al. (2012) η

οποία αφορούσε κρέμες. Συγκεκριμένα με την προσθήκη υδατικών εκχυλισμάτων ή/και ελαίων από βότανα όπως το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) και η καλέντουλα (*Calendula Officinalis*), μειώθηκε το pH, κάτι το οποίο οφείλεται στα δραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων των βοτάνων.

#### Χρωματογραφική ανάλυση

Με βάση μελέτη ασφαλείας των Fiume et al. (2014) αναφορικά με τη χρήση του *Rosmarinus Officinalis* σε καλλυντικά σκευάσματα, η μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση εκχυλίσματος φύλλων δεντρολίβανου στα καλλυντικά είναι 3%, στην περίπτωση αυτών που παραμένουν στο δέρμα. Οι κρέμες παρασκευάστηκαν με στόχο να έχουν περιεκτικότητα σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, τα οποία αποτελούν και πιστοποιημένα αντιοξειδωτικά, ίση με 0,05% και περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ της τάξης του 0,1%, καθώς οι περισσότερες από τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις χρήσης για τα συστατικά του *Rosmarinus officinalis* είναι κάτω του 0,1%. Με άλλα λόγια, οι κρέμες παρασκευάστηκαν έτσι ώστε να περιέχουν 50 mg καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης/100 g κρέμας ή/και 100 mg ροσμαρινικού οξέος/100 g κρέμας. Έτσι, αρχικά οι παρασκευασθείσες καλλυντικές συνθέσεις αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με σκοπό να προσδιοριστούν και να επιβεβαιωθούν οι συγκεντρώσεις τους στα ζητούμενα συστατικά. Τα αποτελέσματα όλων των βιοδραστικών συστατικών είναι δοσμένα σε mg/100 g κρέμας.

Ο λόγος που έγινε αυτή η προκαταρκτική ανάλυση είναι, γιατί κατά την παρασκευή των συνθέσεων ήταν πιθανή η υποβάθμιση των βιοδραστικών συστατικών. Συγκεκριμένα, η ελαιώδης φάση μαζί με τους γαλακτωματοποιητές θερμάνθηκε έως τη θερμοκρασία των 70°C με σκοπό την τήξη αυτών. Έτσι, η υψηλή θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση του αρχικού ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων που περιέχεται στις κρέμες 1 και 2. Επιπλέον, το υδατικό εκχύλισμα που περιέχεται στις κρέμες 2 και 3 συμπυκνώθηκε μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα και πάλι η υψηλή θερμοκρασία επιδρά αρνητικά στην συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών σε αυτό. Ακόμη, κατά την παρασκευή οι κρέμες υπέστησαν έντονη ανάδευση η οποία αποτελεί παράγοντα υποβάθμισης, λόγω έντονου αερισμού. Τέλος, δεν μπορεί να παραληφθεί η επίδραση της ομογενοποίησης σε υπερήχους, η οποία έγινε συνολικά για 4 min. Κατά την διάρκεια αυτής, είναι πιθανή η υποβάθμιση των συστατικών λόγω πιθανού αερισμού και θέρμανσης.

Πίνακας 44. Ανάλυση κρέμας 1 μετά την παρασκευή

Βιοδραστικά συστατικά	mg/100 g κρέμας 1
Καρνοσικό οξύ	40,21±0,63
Καρνοσόλη	9,15±0,19
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	6,58±0,57

Πίνακας 45. Ανάλυση κρέμας 2 μετά την παρασκευή

Βιοδραστικά συστατικά	mg/100 g κρέμας 2
Καρνοσικό οξύ	40,51±1,28
Καρνοσόλη	8,54±0,02
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	7,02±0,00
Ροσμαρινικό οξύ	112,24±0,01
Φλαβονοειδή	132,78±0,01

Πίνακας 46. Ανάλυση κρέμας 3 μετά την παρασκευή

Βιοδραστικά συστατικά	mg/100 g κρέμας 3
Ροσμαρινικό οξύ	88,03±0,02
Φλαβονοειδή	104,92±0,02

Στον πίνακα 47 παρουσιάζεται η απόδοση/ανάκτηση στα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο κάθε είδος κρέμας με βάση την θεωρητική ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε σύνθεση. Στην κρέμα 2, η απόδοση αφορά στο ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή που βρίσκονται αθροιστικά και στο ελαιοδιάλυμα και στο υδατικό εκχύλισμα, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της.

Πίνακας 47. Απόδοση σε φαινολικά συστατικά για κάθε τύπο κρέμας

Ανάκτηση σε	Κρέμα 1	Κρέμα 2	Κρέμα 3
Ολικά Φαινολικά διτερπένια	98,26±2,43%	98,51±2,29%	-
Ροσμαρινικό οξύ	-	93,59±0,01%	88,09±0,02%
Φλαβονοειδή	-	65,97±0,00%	59,44±0,01%

Με βάση τις προκύπτουσες αποδόσεις, φαίνεται ότι η συνύπαρξη του υδατικού εκχυλίσματος με το ελαιοδιάλυμα των φαινολικών διτερπενίων, λειτουργεί θετικά στη διατήρηση αμφότερων των φαινολικών συστατικών μέσα στους συγκεκριμένους φορείς, κατά την παρασκευή. Στην περίπτωση της κρέμας 2, έχει προσμετρηθεί και το ροσμαρινικό οξύ που προσφέρθηκε από το ελαιοδιάλυμα και για τον λόγο αυτό είναι υψηλότερη η περιεκτικότητα του στην κρέμα αυτή σε σχέση με την κρέμα 3. Επιπρόσθετα, σχετικά με τα φλαβονοειδή που περιέχονται στις κρέμες 2 και 3, η απόδοση εμφανίζεται χαμηλή λόγω της συμπύκνωσης που έχει υποστεί το υδατικό εκχύλισμα σε περιστροφικό εξατμιστήρα, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση αυτών των ενώσεων, λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας.

#### Ανάλυση Folin-Ciocalteu

Αρχικά να αναφερθεί ότι στις καλλυντικές συνθέσεις υπάρχουν εκτός του ελαιοδιαλύματος και του υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου και άλλα συστατικά, όπως για παράδειγμα η αλόη, που δίνουν απόκριση στην ανάλυση Folin-Ciocalteu. Για τον λόγο αυτό, αφαιρέθηκε η απόκριση της Blank κρέμας, δηλαδή της κρέμας που δεν περιέχει βιοδραστικά συστατικά από δεντρολίβανο, από όλες τις κρέμες ώστε να προσδιοριστούν οι ολικές φαινόλες που οφείλονται στην προσθήκη των εκχυλισμάτων του φυτού και μόνο. Στον πίνακα 48 καταγράφονται οι συγκεντρώσεις σε ολικές φαινόλες, όπως προέκυψαν από την ανάλυση, αλλά και οι συγκεντρώσεις σε ολικές φαινόλες λόγω του ελαιοδιαλύματος ή/και του υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου αντίστοιχα για την κάθε κρέμα.



Πίνακας 48. Απόκριση Folin-Ciocalteu και ποσοτικοποίηση πραγματικής συγκέντρωσης ολικών φαινολών από εκχυλίσματα δεντρολίβανου για τις κρέμες (t=0)

Κρέμα <sup>a</sup>	C (g GAE/kg κρέμας)	TPC από εκχυλίσματα δεντρολίβανου (g GAE/kg κρέμας)
Blank	4,57±0,00	-
1	5,34±0,09	0,76±0,09
2	7,17±0,14	2,60±0,14
3	5,92±0,15	1,35±0,15

a: ο εμπλουτισμός κάθε κρέμας είναι όπως αναφέρεται στον Πίνακα 42

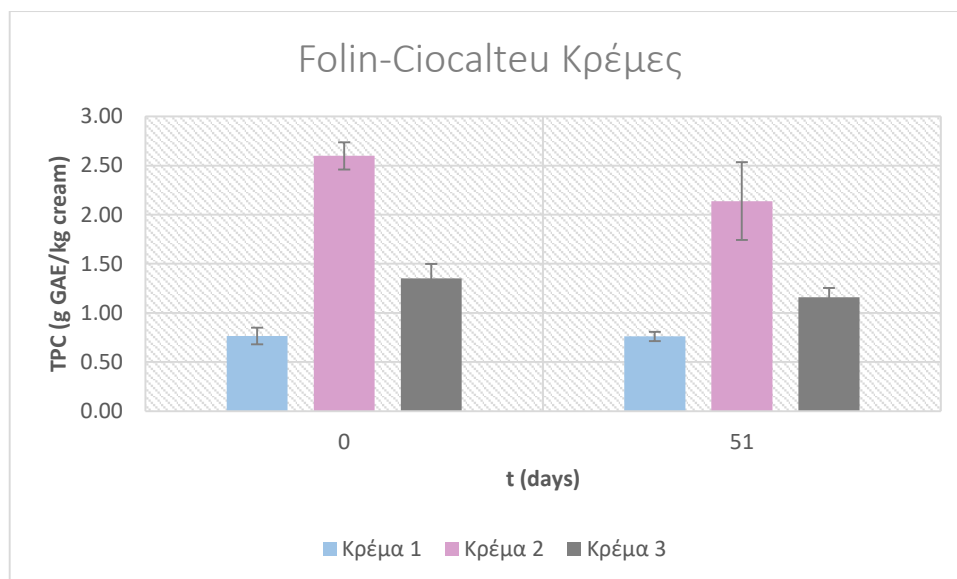
Όπως ήταν αναμενόμενο από τη σύσταση, προκύπτει ότι η κρέμα 2 έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες. Αυτό γιατί αποτελεί ουσιαστικά συνδυασμό της κρέμας 1 και της κρέμας 3, αφού περιέχει και υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου αλλά και ελαιοδιάλυμα πλούσιο σε φαινολικά διτερπένια.

Η ανάλυση επαναλήφθηκε μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης των κρεμών σε κλίβανο των 15°C και οι συγκεντρώσεις σε ολικές φαινόλες από το δεντρολίβανο, όπως προέκυψαν, φαίνονται στον πίνακα 49 στην τελευταία στήλη. Στον πίνακα αυτό δίνονται και οι αρχικές συγκεντρώσεις για λόγους σύγκρισης.

Πίνακας 49. Ποσοτικοποίηση ολικών φαινολών από εκχυλίσματα δεντρολίβανου μέσω Folin-Ciocalteu (t=0 και t=51days)

Κρέμα <sup>a</sup>	TPC από εκχυλίσματα δεντρολίβανου (g GAE/kg κρέμας) (t=0)	TPC από εκχυλίσματα δεντρολίβανου (g GAE/kg κρέμας) (t=51 days)
1	0,76±0,09	0,76±0,05
2	2,60±0,14	2,14±0,40
3	1,35±0,15	1,16±0,10

a: ο εμπλουτισμός κάθε κρέμας είναι όπως αναφέρεται στον Πίνακα 42



Διάγραμμα 33. Διατηρησιμότητα φαινολικών συστατικών σε διάστημα 51 ημερών

Από το διάγραμμα 33 φαίνεται ότι η συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες δεν μειώθηκε σχεδόν καθόλου στην κρέμα 1. Η διατηρησιμότητα αυτή πιθανότατα οφείλεται στην ενσωμάτωση των φαινολικών διτερπενίων εντός του ελαίου MCT, το οποίο λειτουργεί προστατευτικά. Όσον αφορά τις άλλες δύο καλλυντικές συνθέσεις υπάρχει μείωση, η οποία οφείλεται στην υποβάθμιση των συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος που προστέθηκε σε διασπορά σε αυτές.

#### Ανάλυση DPPH

Στον πίνακα 50 καταγράφονται τα αποτελέσματα που έδωσε η δοκιμή DPPH αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση της κάθε κρέμας την ημέρα παρασκευής αλλά και μετά από διάστημα 51 ημερών.

