

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ VI: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**



**Συγκριτική μελέτη βιοδραστικών συστατικών  
δενδρολίβανου με βάση την ποικιλία και την  
εποχή συγκομιδής**

**Διπλωματική εργασία**

**Κωνσταντίνος Ζάχος**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**

**ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2020**



# Πρόλογος

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Βασιλική Ωραιπούλου για την εμπιστοσύνη, τη διαρκή καθοδήγηση και την άοκνη συνδρομή της σε όλη την πορεία της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η αμέριστη διάθεσή της για επίβλεψη και συνεργασία, καθώς και οι πολύτιμες γνώσεις της συνέτειναν καθοριστικά στη θεμελίωση και εμβάθυνση των γνώσεων που απέκτησα.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Τσιμογιάννη, ο οποίος με την εργαστηριακή εμπειρία του, τη γνώση του στις απαραίτητες για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας μεθόδους και τεχνικές, αλλά και με τη συνεχή έμπρακτη συνεργασία του μαζί μου, συνέβαλε σημαντικά στην προσπάθεια αυτή.

Ακόμη, θα ήθελα να απευθύνω στους διδάκτορες Γεώργιο Δημόπουλο και Αθανάσιο Λημναίο ευχαριστίες, καθώς η θετική τους διάθεση και η προθυμία τους να βοηθούν ήταν πολύτιμες, όπως αντίστοιχα και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για τη βοήθειά τους και το φιλικό κλίμα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Πασχαλίνα Χατζοπούλου, Διευθύντρια Ερευνών στο Τμήμα Αρωματικών Φαρμακευτικών φυτών, στο Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΓΕΩΡΓΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ, για την πολύτιμη βοήθεια και την προσφορά των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και τη βοήθειά τους σε αυτήν μου την προσπάθεια.

# Περίληψη

Το *Rosmarinus officinalis* είναι ένα φυτό με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, που οι ιδιότητες του έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Αυτές οι ισχυρές βιολογικές δράσεις συνδέονται με την παρουσία πληθώρας βιοενεργών συστατικών, όπως τα φαινολικά συστατικά, που συναντώνται στο φυτό αλλά και στο αιθέριο έλαιό του. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου βρίσκει συχνή εφαρμογή στην αρωματοβιομηχανία, λόγω της χαρακτηριστικής του οσμής. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο και το αιθέριο έλαιο τριών ποικιλιών δενδρολίβανου (A, B, και C) και το πώς η περίοδος συγκομιδής (άνοιξη ή φθινόπωρο) ή το έτος (2017, 2019) επιδρά στην ποσότητα και την ποιότητα των φαινολικών συστατικών του φυτού, καθώς και στα χαρακτηριστικά του αιθέριου ελαίου του. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του φυτού και η σχέση της με το φαινολικό περιεχόμενο.

Αρχικά, για τη μελέτη της επίδρασης της ποικιλίας στη σύσταση και την ποσότητα του αιθέριου ελαίου, πραγματοποιήθηκαν υδροατμο-αποστάξεις σε δείγματα από τις ποικιλίες και συλλέχθηκε το αιθέριο έλαιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποικιλία B εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο (2.9%) και η χαμηλότερη απόδοση παρατηρήθηκε στην ποικιλία C (0.4%). Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι, κατά την άνοιξη, το δενδρολίβανο των ποικιλιών B και C, έχει μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο σε σύγκριση με το φθινόπωρο (2.9 % και 0.5%, και 2.1 % και 0.4 %, αντιστοίχως). Όσον αφορά στο διαφορετικό έτος συγκομιδής, το οποίο εξετάστηκε στην ποικιλία B, βρέθηκε ότι το ποσοστό του αιθέριου ελαίου το 2017 ήταν μειωμένο (2.7%) σε σχέση με το 2019.

Η ανάλυση των δειγμάτων του αιθέριου ελαίου με τη χρήση GC-MS έδειξε ότι η ποικιλία A ανήκει στον χημειότυπο 1,8-κινεόλης, η ποικιλία B στον χημειότυπο α-πινενίου και η ποικιλία C στον χημειότυπο ισόποσου α-πινενίου, κάμφορας και 1,8-κινεόλης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι, στο αιθέριο έλαιο και των δύο ποικιλιών (B και C), η ποσότητα της 1,8-κινεόλης δεν εμφανίζει μεταβολές μεταξύ άνοιξης και φθινοπώρου. Αντίθετα, μεταβολές εμφανίζονται στο α-πιπένιο, χωρίς όμως να είναι παρόμοιες σε όλες τις ποικιλίες. Συγκεκριμένα, η ποικιλία C είναι πιο φτωχή σε α-πινένιο το φθινόπωρο, ενώ στη ποικιλία B το α-πιπένιο είναι σε παρόμοια ποσοστά με την άνοιξη. Συγχρόνως, μεταβολές στην ποικιλία C παρουσιάζει και η καμφορά με τη χαμηλότερη ποσότητα να εμφανίζεται την άνοιξη. Η ποικιλία A είναι η πιο φτωχή σε καμφορά (0.4 %) και ταυτόχρονα η πιο πλούσια σε 1,8-κινεόλη (49.7%), χαρακτηριστικά πολύ σημαντικά για τη χρήση του αιθέριου ελαίου της στην αρωματοβιομηχανία. Όσον αφορά στο πλήθος συστατικών του αιθέριου ελαίου των ποικιλιών, στην ποικιλία A ανιχνεύθηκαν τα λιγότερα συστατικά (21) και στην ποικιλία B τα περισσότερα (33).