Πίνακας 50. Αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox (g trolox/kg κρέμας) για κάθε τύπο κρέμας (t=0 και 51 days)

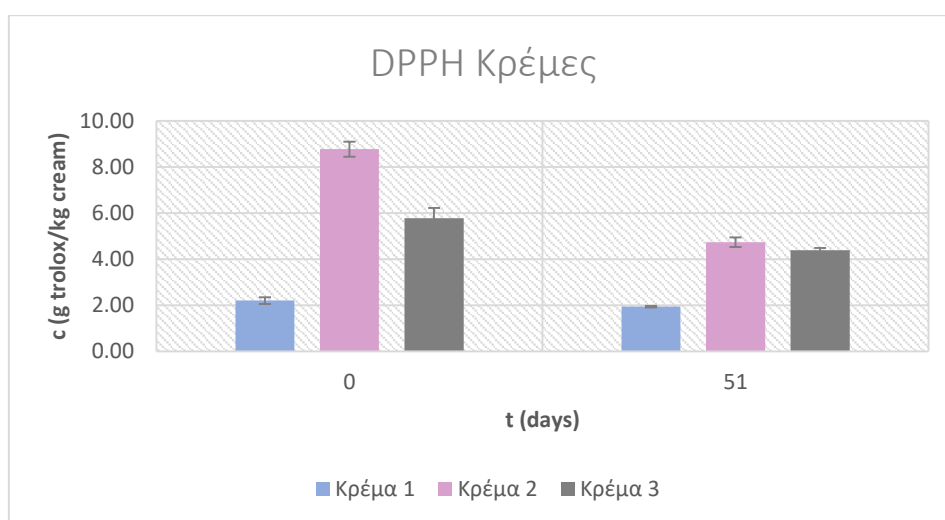
Κρέμα <sup>a</sup>	C (g trolox/kg κρέμας) (t=0)	C (g trolox/kg κρέμας) (t=51 days)
Blank	0	0
1	2,20±0,14	1,93 ±0,03
2	8,77±0,32	4,73±0,21
3	5,77±0,45	4,39 ±0,10

a: ο εμπλουτισμός κάθε κρέμας είναι όπως αναφέρεται στον Πίνακα 42

Αρχικά, η ανάλυση DPPH έδειξε ότι η κρέμα blank δεν έχει αντιοξειδωτική δράση. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση παρατηρείται στην κρέμα 2, δηλαδή στην κρέμα που είναι εμπλουτισμένη και στην ελαιώδη φάση της με βιοδραστικά συστατικά του δεντρολίβανου αλλά και στην υδατική φάση της. Η συμπεριφορά αυτή είναι αναμενόμενη, καθώς και το

γεγονός ότι ακολουθεί σε αντιοξειδωτική δραστικότητα η κρέμα 3 και τελευταία είναι η κρέμα 1. Αυτό αιτιολογείται από τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων δεντρολίβανου έναντι των ακετονικών εκχυλισμάτων.

Η ανάλυση DPPH επαναλήφθηκε μετά από 51 ημέρες αποθήκευσης των κρεμών σε κλίβανο των 15°C και η αντιοξειδωτική ικανότητα της κάθε κρέμας σε ισοδύναμα trolox καταγράφεται στον πίνακα 49 στην τελευταία στήλη, όπως προαναφέρθηκε. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, η αντιοξειδωτική δράση μειώθηκε αισθητά, ιδιαίτερα στις κρέμες 2 και 3, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 26. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου είχε ενσωματωθεί ως έχειν σε διασπορά, με αποτέλεσμα να υποβαθμιστούν τα βιοδραστικά συστατικά αυτού. Αντίθετα, η κρέμα 1 δεν έχει υποστεί ιδιαίτερη μείωση όσον αφορά την αντιοξειδωτική της δράση. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι τα βιοδραστικά συστατικά σε αυτή την σύνθεση είχαν ενσωματωθεί μέσα σε έλαιο (MCT), το οποίο πιθανότατα λειτούργησε θετικά στην διατήρησή τους.



Διάγραμμα 34. Έλεγχος διατηρησιμότητας αντιοξειδωτικής δράσης σε διάστημα 51 ημερών

## Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα

Αρχικός στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η ταυτοποίηση και η σύγκριση διαφόρων τύπων εκχυλισμάτων φύλλων δεντρολίβανου για την μετέπειτα επεξεργασία τους και χρήση σε καλλυντικές φόρμουλες. Σε πρώτο στάδιο, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, της εκχύλισης σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου και της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους, και η χρήση διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης (ακετόνη 100%, νερό 100%, ακετόνη:νερό (80:20) και αιθανόλη:νερό (60:40)). Από την δοκιμή DPPH προέκυψε ότι το εκχύλισμα που εμφάνισε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ήταν αυτό της ακετόνης:νερού σε αναλογία 80:20 σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου ( $127,3 \pm 4,5$  g trolox /kg ξηρού φυτού). Συμπεραίνεται ότι η υψηλότερη θερμοκρασία που αναπτύσσεται με την μέθοδο των υπερήχων, επιδρά αρνητικά όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, ενώ προκύπτουν βέλτιστα αποτελέσματα στην εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου, η οποία διεξάγεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αντίστοιχα, με βάση την δοκιμή Folin-Ciocalteu, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες προέκυψε ότι έχει το εκχύλισμα ακετόνης:νερού (80:20), που έχει παραχθεί με εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους ( $64,5 \pm 6,0$  g GAE/kg ξηρού φυτού), ακολουθούμενο με μικρή διαφορά από το αντίστοιχο εκχύλισμα αιθανόλης:νερού (60:40) με την ίδια μέθοδο. Από την ανάλυση HPLC ταυτοποιήθηκαν τα κυριότερα συστατικά των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου, που ήταν το ροσμαρινικό οξύ, η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ αλλά και δευτερεύοντα συστατικά και συγκεκριμένα με σειρά έκλουσης τα πολικά φλαβονοειδή: νεπιτρίνη, ομοπλανταγενίνη και ισοσκοουτελαρεΐνη καθώς και τα πιο άπολα φλαβονοειδή: σιρσιμαριτίνη, λαδανειΐνη, γενκβανίνη, σαλβιγενίνη και 4'-μεθόξυτεκτοχρυσίνη. Εκτός από το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη, ταυτοποιήθηκε και ένα ακόμη φαινολικό διτερπένιο, ο καρνοσικός μεθυλεστέρας, που εκλύεται μετά το καρνοσικό οξύ. Σχετικά με την ποσοτικοποίηση των συστατικών προέκυψε υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά διτερπένια στα εκχύλισματα ακετόνης:νερού (80:20) σε σταθερή κλίνη ( $C_{TPD} = 18,2 \pm 0,3$  g TPD/kg ξηρού φυτού). Τα φαινολικά διτερπένια είναι ενώσεις που οξειδώνονται εύκολα, οπότε η αύξηση της θερμοκρασίας στους υπερήχους ήταν καθοριστικός παράγοντας για την υποβάθμιση αυτών των ενώσεων, σε σχέση με τα εκχύλισματα που παράχθηκαν στην κλίνη ημιδιαλείποντος έργου. Το ροσμαρινικό οξύ βρέθηκε σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα ίδια εκχύλισματα ( $21,3 \pm 1,2$  g RA/kg ξηρού φυτού), ενώ η περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή ήταν μεγαλύτερη στα εκχύλισματα ίδιας αναλογίας διαλυτών, που προέκυψαν όμως με υποβοήθηση από τους υπερήχους ( $47,4 \pm 4,7$  g φλαβονοειδών/kg ξηρού φυτού). Από το σύνολο των φαινολικών συστατικών του δεντρολίβανου σε υψηλότερη συγκέντρωση στα εκχύλισματα βρίσκονται τα ολικά φλαβονοειδή. Έτσι, αιτιολογείται το γεγονός ότι μέσω της ανάλυσης Folin-Ciocalteu προέκυψε υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα εκχύλισματα ακετόνης:νερού (80:20) στους υπερήχους. Πιο αναλυτικά, για τα φλαβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, προέκυψε ότι τα πιο πολικά εξ αυτών (νεπιτρίνη, ομοπλανταγενίνη και ισοσκοουτελαρεΐνη) βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα εκχύλισματα ακετόνης:νερού που προέκυψαν με υποβοήθηση από υπερήχους. Συγκεκριμένα, οι τιμές αυτών στο ξηρό φυτό υπολογίστηκαν  $13,7 \pm 1,8$  g νεπιτρίνης/kg,  $5,1 \pm 0,1$  g ομοπλανταγενίνης/kg και  $8,4 \pm 1,0$  g ισοσκοουτελαρεΐνης/kg. Αντίθετα τα υπόλοιπα πέντε ταυτοποιημένα φλαβονοειδή εκχυλίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις όταν η εκχύλιση λαμβάνει χώρα σε περιβαλλοντικές συνθήκες σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου. Οι προκύπτουσες συγκεντρώσεις στο ξηρό φυτό ήταν για την

σιρσιμαριτίνη  $1,1\pm 0,0$  g/kg, για την λαδανειΐνη  $1,4\pm 0,1$  g/kg, για την γενκβανίνη  $0,6\pm 0,0$  g/kg, για την σαλβιγενίνη  $3,4\pm 0,1$  g/kg και για την 4'-Μεθοξυτεκτοχρυσίνη  $0,8\pm 0,0$  g/kg. Αναφέρεται ότι η πιο άπολη εξ αυτών των ενώσεων, δηλαδή η 4'-Μεθοξυτεκτοχρυσίνη, δεν εκχυλίστηκε καθόλου με καθαρό νερό.

Σε δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η επεξεργασία των εκχυλισμάτων με ξήρανση με ψεκασμό (spray drying). Η διαδικασία αυτή σκοπό είχε την διατήρηση και τη σταθερότητα των φαινολικών συστατικών, τα οποία είναι ευαίσθητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αναφέρεται ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, παρουσία οξυγόνου το καρνοσικό οξύ αποικοδομείται σε μερικές ημέρες σε καρνοσόλη και ροσμανόλες, οι οποίες είναι λιγότερο δραστικές ενώσεις. Η διεργασία του μικροεγκλεισμού μέσω ξήρανσης με ψεκασμό, αποτελεί λοιπόν ένα πολύτιμο εργαλείο επίλυσης των προβλημάτων αυτών, παρέχοντας τη δυνατότητα προστασίας και ελεγχόμενης απελευθέρωσης των εγκλεισμένων συστατικών. Οι καλλυντικές συνθέσεις χαρακτηρίζονται από ελεγχόμενη απελευθέρωση των συστατικών τους και επιπλέον οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιεί η βιομηχανία προτιμάται να είναι σε ξηρή μορφή. Για τον λόγο αυτό, ο μικροεγκλεισμός των βιοδραστικών συστατικών του δεντρολίβανου μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό, αποτελεί μια καλή προσέγγιση ώστε οι παραγόμενες κόνεις να αποτελέσουν πρώτη ύλη σε καλλυντικά. Σε αυτές τις σειρές πειραμάτων, σκοπός ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής του μίγματος τροφοδοσίας και λειτουργίας του ξηραντήρα με ψεκασμό για τις οποίες επιτυγχάνεται μέγιστη απόδοση (MEY) και αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού (MEE) των προς εγκλεισμό συστατικών.