Για τη μελέτη της επίδρασης της ποικιλίας αλλά και της εποχικής συγκομιδής στο φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική δράση του φυτού, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από εκχυλίσματα του απελαιωμένου και αλεσμένου δενδρολίβανου της κάθε ποικιλίας και συγκομιδής, πρώτα με ακετόνη ως διαλύτη και ακολούθως με νερό, ώστε να διαχωρισθούν τα πολικά από τα άπολα συστατικά και να είναι ευκολότερη η ταυτοποίησή τους. Στα εκχυλίσματα μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και εκφράστηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) και η αντιοξειδωτική δράση μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και εκφράστηκε σε ισοδύναμα 6-Υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμάνη-2-καρβοξυλικού οξέος (Trolox equivalent (TE)). Τα υδατικά εκχυλίσματα ανέκτησαν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, κατά μέσο όρο

(42323±5418 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού), σε σχέση με τα ακετονικά (19035±2691 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού) αλλά εμφάνισαν και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση, κατά μέσο όρο (67812±11900 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού και 38352±14676 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού αντίστοιχα), σε όλες τις ποικιλίες. Όσον αφορά στις εποχικές συγκομιδές, σε όλες τις ποικιλίες, η συγκομιδή του Οκτωβρίου παρουσιάζει αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, κατά μέσο όρο (117634 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού), και του φαινολικού περιεχόμενου (70880mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού) σε σχέση με την συγκομιδή του Μαΐου (97455 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού και 62198 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού αντίστοιχα). Για την ποικιλία Β, η άνοιξη της χρονιάς 2017 ήταν λιγότερο αποδοτική από την άνοιξη της χρονιάς 2019, όσον αφορά στο φαινολικό περιεχόμενο (59194±3524 και 67205±889 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού), αλλά εμφανίζει παρόμοια αντιοξειδωτική δράση (113513±5370 και 108960±5844 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού). Η ποικιλία Β εμφανίζει, κατά μέσο όρο, πιο ισχυρή συνολική αντιοξειδωτική δράση (111925 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού) και μεγαλύτερη συγκέντρωση σε συνολικά φαινολικά συστατικά (67852 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού) από την ποικιλία C (103163 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού και 65226 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού) αλλά η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση και συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, σε δείγμα, είναι παρόμοια και στις δύο ποικιλίες (120377±7790 και 114890±9189 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού και 73260±2606 και 68499±4923 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού αντίστοιχα). Επιπροσθέτως, η ποικιλία Β, που συγκρίνεται με την ποικιλία Α στα δείγματα της χρονιάς 2017, παρουσιάζει παρόμοια συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (59194±3524 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού) αλλά και παραπλήσια αντιοξειδωτική δράση (113513±5370 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού) με αυτή της ποικιλίας Α (62440±4272 mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού και 115103±4881 mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού). Όσον αφορά στην εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων (ποσοστό των εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών ως προς τα συνολικά εκχυλιζόμενα στερεά), οι εκχυλίσεις με νερό ήταν οι πιο εκλεκτικές κατά μέσο όρο (17.23 %) από αυτές με ακετόνη (15.09 %).

Για την εκτίμηση της σύστασης των ποικιλιών και της επίδρασης της εποχικής συγκομιδής σε αυτή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HPLC-DAD. Τα αποτελέσματα της μεθόδου δείχνουν ότι στο δενδρόλιβανο τα κύρια φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων του είναι τα φαινολικά οξέα, τα φαινολικά διτερπένια, και τα φλαβονοειδή. Στην παρούσα εργασία, ανιχνεύθηκαν επτά (7) φαινολικά οξέα, έντεκα (11) φλαβονοειδή και τέσσερα (4) φαινολικά διτερπένια. Ακόμη, με την μέθοδο HPLC-DAD και με τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης και των φασμάτων UV της βιβλιογραφίας, ταυτοποιήθηκαν έξι (6) φλαβονοειδή, η νεπιτρίνη, η ισοσκουτελλαρεΐνη, η κιρσιμαριτίνη, η σαλβιγενίνη, η γκενκουανίνη και η λαδανειΐνη, καθώς και δύο (2) φαινολικά οξέα, το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ και τρία (3) φαινολικά διτερπένια, η καρνοσόλη, ο καρνοσικός μεθυλεστέρας και το καρνοσικό οξύ.