Σε όλα τα πειράματα τα μίγματα τροφοδοσίας είχαν περιεκτικότητα σε ολικά στερεά ίση με 30%. Στα ολικά στερεά συγκαταλέγονται οι φορείς εγκλεισμού που ήταν η μαλτοδεξτρίνη (MD), το αραβικό κόμμα (GA) και τα στερεά συστατικά των εκχυλισμάτων προς εγκλεισμό. Αρχικά, έγιναν κάποια δοκιμαστικά πειράματα με υδατικό εκχύλισμα μεγαλύτερης κλίμακας, όπου προέκυψε ότι η προσθήκη GA ως φορέα εγκλεισμού εκτός της MD σε αναλογία 1:2 αντίστοιχα δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα εγκλεισμού για τα φλαβονοειδή και το ροσμαρινικό οξύ ( $MEY_{RA}=100,00\pm 2,94\%$  και  $MEY_{Flavonoids}=95,06\pm 4,58\%$ ). Φαίνεται λοιπόν ότι το εγκλειστικό μέσο επιδράει σημαντικά στον μικροεγκλεισμό των φαινολικών συστατικών. Για τα υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας, βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν όταν το εγκλειστικό μέσο ήταν MD:GA σε αναλογία 4:1, η θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης  $160^{\circ}\text{C}$  και η περιεκτικότητα σε στερεά συστατικά εκχυλίσματος δενδρολίβανου 10%. Συγκεκριμένα, το ροσμαρινικό οξύ είχε  $MEY_{RA}=100,00\pm 4,40\%$  και τα φλαβονοειδή αντίστοιχα  $MEY_{Flavonoids}=96,90\pm 0,01\%$  ενώ οι τιμές που αφορούσαν την MEE υπολογίστηκαν ίσες με  $97,93\pm 0,13\%$  και  $97,41\pm 0,22\%$ . Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού του ροσμαρινικού οξέος και των φλαβονοειδών αυτή σε όλα τα πειράματα ήταν ιδιαίτερα υψηλή ( $MEE_{RA}\% \geq 92,40\pm 0,04\%$  και  $MEE_{Flavonoids}\% \geq 90,36\pm 0,04\%$ ), πράγμα που σημαίνει ότι η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για υδατικά εκχυλίσματα. Αντίθετα, καθώς τα μίγματα τροφοδοσίας δεν δύναται να περιέχουν οργανικούς διαλύτες, τα εκχυλίσματα που προέρχονται από μίγματα οργανικού διαλύτη:νερού, που θεωρήθηκαν και τα καλύτερα εκχυλίσματα στο προηγούμενο στάδιο των αναλύσεων, απαιτούν προ-επεξεργασία για την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη, ώστε να ενθυλακωθούν τα συστατικά τους. Οι αποδόσεις στα πειράματα αυτά ήταν σαφώς χαμηλότερες, καθώς στα προς εγκλεισμό συστατικά υπήρχαν και ευοξειδωτα (φαινολικά διτερπένια). Σε αυτές τις σειρές πειραμάτων, βέλτιστη αναλογία φορέων εγκλεισμού θεωρήθηκε η MD:GA (4:1) και μάλιστα η απόδοση

και η αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού του συνόλου των βιοδραστικών συστατικών ήταν υψηλότερη, όταν τα αρχικά εκχυλίσματα προερχόταν από μίγμα αιθανόλης:νερού. Συγκεκριμένα οι MEY για το ροσμαρινικό οξύ, τα φλαβονοειδή και τα ολικά φαινολικά διτερπένια αντίστοιχα υπολογίστηκαν  $99,09\pm 1,19\%$ ,  $95,48\pm 8,03\%$  και  $84,79\pm 1,32\%$ . Οι αντίστοιχες τιμές για την MEE υπολογίστηκαν  $97,20\pm 0,71\%$ ,  $91,52\pm 0,86\%$  και  $52,59\pm 0,95\%$ . Επιπλέον και για τα ακετονικά εκχυλίσματα, που είναι πλούσια σε φαινολικά διτερπένια, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη και κατ' επέκταση η ενσωμάτωση των συστατικών σε κάποιο άλλο φορέα συμβατό με την μέθοδο. Εν προκειμένω, ενσωματώθηκαν σε λιπαρό φορέα (MCT) και στη συνέχεια το ελαιοδιάλυμα ενσωματώθηκε στο μίγμα τροφοδοσίας. Στα πειράματα αυτά η παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η περιεκτικότητα σε πυρήνα (%core) με σταθερή θερμοκρασία εισόδου αέρα ξήρανσης ίση με  $140^{\circ}\text{C}$  και αναλογία φορέων MD:GA (2:1). Σε περιπτώσεις που τα προς εγκλεισμό συστατικά είναι λιπόφιλα, όπως στην προκειμένη που ήταν ένα ελαιοδιάλυμα πλούσιο σε φαινολικά διτερπένια ( $2,5\%$  w/w σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη), η περιεκτικότητα σε GA πρέπει να αυξάνεται, λόγω της χαμηλής ικανότητας γαλακτωματοποίησης της MD, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κακή συγκράτηση των συστατικών. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πυρήνα (5% core) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και συγκεκριμένα η MEY<sub>TPD</sub> υπολογίστηκε ίση με  $89,70\pm 1,00\%$  και η MEE<sub>TPD</sub>= $76,35\pm 0,76\%$ . Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ενσωμάτωση σε έλαιο λειτούργησε θετικά όσον αφορά την αποτελεσματικότητα εγκλεισμού των φαινολικών διτερπενίων, η οποία ήταν πολύ υψηλότερη στα πειράματα αυτά σε σχέση με τα πειράματα που το εκχύλισμα ενσωματώθηκε ως έχειν στο μίγμα τροφοδοσίας. Έτσι μια πρόταση για να επιτευχθεί καλύτερος εγκλεισμός στην περίπτωση εκχυλισμάτων από μίγματα οργανικού διαλύτη:νερού είναι η προσθήκη, πριν την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, ενός λιπαρού φορέα, με σκοπό την συγκράτηση των μη υδατοδιαλυτών στερεών του εκχυλίσματος εντός αυτού. Πιθανότατα στην περίπτωση αυτή να απαιτούνται επιπλέον χειρισμοί για την καλύτερη ομογενοποίηση του γαλακτώματος τροφοδοσίας, εκτός της ομογενοποίησης με ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, όπως για παράδειγμα η χρήση υπερήχων probe.

Επιπρόσθετα έγινε έλεγχος διατηρησιμότητας των εγκλεισμένων συστατικών των κόνεων σε διάστημα περίπου ενός ή έξι μηνών. Σχετικά με τις κόνεις που είχαν εγκλεισμένα συστατικά από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας, αυτές σε διάστημα 28 ημερών δεν είχαν υποστεί σημαντική υποβάθμιση. Παρόλα αυτά, μεγαλύτερος ρυθμός μείωσης του ροσμαρινικού οξέος παρατηρήθηκε στις κόνεις με εγκλειστικό μέσο MD:GA (2:1). Έτσι μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι η αύξηση της αναλογίας του φορέα σε GA έχει αντίθετη επίδραση στην διατηρησιμότητα των φαινολικών συστατικών, καθώς δρα ως ημιπερατή μεμβράνη, μειώνοντας έτσι την διάρκεια ζωής του εγκλεισμένου προϊόντος. Τα φλαβονοειδή υφίστανται ταχύτερη υποβάθμιση και πιο συγκεκριμένα μεγαλύτερος ρυθμός μείωσης συναντάται στην περίπτωση των κόνεων που ως εγκλειστικό μέσο έχουν συνδυασμό MD και GA. Παρόλα αυτά, αυτές οι κόνεις συνεχίζουν να διατηρούν τις καλύτερες αποδόσεις μικροεγκλεισμού. Σε διάστημα εξαμήνου, εξετάστηκαν οι κόνεις που έγιναν σε πρώτο στάδιο δοκιμαστικά με το υδατικό εκχύλισμα μεγαλύτερης κλίμακας. Παρατηρήθηκε αυξημένη υγρασία ( $7,52\pm 0,02\%$ ) στις κόνεις παρουσία GA, εκτός των ορίων μικροβιακής σταθερότητας, η οποία επιδρά αρνητικά στην διατήρηση των φαινολικών συστατικών, δίνοντας τα χειρότερα αποτελέσματα. Αντίθετα, οι κόνεις που παρασκευάστηκαν με φορέα εγκλεισμού μόνο την MD, διατήρησαν καλύτερα εγκλεισμένα τα φλαβονοειδή και το ροσμαρινικό οξύ, με καλύτερη διατηρησιμότητα να επιτυγχάνεται για το ροσμαρινικό οξύ στην περίπτωση που η περιεκτικότητα ενεργών συστατικών ήταν 20% επί των ολικών στερεών. Για τα



φλαβονοειδή μικρότερη υποβάθμιση επιτεύχθηκε στην περίπτωση που η περιεκτικότητα ενεργών συστατικών ήταν 10% επί των ολικών στερεών. Τέλος, έλεγχος διατηρησιμότητας των φαινολικών διτερπενίων έγινε στις κόνεις που παρασκευάστηκαν από ακετονικά εκχυλίσματα. Αρχικά, ήταν εμφανής η μετατροπή του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη, λόγω οξειδωσης, καθώς η περιεκτικότητα αυτής στις σκόνες αυξήθηκε και σε κάποιες περιπτώσεις υπερέβηκε την αρχική συγκέντρωση καρνοσόλης στο ελαιοδιάλυμα. Λαμβάνοντας υπόψη τα ολικά φαινολικά διτερπένια, μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης αυτών, επιτεύχθηκε στις κόνεις με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα (10%), αλλά οι κόνεις με την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοδιάλυμα (5%) συνέχισαν να διατηρούν υψηλότερες τιμές απόδοσης και αποτελεσματικότητας μικροεγκλεισμού.

Αναφορικά με την διατηρησιμότητα του συνόλου αυτών των ενώσεων μέσα σε γαλακτώματα (o/w), αποδείχτηκε ότι η χρήση αυτών των συστημάτων γίνεται λιγότερο αποτελεσματική όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης. Συγκεκριμένα προέκυψε ότι το καρνοσικό οξύ αποικοδομείται πλήρως σε διάστημα 15 ημερών στους 37°C, ενώ στους 15°C δεν είχε επέλθει πλήρης αποικοδόμηση σε διάστημα 21 ημερών όπου πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι. Λόγω οξειδωσης, το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη και άλλα λιγότερο δραστικά φαινολικά διτερπένια και γι' αυτό κρίθηκε σκόπιμο η εξέταση της διατηρησιμότητας να γίνει συνολικά προς αυτά. Τα ολικά φαινολικά διτερπένια υποβαθμίζονται στο διάστημα που πραγματοποιείται η μελέτη με γραμμικό ρυθμό στους 37 και 15°C αντίστοιχα. Ο ρυθμός υποβάθμισης στην θερμοκρασία των 37 και των 15°C υπολογίστηκε αντίστοιχα ίσος με  $k_{TPD,37}=60,774 \text{ days}^{-1}$  και  $k_{TPD,15}=36,768 \text{ days}^{-1}$ , υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ρυθμού μείωσης της συγκέντρωσης των φαινολικών διτερπενίων στα γαλακτώματα. Αντίστοιχα, το ροσμαρινικό οξύ, μειώνεται εκθετικά και συγκεκριμένα στους 37°C υποβαθμίζεται ταχύτερα ( $k_{RA,37}=0,020 \text{ days}^{-1}$ ) από ότι στους 15°C ( $k_{RA,15}=0,016 \text{ days}^{-1}$ ). Ανάλογη προσέγγιση ακολουθείται και για τα φλαβονοειδή, όπου αποικοδομούνται με ταχύτερο ρυθμό στους 37°C ( $k_{Flavonoids,37}=0,017 \text{ days}^{-1}$ ) σε σχέση με τους 15°C ( $k_{Flavonoids,15}=0,013 \text{ days}^{-1}$ ). Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι στο διάστημα που γίνεται η μελέτη διατηρησιμότητας των συστατικών στα γαλακτώματα, τα φαινολικά διτερπένια ακολουθούν κινητική μηδενικής τάξης, ενώ το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή κινητική πρώτης τάξης.

Τέλος, όσον αφορά τις καλλυντικές κρέμες (w/o), που παρασκευάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, προέκυψε αρχικά μέσω των αναλύσεων DPPH και Folin-Ciocalteu ότι η κρέμα με εμπλουτισμένη την λιπαρή και την υδατική φάση σε βιοδραστικά συστατικά από τα εκχυλίσματα του δεντρολίβανου (κρέμα 2) διέθετε, όπως είναι και λογικό από την παρασκευή της, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ( $8,77\pm 0,32 \text{ g trolox/kg κρέμας}$ ) και περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες ( $TPC= 2,60\pm 0,14 \text{ g GAE/kg κρέμας}$ ). Από τις μετρήσεις pH το βέλτιστο προέκυψε για την κρέμα 2 ( $pH = 6,58\pm 0,10$ ), συμπεραίνοντας ότι η προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου αλλά και ελαιοδιαλύματος φαινολικών διτερπενίων συμβάλει στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καλλυντικών. Ανάλογα αποτελέσματα έδωσε και η ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, όπου η κρέμα 2 εμφάνισε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά σε σχέση με τα αρχικά εκχυλίσματα με τα οποία παρασκευάστηκαν οι κρέμες. Συγκεκριμένα, η απόδοση σε φαινολικά διτερπένια ήταν  $98,51\pm 2,29\%$ , σε ροσμαρινικό οξύ  $93,59\pm 0,01\%$  και σε ολικά φλαβονοειδή  $65,97\pm 0,00\%$ . Για τον έλεγχο της σταθερότητας των καλλυντικών συνθέσεων επαναλήφθηκαν οι αναλύσεις DPPH και Folin-Ciocalteu μετά από 51 ημέρες από την παρασκευή τους. Στο χρονικό διάστημα αυτό, η αντιοξειδωτική δράση μειώθηκε αισθητά στις κρέμες 2 και 3, το οποίο οφείλεται στο

γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου είχε ενσωματωθεί ως έχειν σε διασπορά. Συγκεκριμένα, στην κρέμα 2 η συγκέντρωση σε ισοδύναμα trolox μειώθηκε από  $8,77 \pm 0,32$  g trolox/kg κρέμας σε  $4,73 \pm 0,21$  g trolox/kg κρέμας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μετατροπή ορισμένων ενεργών συστατικών, όπως το καρνοσικό οξύ, στις οξειδωμένες μορφές τους, οι οποίες έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αντίθετα, η κρέμα 1, η οποία έχει εμπλουτισμένη την λιπαρή της φάση με ελαιοδιάλυμα φαινολικών διτερπενίων, δεν έχει υποστεί ιδιαίτερη μείωση όσον αφορά την αντιοξειδωτική της δράση, αφού από  $2,20 \pm 0,14$  g trolox/kg κρέμας μειώθηκε μόλις στα  $1,93 \pm 0,03$  g trolox/kg κρέμας. Η διατηρησιμότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα βιοδραστικά συστατικά σε αυτή την σύνθεση είχαν ενσωματωθεί μέσα σε έλαιο (MCT), με αποτέλεσμα να προστατεύονται καλύτερα. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, όπου στην κρέμα 1 δεν μειώθηκε σχεδόν καθόλου, καθώς η τιμή αυτού ήταν αρχικά  $TPC_0 = 0,76 \pm 0,09$  g GAE/kg κρέμας και μεταβλήθηκε σε  $TPC_{51days} = 0,76 \pm 0,05$  g GAE/kg κρέμας. Αντίθετα, οι άλλες δύο κρέμες υπέστησαν υποβάθμιση του ολικού φαινολικού περιεχομένου τους, η οποία οφείλεται στην υποβάθμιση των συστατικών του υδατικού εκχυλίσματος που προστέθηκε σε διασπορά σε αυτές. Μια εναλλακτική που κρίνεται σκόπιμο να εξεταστεί στις καλλυντικές συνθέσεις, είναι η ενσωμάτωση υδατικού εκχυλίσματος σε άλλη μορφή πιο σταθερή με τον χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσαν να προστεθούν τα υδατικά εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης, όπως αυτά παρασκευάστηκαν μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying), αφού η διατήρηση των συστατικών με αυτόν τον τρόπο είναι ικανοποιητική καθώς η απελευθέρωση των συστατικών θα είναι πιο ελεγχόμενη.

## Βιβλιογραφικές αναφορές

Akar, Z., Küçük, M. and Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32, 640-647.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. and Mason, T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4), 261–265.

Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J.A., Roca, M.J. and Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120(1–2), 221-229.

Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M. and Sen P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124–130.

Amaral, G.P., de Carvalho, N.R., Barcelos, R.P., Dobrachinski, F., de Lima Portella, R., da Silva, M.H., Lugokenski, T.H., Dias, G.R.M., da Luz, S.C.A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Villetti, M.A., Soares, F.A.A. and Fachineto, R. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 48-55.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen T.M. (1993). Oxidants, AOXs and the generative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 7915–7922.

Anaëlle, T., Serrano Leon, E., Laurent, V., Elena, I., Mendiola, J.A., Stéphane, C., Nelly, K., Stéphane, L.B., Luc, M. and Valérie, S.-P. (2013). Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta*, 104, 44-52.

Anandharamakrishnan, C., Ishwarya, P.S. (2015). Spray drying techniques for food ingredient Encapsulation, John Wiley & Sons, Ltd and the Institute of Food Technologists, 40-43.

Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P. and Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci. OA*, 4(4).

Aramrueang, N., Asavasanti, S. and Khanunthong, A. (2019). Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products. Chapter 10 - Leafy Vegetables, 245-272.

Arijana Bušić, Draženka Komes, Ana Belščak- Cvitanović, Aleksandra Vojvodić Cebin, Igor Špoljarić, Gordan Mršić and Song Miao, (2018), The Potential of Combined Emulsification and Spray Drying Techniques for Encapsulation of Polyphenols from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Leaves, *Food Technol. Biotechnol.* 56 (4) 494-505.

Ávila-Reyes, J.A., Almaraz-Abarca, N., Chaidez-Ayala, A.I., Ramírez-Noya, D., Delgado Alvarado, E.A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Alanís-Bañuelos, R. E. (2018). Foliar phenolic compounds of ten wild species of Verbenacea as antioxidants and specific chemomarkers. *Brazilian J Biol.*, 78(1), 98-107.

Avula, B., Wang, Y. H., Smillie, T. J., Mabusela, W., Vincent, L., Weitz, F. and Khan, I.A. (2009). Quantitative determination of flavonoids by column high-performance liquid chromatography with mass spectrometry and ultraviolet absorption detection in *Artemisia afra* and comparative studies with various species of *Artemisia* plants. *J AOAC International.*, 92(2), 633-644.

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436.
- Azwanida, N.N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*,4(3).
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.-S., Shao, X., Pan, M.-H., and Ho, C.-T. (2010). Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5363–5367.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- BANCUTA, O.R., CHILIAN, A., BANCUTA, I., ION, R.-M., SETNESCU, R., SETNESCU, T. and GHEBOIANU, A. (2016). IMPROVEMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY STATISTICAL INVESTIGATIONS. *Rom. Journ. Phys.*,61(7–8), 1255–1264.
- Barni, M.V., Carlini M.J., Cafferata E.G., Puricelli L. and Moreno S. (2012). Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, 27, 1041–1048.
- Begum, A., Sandhya, S., Shaffath Ali, S., Vinod, K.R., Reddy, S. and Banji D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 12(1), 61–73.
- Benincá, J.P., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G. and Fröde, T.S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chem.*, 124(2), 468–475.
- Bicchi, C., Binello, A. and Rubiolo, P. (2000). Determination of Phenolic Diterpene Antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with Different Methods of Extraction and Analysis. *Phytochemical Analysis*, 11, 236–242.
- Bojilov, D., Dagnon, S. and Ivanov, I. (2017). New insight into the flavonoid composition of *Chenopodium botrys*. *Phytochemistry Letters*, 20, 316-321.
- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus Officinalis* Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 20585-20606.
- Boussetta, N., Soichi, E., Lanoisellé, J.-L. and Vorobiev, E. (2014). Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Industrial Crops and Products*, 52, 347-353.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*,55, 7879–7885.
- Bozinou, E., Karageorgou, I., Batra, G., Dourtoglou, V. and Lalas, S. (2019). Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques. *Beverages*,5, 8.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology*, 28 25-30.
- Brieskorn, C.H. and Dömling, H.-J. (1969). Carnosolsäure, der wichtige antioxydativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes. *Z. Lebensm.-unters. Forsch*, 141,10–16.

- Cagniard de la Tour, C. (1822). Exposé de quelques résultats obtenu par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'ether sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée. *Annales de chimie et de physique*, 21, 127-132.
- Carvalho, I.T., Estevinho, B.N. and Santos, L. (2016). Application Of Microencapsulated Essential Oils In Cosmetic And Personal Health Care Products – A Review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 109-119.
- Chaul, L.T., Conceição, E.C., Bara, M.-T.F., Paula, J.R. and Couto, R.O. (2017). Engineering spray-dried rosemary extracts with improved physicochemical properties: a design of experiments issue. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(2), 236–244.
- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M. and Lundberg, O. (1952). The antioxidant properties of natural spices. *Food Res.*, 17,46–55.
- Ciftci, O.N. (2012). Supercritical Fluid Technology: Application to Food Processing. *Journal of Food J Processing & Technology*,3(7).
- Couladis, M., Tzakou, O. and Verykokidou E. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *J Phytother Res*, 17, 194–196.
- Couto, R.O., Conceição, E.C., Chaul, L.T., Oliveira, E.M.S., Martins, F.S., Bara, M.T.F., Rezende, K.R., Alves, S.F. and Paula, J.R. (2012). Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry*,131, 99–105.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCS*. 73(5), 645-652.
- Da Silva, F.C., da Fonseca, C.R., de Alencar, S.M., Thomazini, M., Balieiro, J.C.d.C., Pittia, P. and Favaro-Trindade, C.S. (2013). Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food Bioprod. Process.*, 91, 28-36.
- Dadi Debebe, W., Shimelis Emire, A., Asfaw Hagos, D. and Eun, J.B. (2019). Development Of Microencapsulated Bioactive Product From *M. Stenopetala* Leaves Extract By Optimizing Spray Drying Process Parameters. *Annals. Food Science and Technology*, 20(2), 191-206.
- Danilenko, M. and Studzinski, G.P. (2004). Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D<sub>3</sub> and its analogs. *Exp Cell Res*, 298, 339–358.
- Del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M.P., Del Río, J.A., Ortuño, A. and Ibarra, I. (2004). Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *J Agric Food Chem*. 52(16), 4987-4992.
- Del Pilar Sánchez-Camargo, A., Valdés, A., Sullini, G., García-Cañas, V., Cifuentes, A., Ibáñez, E., and Herrero, M. (2014). Two-step sequential supercritical fluid extracts from rosemary with enhanced anti-proliferative activity. *J of Functional Foods*. 11, 293-303.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25-39.
- Dörrie, J., Sapala, K. and Zunino, S.J. (2001). Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Lett.*, 170(1), 33–39.
- Doughari, J.H. (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Venketeshwer Rao, IntechOpen.

Duarte, K., Justino, C.I.L., Gomes, A.M, Rocha-Santos, T. and Duarte, A.C. (2014). Chapter 4 - Green Analytical Methodologies for Preparation of Extracts and Analysis of Bioactive Compounds. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 65, 59-78.

El Omri, A., Han, J., Ben Abdrabbah M. and Isoda, H., (2012). Down regulation effect of *Rosmarinus officinalis* polyphenols on cellular stress proteins in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Cytotechnology.*, 64(3), 231–240.

Fadda, A., Serra, M., Molinu, M.G., Azara, E., Barberis A. and Sanna, D. (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical, *Journal of Food composition and analysis*, 35, 112-119.

Filkova, I., Huang, L.X., and Mujumdar, A.S. (2006). *Industrial Spray Drying Systems*. Taylor & Francis Group, LLC, Chapter 10, 217- 226.

Fiume, M.M., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W. and Gill, L.J., (2014). Safety Assessment of *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*, 1-44.

Fraunhofer-Gesellschaft. (2017). Spray drying—perfect dosing thanks to drug capsules. *Phys.Org*

Garofulić, I.E., Zorić, Z., Pedisić, S. and Dragović-Uzelac, V. (2017). Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material, *LWT - Food Science and Technology*, 83, 110-117.

Herrero. M., Plaza. M., Cifuentes. A. and Ibáñez. E. (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2512-2520.

Herrmann, K. (1961). Über die antioxidative Wirkung von Labiatendrogen und der ihnen enthaltenen Labiatensäure (Labiatergerbstoff). *Z. Lebensm.-unters. Forsch*, 116,224–228.

Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y. et al. (1994). Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.*, 54(3), 701–708.

Ivanović, J., Đilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Babović, N., Petrović, S. And Žižović, I. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Serb. Chem. Soc.*, 74(7), 717–732.

Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A.-S., Danguien, M., Bily, A. and Chemat, F. (2015). Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 102–109.

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J. et al. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 32(1), 63–68.

Kar, S., Palit, S., Ball, W.B. and Das, P.K. (2012). Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF-κB signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis.*, 17, 735–747.

Khanvilkar, A.M., Ranveer, R.C. and Sahoo, A.K. (2016). Carrier Materials for Encapsulation of Bio-active Components of Food. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 40(1), 62-73.



- Kivilompolo, M. and Hyötyläinen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145(1–2), 155-164.
- Koç, M., Koç, B., Susyal, G., Sakin Yilmazer, M., Kaymak Ertekin F. and Bağdatlıoğlu, N. (2011). Functional and physicochemical properties of whole egg powder: effect of spray drying conditions. *J. Food Sci. Technol.*, 48, 141-149.
- Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P. and Tzakos, A.G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120-129.
- Laszczyk, M.N. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med*, 75, 1549–1560.
- Lee, H., Kim, B.G., Kim, M., and Ahn, J.H. (2015). Biosynthesis of two flavones, apigenin and genkwanin in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 25(9), 1442-1448.
- Lee, S.H., Kim, H.W., Lee, M.K., Kim, Y.J., Asamenew, G., Cha, Y.S., and Kim, J.B. (2018). Phenolic profiling and quantitative determination of common sage (*Salvia plebeia* R. Br.) by UPLC-DAD-QTOF/MS. *European Food Research and Technology*. 244(9), 1637-1646.
- Letellier, M. and Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27, 259-271.
- Liu, Q., Li, X., Ouyang, X. and Chen, D. (2018). Dual effect of glucuronidation of a Pyrogallol-type phytophenol antioxidant: A comparison between scutellarein and scutellarin. *Molecules.*, 23(12), 3225.
- Lucarini, R., Bernardes, W.A., Ferreira, D.S. et al. (2013). In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharm. Biol.*, 51(9), 1087–1090.
- Luis, J.C., Martín Pérez, R. and Valdés González, F. (2007). UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chemistry*, 101(3), 1211-1215.
- Lukaczer, D., Darland, G., Tripp, M. et al. (2005). A Pilot trial evaluating meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. *Phyther. Res.*, 19(10), 864–869.
- Luqman, S., Dwivedi, G.R., Darokar, M.P., Kalra, A. and Khanuja, S.P.S. (2007). Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Altern. Ther. Health Med.*, 13(5), 54–59.
- Luque de Castro, M.D. and Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383–2389.
- Marafon, P., Fachel, F.N.S., Dal Prá, M., Bassani, V.L., Koester, L.S., Henriques, A.T., Braganhol, E. and Teixeira, H.F. (2019). Development, physico-chemical characterization and in-vitro studies of hydrogels containing rosmarinic acid-loaded nanoemulsion for topical application. *Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, 1199–1208.
- Martin-Benlloch, X., Novodomska, A., Jacquemin, D., Davioud-Charvet, E., and Elhabiri, M. (2018). Iron (III) coordination properties of ladanein, a flavone lead with a broad-spectrum antiviral activity. *New J of Chem.*, 42(10), 8074-8087.

- Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Chávez, M. and Pellicer, F. (2012). Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *J. Ethnopharmacol.*, 142(1), 28–34.
- Matousek, J.L., Campbell, K.L., Kakoma, I., Solter, P.F. and Schaeffer D.J. (2003). Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of *Malassezia pachydermatis*. *Can. J. Vet. Res.*, 67, 56-59.
- Mena, P., Cirilini, M., Tassotti, M., Herrlinger, K.A., Dall’Asta, C. and Del Rio, D. (2016). Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Molecules.*, 21(11), 1576.
- Merken, H.M. and Beecher, G.R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897(1–2), 177-184.
- Minich, D.M., Bland, J.S., Katke, J. et al. (2007). Clinical safety and efficacy of NG440: a novel combination of rho iso-alpha acids from hops, rosemary, and oleanolic acid for inflammatory conditions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 85(9), 872–883.
- Miron, T.L., Herrero, M. and Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1288, 1-9.
- Moharram, H. and Youssef, M. (2014) Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review, *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11, 31-42.
- Moradkhania, S., Ayatollahib, A.M., Ghanadianc, M., Moind , M.R., Razavizadehe, M. and Shahlaei, M. (2012). Phytochemical Analysis and Metal-chelation Activity of *Achillea tenuifolia*. *Lam. Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1), 177-183.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. and Vojnov, A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223-231.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V. and Michelozzi, M. (2011). Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta.*, 85, 1, 167–176.
- Munné -Bosch, S. and Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210, 925-931.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. and Schwarz, K. (2000). The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *Eur Food Res Technol* 210, 263–267.
- Munné-Bosch, S., Schwarz K. and Alegre, L. (1999). Response of Abietane Diterpenes to Stress in *Rosmarinus officinalis* L.: New Insights into the Function of Diterpenes in Plants. *Free Rad. Res.*, 31(1), 107-112.
- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S. and Yagi, A. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 679(2), 381-386.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., Vasil’eva, A.G., Gadimli, A.I., Isaev, J.I. and Vennos, C. (2019). Caffeoylquinic acids and flavonoids of fringed sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS profile, HPLC-DAD quantification, in vitro digestion stability, and antioxidant capacity. *Antioxidants.*, 8(8), 307.

Oliveira, W.P., Bott, R.B. and Souza, C.R.F. (2006). Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. *Drying Technology*, 24(4), 523–533.

Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D. and Oreopoulou, V. (2019). Polyphenols in Plants - Isolation, Purification and Extract Preparation. (Second Edition). Chapter 15 - Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters, 243-259.

Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M. and Yoshikawa, T. (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anticarcinogenic effect of *perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 25, 549–557.

Osei-Safo, D., Chama, M., Addae-Mensah, I. and Waibel, R. (2009). Hispidulin and other constituents of *Scoparia dulcis* Linn. *J of Sci and Technol (Ghana)*, 29(2).

Ozarowski, M., Mikolajczak, P.L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Szulc, M., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Czerny, B. and Mrozikiewicz, P.M. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, 91, 261-271.

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

Pataro, G., Carullo, D., Bakar Siddique, Md.A., Falcone, M., Donsi, F. and Ferrari G. (2018). Improved extractability of carotenoids from tomato peels as side benefits of PEF treatment of tomato fruit for more energy-efficient steam-assisted peeling. *Journal of Food Engineering*, 233,65-73.

Picó, Y. (2017). Chapter Four - Pressurized Liquid Extraction of Organic Contaminants in Environmental and Food Samples. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 76,83-110.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63(7), 1035-1042.

Poole, C.F. (2020). Liquid-Phase Extraction-Handbooks in Separation Science. Chapter 1- Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques, 1-44.

Prado, J.M., Vardanega, R., Debien, I.C.N., de Almeida Meireles M.A., Gerschenson, L.N., Sowbhagya H.B. and Chemat, S. (2015). Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques. Chapter 6: Conventional extraction, 139-140, Academic Press.

Puri, M., Sharma, D. and Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants- Review. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.

Ren, D.B., Qin, Y.H., Yun, Y.H., Lu, H.M., Chen, X.Q. and Liang, Y.Z. (2014). Separation of nine compounds from *Salvia plebeia* R. Br. using two-step high-speed counter-current chromatography with different elution modes. *Journal of separation science*. 37(16), 2118-2125.

Reverchon, E. and Senatore F. (1992). Isolation of Rosemary Oil: Comparison between Hydrodistillation and Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 7,227-230.

Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C. and Bailey, D.T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73,507–514.

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

- A., Ott, D., Kralisch, D., Kreisel, G. and Ondruschka, B. (2010). Ionic Liquids and Green Chemistry: A Lab Experiment. *Journal of Chemical Education*, 87,2,196-201.
- Routray, W. and Orsat., V. (2012). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Technol*, 5, 409–424.
- Sánchez-Camargo, A. and Herrero, M. (2017). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence. *Current Opinion in Food Science*, 14, 13–19.
- Santos, D., Maurício, A.C., Sencadas, V., Domingos Santos, J., Fernandes, M.H. and Gomes, P.S. (2017). Spray Drying: An Overview, *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition*, Rosario Pignatello and Teresa Musumeci, IntechOpen.
- Schwarz, K. (2000). Phenolic Diterpenes from Rosemary and Sage. Chapter 6, CRC Press LLC.
- Schwarz, K. and Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z. Lebensm.-unters. Forsch.* 195, 99–103.
- Shetty, K. (2006). Rosmarinic Acid Biosynthesis and Mechanism of Action. Taylor & Francis Group, LLC.
- Shu, Y., Liang, Y., Liang, Z., Zhao, X., Zhu, X., Feng, W., Liang, J. and Ito, Y. (2014). Studies on a simple and efficient method for large-scale preparation of genkwanin from *daphne genkwa* sieb. et zucc. using normal-phase flash chromatography. *J liquid chromatog & related technol*, 37(6), 773-785.
- Singletary, K., MacDonald, C. and Wallig, M. (1996). Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett.*, 104(1), 43–48.
- Skoula, M., Grayer, R.J., Kite, G.C. and Veitch, N.C. (2008). Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(8), 646–654.
- Smaoui, S., Hlima, H.B., Chobba. I.B. and Kadric, A. (2017). Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), 1216-1222.
- Stark, A., Ott, D., Kralisch, D., Kreisel, G. and Ondruschka, B. (2010). Ionic Liquids and Green Chemistry: A Lab Experiment. *Journal of Chemical Education*, 87,2,196-201.
- Stelmakienė, A., Ramanauskienė, K., Briedis, V. (2015). Release of rosmarinic acid from semisolid formulations and its penetration through human skin ex vivo. Article in *Acta Pharmaceutica* 65, 199–205.
- Storz, P., (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 10, 1881-1896.
- Tai, J., Cheung, S., Wu, M. and Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, 19(5), 436–443.
- Takaki, I., Bersani-Amado, L.E., Vendruscolo, A., et al. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J. Med. Food.*, 11(4), 741–746.
- Tolun, A., Altintas, Z. and Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology*, 239, 23-33.

- Trusheva, B., Trunkova, D. and Bankovacorresponding V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem Cent J.*, 1(13).
- Tsai, C., Lin, C. and Wang, Y. (2011). Carnosic acid induces the NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 expression in rat clone 9 cells through the p38/nuclear factor erythroid-2 related factor 2 pathway. *J. Nutr.*,141(12), 2119–2125.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G. and Oreopoulou, V. (2007). Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593-606.
- Ulbricht, C., Abrams, T.R., Brigham, A., Ceurvels, J., Clubb, J., Curtiss, W., Kirkwood, C.D., Giese, N., Hoehn, K., Iovin, R., Isaac, R., Rusie, E., Serrano, J.M., Varghese, M., Weissner, W. and Windsor, R.C. (2010). An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Diet. Suppl.*, 7(4), 351–413.
- Valones, M.A.A., Silva, I.C.G., Gueiros, L.A.M., Leão, J.C., Caldas Jr, A.F. and Carvalho, A.A.T. (2019). Clinical Assessment of Rosemarybased Toothpaste (*Rosmarinus officinalis* Linn.): A Randomized Controlled Double-blind Study. *Brazilian Dental Journal*, 146-151.
- Van Dijk, C., Driessen, A.J.M. and Recourt, K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*, 60(11), 1593-1600.
- Vaquero, M.R., Yanez-Gascon, M.J., Villalba, R.G., Larrosa, M., Fromentin, E., Ibarra, A., Alvin Ibarra, A., Roller, M., Tomas-Barberan, F., Espin de Gea, J.C. and García-Conesa, M.T. (2012). Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *PLoS one*. 7(6).
- Vidović, S.S., Vladić, J.Z., Vaštag, Ž.G., Zeković, Z.P. and Popović, L.M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*, 258, 209–215.
- Wagstaff, S.J., Hickerson, L., Spangler, R., Reeves, P.A. and Olmstead, R.G. (1998). Phylogeny in Labiatae s. l., inferred from cpDNA sequences. *Pl Syst Evol*, 209, 265–274.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A. and Harding, S.E. (2009). *Materials for Encapsulation*. Chapter 3, Springer Science+Business Media.
- Wang, H., Provan, G.J. and Helliwell K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*,87(2),307-311.
- Wei Zheng, W. and Wang, S.Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11), 5165-5170.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., Greenham, J.R., Grayer, R.J., Kite, G.C. and Eagles, J. (2003). Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochem.*, 64(1), 275-283.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. and Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*,105(3), 940-949.
- Xu, D.P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.J. and Li, H.B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.*,18(1),96.
- Xu, J.Z., Shen, J., Cheng, Y.Y. and Qu, H.B. (2008). Simultaneous detection of seven phenolic acids in Danshen injection using HPLC with ultraviolet detector. *Journal of Zhejiang University Science B.*, 9(9), 728-733.

Zabot, G.L., Moraes, M.N., Rostagno, M.A. and Meireles, M.A.A. (2014). Fast analysis of phenolic terpenes by high performance liquid-chromatography using a fused-core column. *Anal. Methods*, 6, 7457–7468.

Zgórka, G. and Głowniak, K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(1), 79-87.

Zhang, Y., Bao, F., Zhao, Z., Sun, X., Qi, W. and Xie, J. (2013). The stability investigation of compound Danshen injection (a traditional medicine) with a new high-performance liquid chromatography method. *Pharmacognosy magazine.*, 9(36), 338.

Zhang, Y., Smuts, J.P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J.C. and Armstrong, D.W. (2012). Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9305-9314.

Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W. and Zhao, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid Using Ionic Liquid Solution from *Rosmarinus officinalis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(9), 11027-11043.

Αυγουστάκης, Κ. Σημειώσεις Χημείας Και Τεχνολογίας Καλλυντικών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα, 2003 ,σελ 16.

Κατσιώτης, Σ.Θ. και Χατζοπούλου, Π.Σ., (2010). Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά και αιθέρια έλαια. Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε.

Μαρούλης, Α.Ι., Χατζηαντωνίου, Κ., Τσιτσιριδάκη, Α. (2012). «Εναλλακτικοί Διαλύτες, Ιοντικοί Διαλύτες», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας, 8-9.

Τσιμογιάννης, Δ. (2008). Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών : Αναγωγή Ελεύθερων ριζών και Προστασία Φυτικών ελαίων. διδακτορική διατριβή. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών διαδικασιών.



## Συντομογραφίες

AOX: antioxidants: αντιοξειδωτικά

CA: Carnosic acid: καρνοσικό οξύ

COH: Carnosol: καρνοσόλη

DE: Dextrose equivalent : ισοδυναμία σε δεξτρόζη

DPPH: 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

EAE: Enzyme Assisted Extraction: Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

FDA: U.S. Food and Drug Administration

GA: Gum arabic: αραβικό κόμμι

GAE: Gallic acid equivalents: ισοδύναμα γαλλικού οξέος

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

IMS: Industrial methylated Spirits: Βιομηχανικά μεθυλιωμένα οινόπνευματώδη

MAE: Microwave assisted extraction: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

MCT: Medium-chain triglyceride : Τριγλυκερίδια μέσης αλυσίδας

MD: maltodextrin: μαλτοδεξτρίνη

MEE: Microencapsulation Efficiency: Αποτελεσματικότητα μικροεγκλεισμού

MEY: Microencapsulation Yield: Απόδοση μικροεγκλεισμού

NF: Not found: Δεν βρέθηκε

PEF: Pulsed electric field: Παλμικά ηλεκτρικά πεδία

PLE: Pressurized liquid extraction: Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό

*R. Officinalis: Rosmarinus officinalis*

RA: Rosmarinic acid: ροσμαρινικό οξύ

SC-CO<sub>2</sub>: Supercritical CO<sub>2</sub>: υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>

SF: Supercritical fluid: Υπερκρίσιμο ρευστό

SFE: Supercritical fluid extraction: Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό

TFA: Trifluoroacetic acid: τριφθοραιθανικό οξύ

TPC: Total phenolic content: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο

TPD: Total phenolic diterpenes: Ολικά φαινολικά διτερπένια

UAE: Ultrasound-assisted extraction: Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους

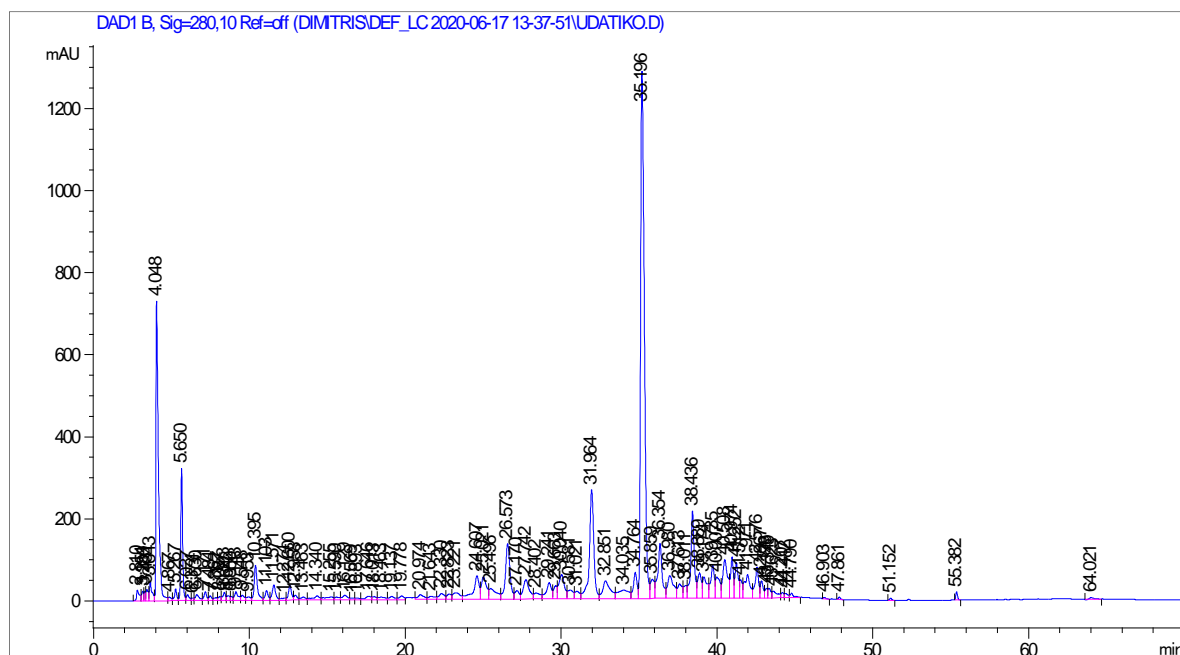
VCRP: Voluntary Cosmetic Registration Program

δ/τος: διαλύματος

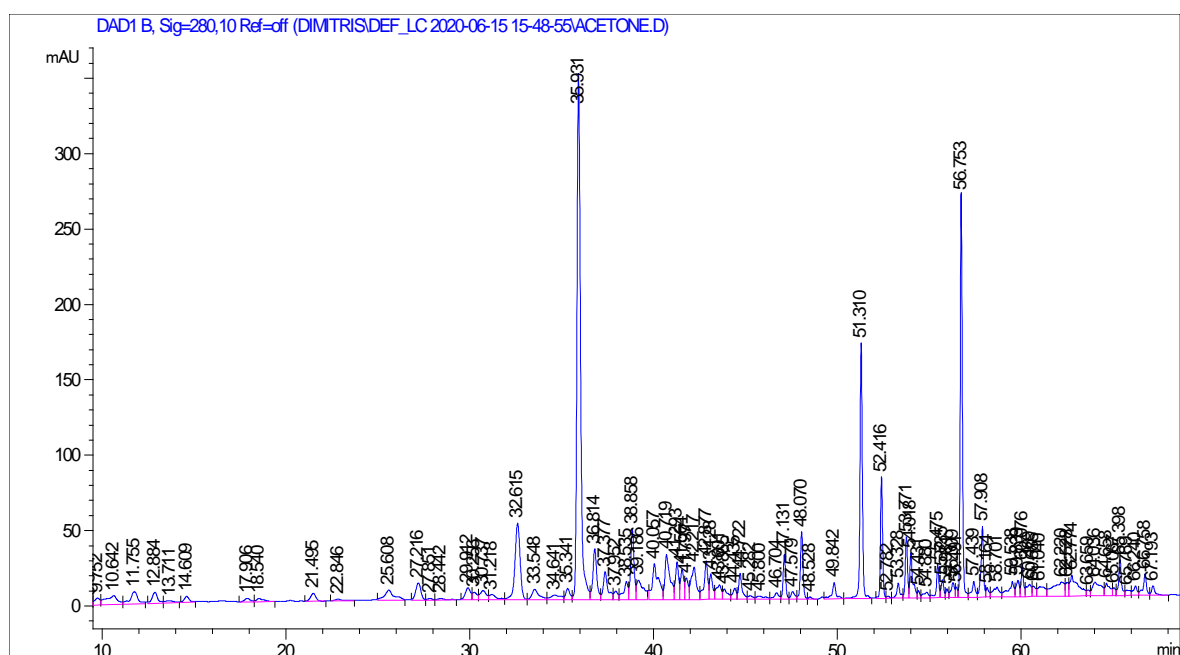
Ξ.β.: ξηρό βάρος

## Παράρτημα

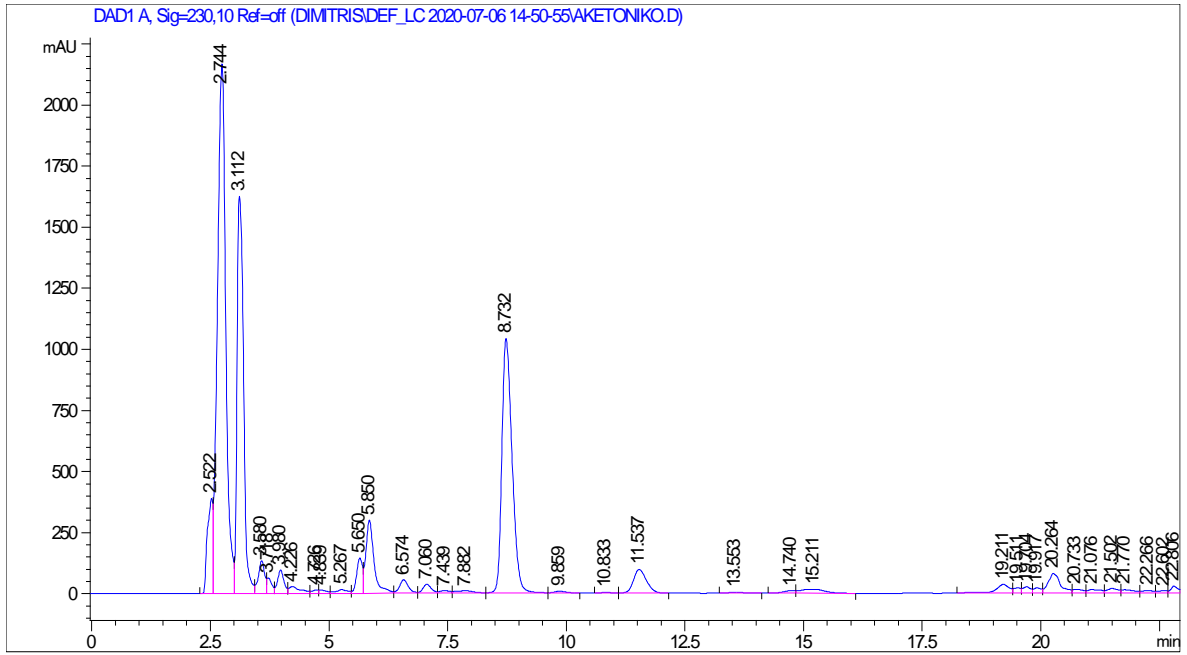
Στις εικόνες 65-73 απεικονίζονται τα χρωματογράφημα των διαφόρων ειδών εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



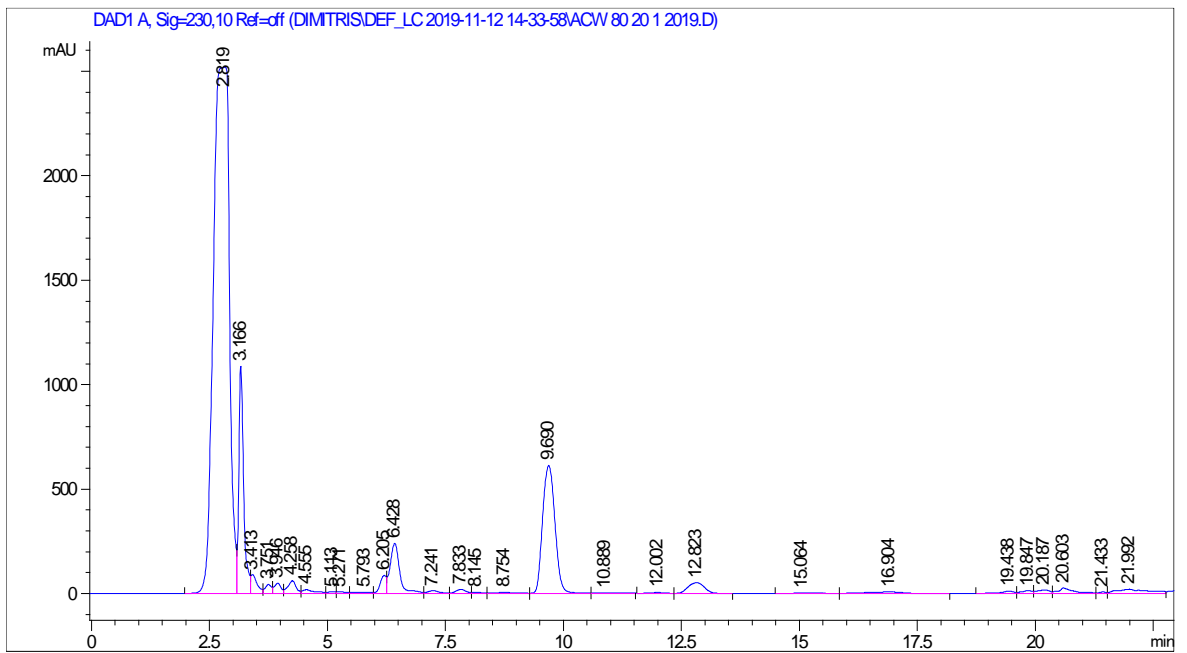
Εικόνα 65. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Flan)



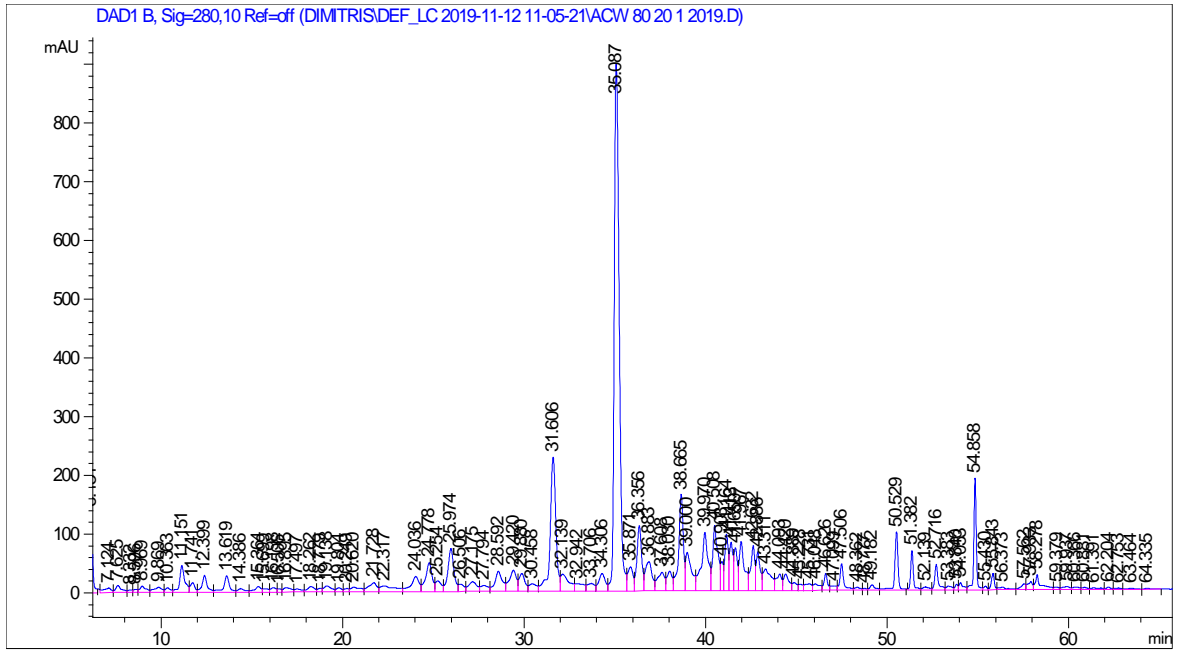
Εικόνα 66. Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Flan)



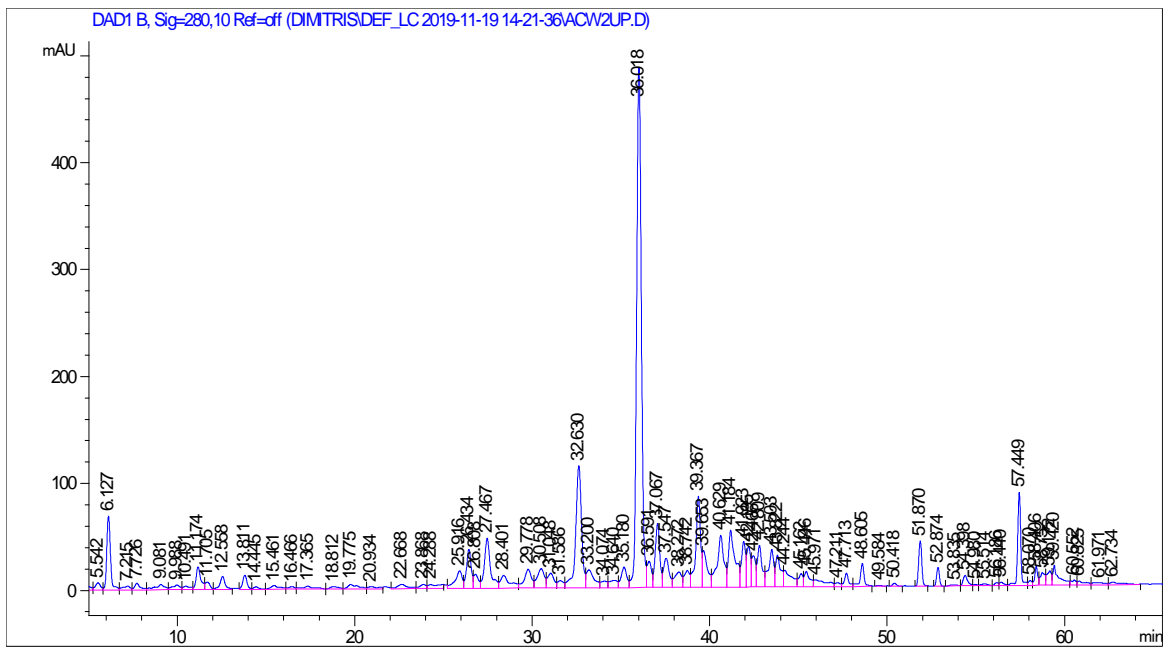
Εικόνα 67. Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Carnosic)



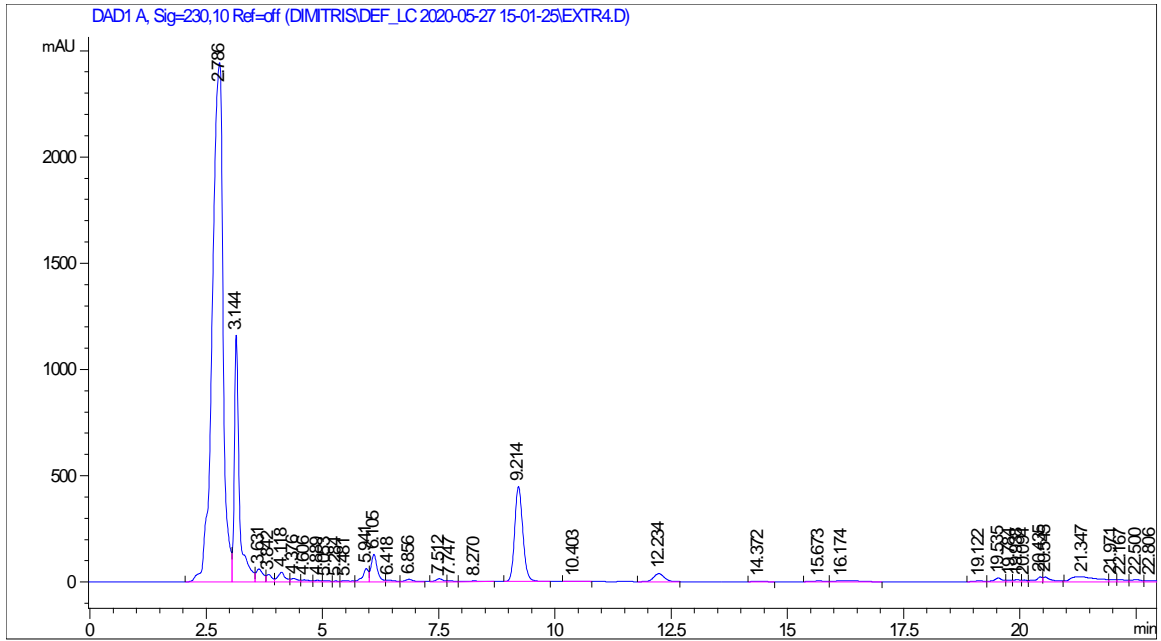
Εικόνα 68. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείποντος έργου (Μέθοδος Carnosic)



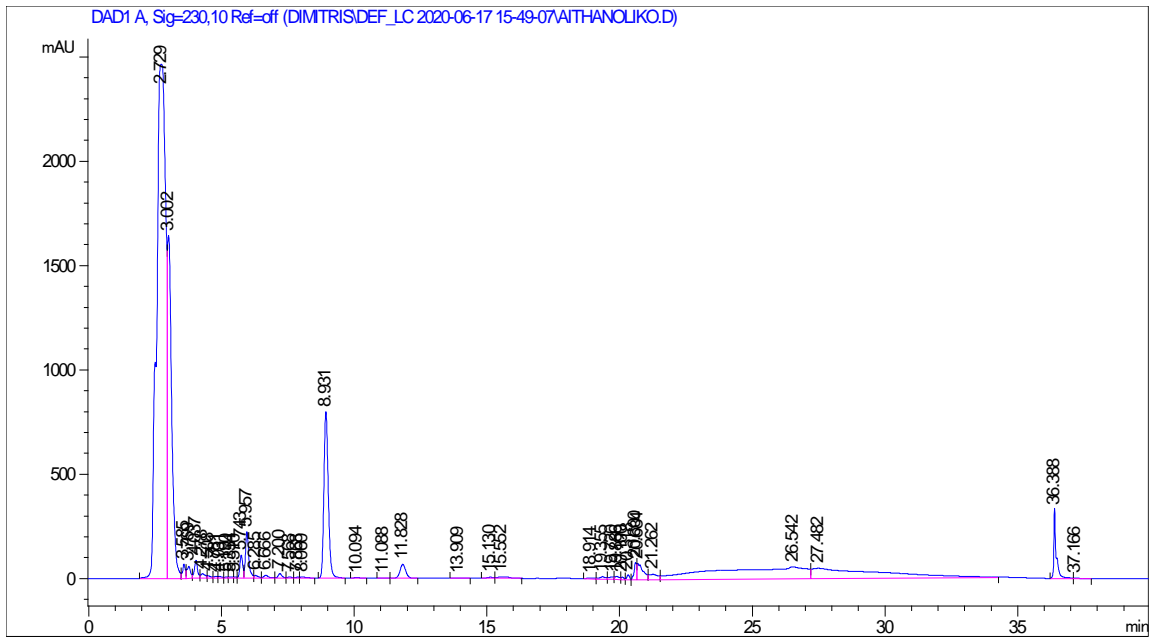
Εικόνα 69. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση σε σταθερή κλίνη ημιδιαλείπontos έργου (Μέθοδος Flan)



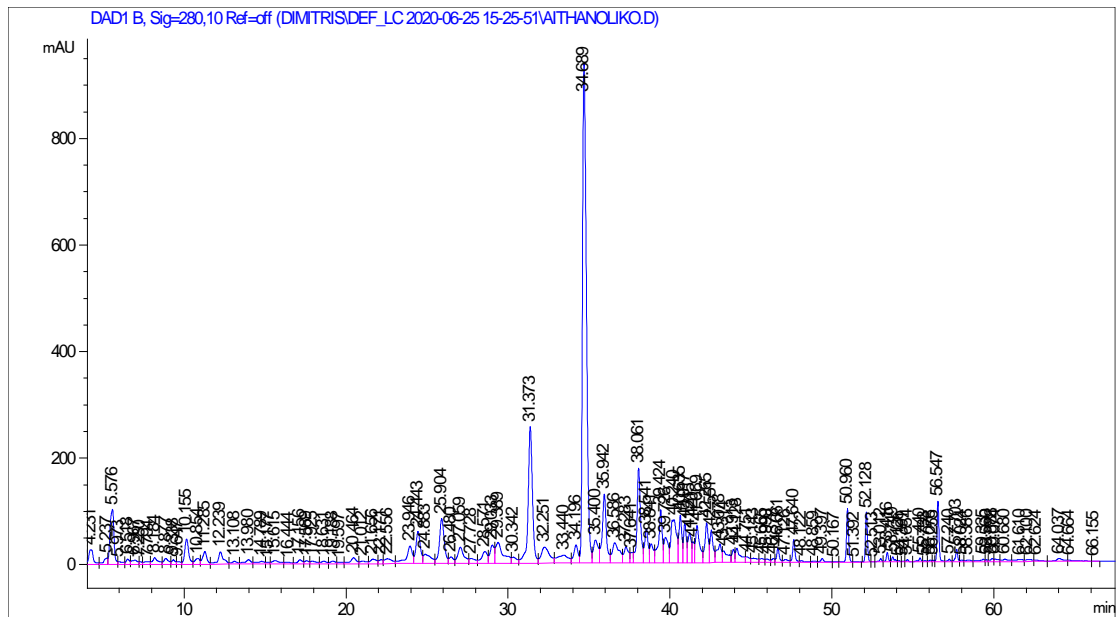
Εικόνα 70. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Flan)



Εικόνα 71. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Ακετόνης:νερού (80:20) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Carnosic)



Εικόνα 72.Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Αιθανόλης:νερού (60:40) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Carnosic)



Εικόνα 73. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος Αιθανόλης:νερού (60:40) από εκχύλιση υπερήχους (Μέθοδος Flan)

Στους πίνακες 51-53 βρίσκονται οι αποδόσεις σε σχέση με την αρχική προς εγκλεισμό ποσότητα κάθε συστατικού όπως επανυπολογίστηκαν σε διάστημα ενός ή έξι μηνών με σκοπό να μελετηθεί η διατηρησιμότητα του κάθε συστατικού στις μικροκάψουλες. Ο όρος απόδοση μικροεγκλεισμού δεν είναι ορθός σε αυτή την περίπτωση αλλά οι υπολογισμοί αυτοί έγιναν με σκοπό την εύρεση του ποσοστού απώλειας κάθε εγκλεισμένου συστατικού.

Πίνακας 51. Απόδοση εγκλεισμού κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα μεγαλύτερης κλίμακας σε διάστημα 197 ημερών από την παρασκευή

Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων μεγαλύτερης κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)		
	1:0	1:0	2:1
	Περιεκτικότητα core%		
	10	20	10
	MEY (%)		
Ροσμαρινικό οξύ	84,08±0,13%	90,34±1,46%	84,92±0,08%
Φλαβονοειδή	65,01±0,29%	61,00±4,02%	50,98±0,43%



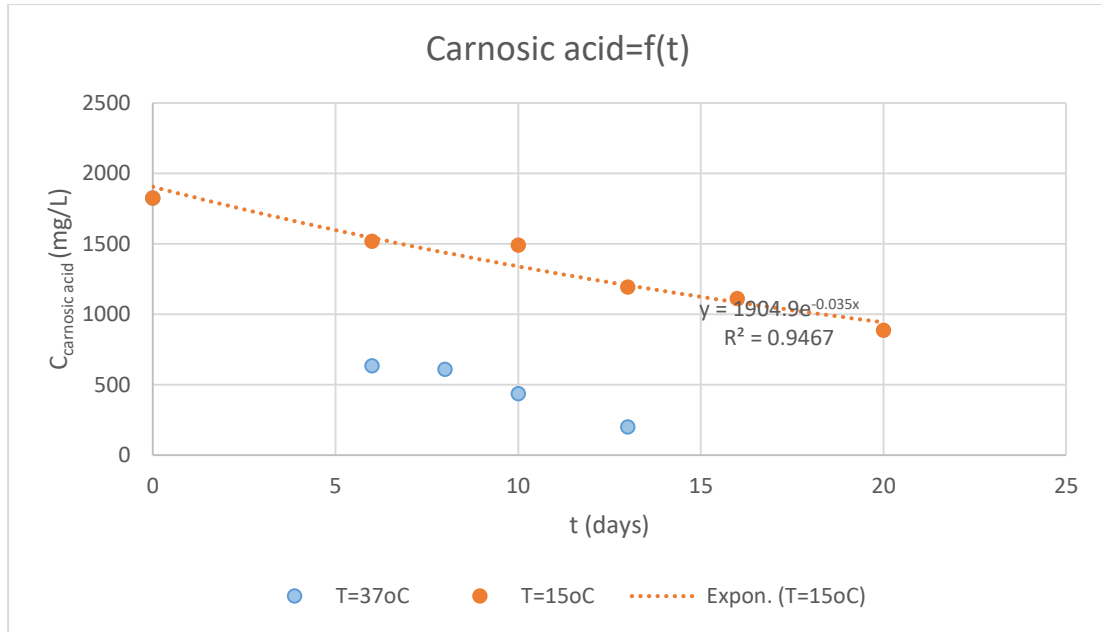
Πίνακας 52. Απόδοση εγκλεισμού κόνεων από υδατικά εκχυλίσματα πειραματικής κλίμακας σε διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή

Φαινολικά συστατικά Υδατικών εκχυλισμάτων πειραματικής κλίμακας	Φορέας εγκλεισμού (MD:GA)			
	1:0	4:1	4:1	2:1
	Θερμοκρασία (°C)			
	140	140	160	140
	MEY (%)			
Ροσμαρινικό οξύ	93,60±2,65%	100,00±4,01%	100,00±1,65%	94,20±1,34%
Φλαβονοειδή	82,93±1,00%	86,52±4,74%	88,91±8,72%	86,24±1,48%

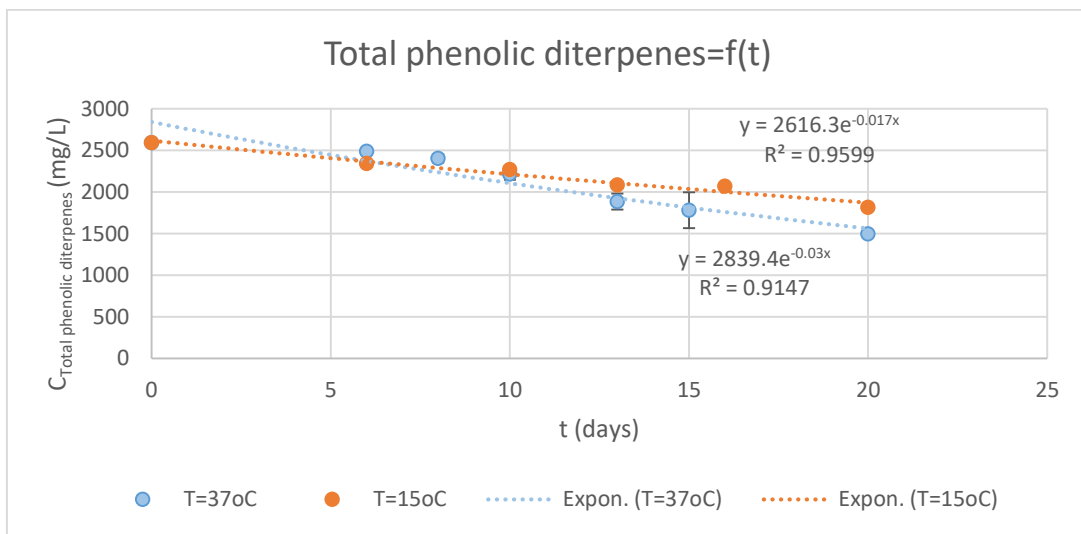
Πίνακας 53. Απόδοση εγκλεισμού ακετονικών εκχυλισμάτων μετά από διάστημα 28 ημερών από την παρασκευή

Φαινολικά συστατικά Ακετονικών εκχυλισμάτων	Περιεκτικότητα core	
	5%	10%
	Φορέας Εγκλεισμού (MD:GA)	
	2:1	2:1
MEY (%)		
Ολικά φαινολικά διτερπένια	63,98±2,83%	35,70±1,04%
Καρνοσικό οξύ	47,14±0,78%	30,78±0,10%
Καρνοσόλη	100,00±0,00%	56,95±1,45%
Λοιπά φαινολικά διτερπένια	44,98±4,34%	36,87±7,59%

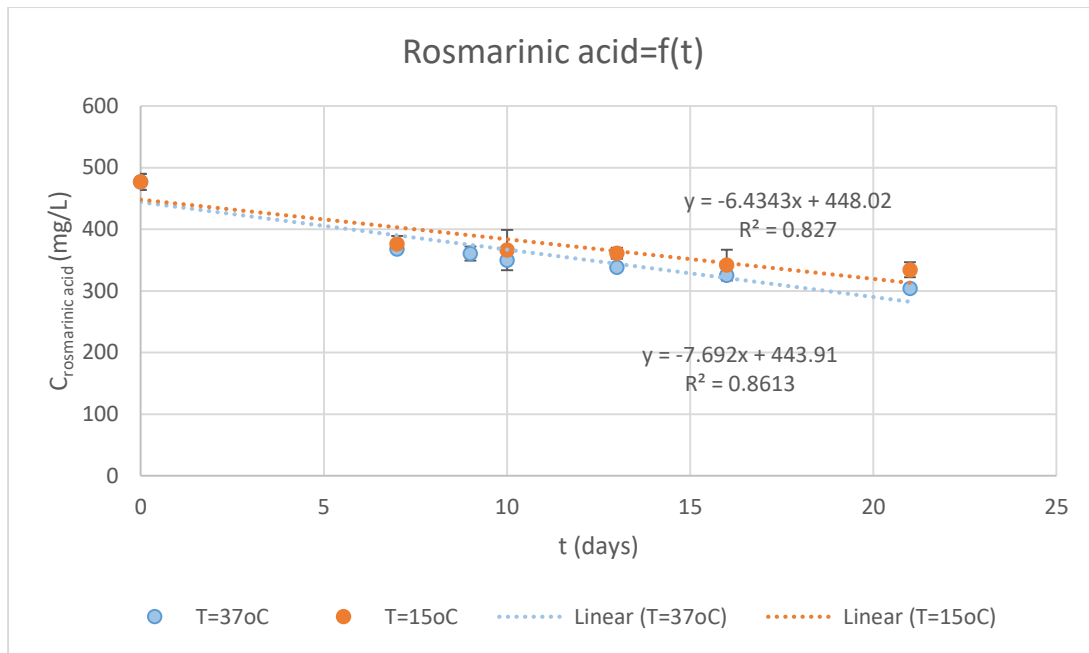
Στα διαγράμματα 35 - 38 φαίνονται οι δοκιμές για την εύρεση της τάξης κινητικής στα γαλακτώματα. Οι περιπτώσεις αυτές είναι εκείνες που απορρίφθηκαν λόγω χειρότερης προσαρμογής των πειραματικών σημείων.



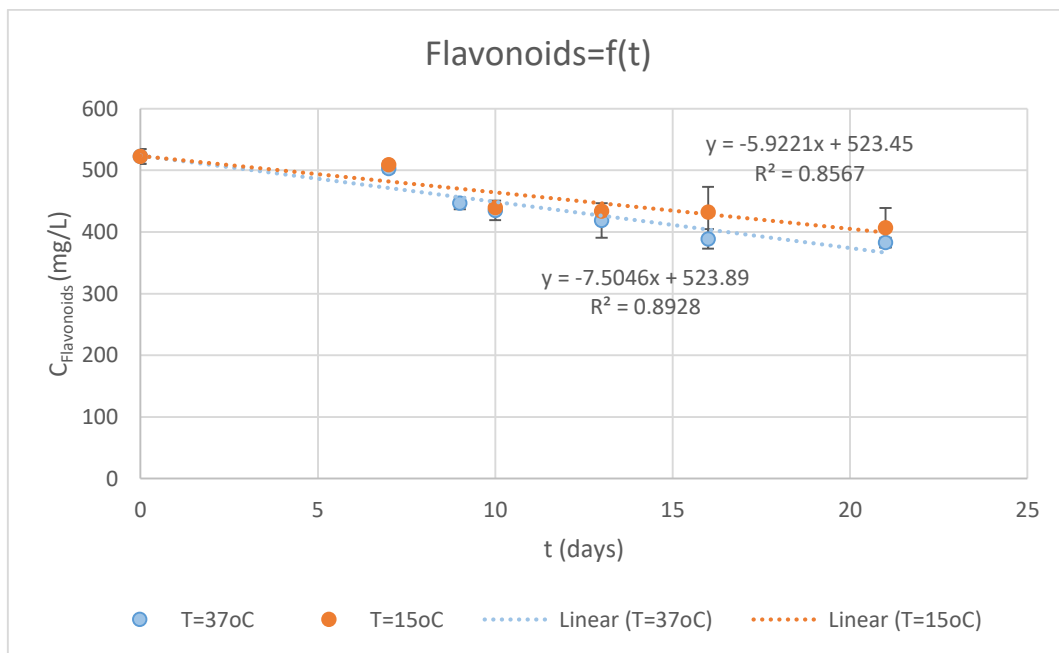
Διάγραμμα 35. Διατηρησιμότητα καρνοσικού οξέος στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 1ης τάξης)



Διάγραμμα 36. Διατηρησιμότητα ολικών φαινολικών διτερπενίων στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 1ης τάξης)



Διάγραμμα 37. Διατηρησιμότητα ροσμαρινικού οξέος στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 0ης τάξης)



Διάγραμμα 38. Διατηρησιμότητα ολικών φλαβονοειδών στους 37 και στους 15 °C (δοκιμή εφαρμογής κινητικής 0ης τάξης)