Από τα φαινολικά οξέα, το κύριο συστατικό ήταν το ροσμαρινικό οξύ και από τα φαινολικά διτερπένια, το καρνοσικό οξύ. Όσον αφορά στο ροσμαρινικό οξύ, η ποικιλία C εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, κατά μέσο όρο (19565 mg/kg ξηρής βάσης φυτού), από την ποικιλία Β (17244 mg/kg ξηρής βάσης φυτού), όπως και η ποικιλία Α (15421±1206 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) που συγκρίθηκε με την ποικιλία Β την χρονιά 2017 (12937±400 mg/kg ξηρής βάσης φυτού). Την άνοιξη, το ροσμαρινικό οξύ, κατά μέσο όρο (15313 mg/kg ξηρής βάσης φυτού), είναι μειωμένο σε ποσότητα σε σχέση με το φθινόπωρο (21496 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) και η χρονιά 2017 παρουσιάζει παραπλήσιες συγκεντρώσεις με την χρονιά 2019 (12937±400 και 13989±950 mg/kg ξηρής βάσης φυτού).

Όσον αφορά στα φαινολικά διτερπένια, στις ποικιλίες που μελετήθηκαν, το καρνοσικό οξύ είναι το επικρατέστερο. Η ποικιλία Β εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά καρνοσικού οξέος, το 2017, (28818±859

mg/kg ξηρής βάσης φυτού) από το 2019 (25862±1359 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) και η ποικιλία A έχει παρόμοια συγκέντρωση (29798±430 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) με την ποικιλία B. Η ποικιλία C εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση καρνοσικού οξέος, κατά μέσο όρο (11014±190 mg/kg ξηρής βάσης φυτού), από την ποικιλία B (23866 mg/kg ξηρής βάσης φυτού). Παρατηρείται, επίσης, ότι το καρνοσικό οξύ βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με βάση το μέσο όρο, κατά την ανοιξιάτικη περίοδο συγκομιδής (19111 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) σε σχέση με την φθινοπωρινή (15770 mg/kg ξηρής βάσης φυτού) .

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η συσχέτιση των φαινολικών συστατικών με το αιθέριο έλαιο των ποικιλιών. Το φθινόπωρο του 2019, η απόδοση και των δύο ποικιλιών (B και C) σε αιθέριο έλαιο μειωνόταν σε σχέση με την άνοιξη, ενώ το φαινολικό περιεχόμενο του φυτού αυξανόταν. Όμως, το ποσοστό του αιθέριου ελαίου δεν φαίνεται να συσχετίζεται με το φαινολικό περιεχόμενο των διαφορετικών ποικιλιών. Πέρα από τη συσχέτιση με το αιθέριο έλαιο, μελετήθηκε και η συσχέτιση των φαινολικών συστατικών μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση στο καρνοσικό οξύ και τα ολικά φαινολικά διτερπένια, στα φλαβονοειδή, στο ροσμαρινικό οξύ και στα ολικά φαινολικά οξέα. Το καρνοσικό οξύ εμφανίζει μια αντίστροφη συσχέτιση, όσον αφορά στην εποχική διακύμανση, με το ροσμαρινικό οξύ, τα ολικά φαινολικά οξέα και τις φλαβονοειδείς αγλυκόνες. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος το φθινόπωρο αυξάνεται, ενώ του καρνοσικού οξέος και του γλυκοζίτη νεπιτρίνη μειώνεται. Τα φαινολικά διτερπένια το φθινόπωρο εμφανίζουν σταθερή συγκέντρωση και ίσως μια μικρή μείωση σε σχέση με την άνοιξη.

Προσθετικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με το φαινολικό τους περιεχόμενο. Στα αποτελέσματα, φαίνεται ότι τα υδατικά εκχυλίσματα έχουν μια μέτρια γραμμική συσχέτιση ( $R^2=0.76$ ) αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικού περιεχομένου, γεγονός που οφείλεται σημαντικά στο ροσμαρινικό οξύ, το οποίο έχει πάρα πολύ μεγάλη θετική συσχέτιση ( $R^2=0.96$ ) με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Από την άλλη, το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει μια μέτρια συσχέτιση ( $R^2=0.71$ ) της συγκέντρωσής του με την αντιοξειδωτική δράση, όπως εκτιμήθηκε μέσω της δέσμησης ελευθέρων ριζών.

Τέλος, η μορφοποίηση των βιοδραστικών συστατικών σε νανογαλακτώματα ή μικροκάψουλες, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, καθώς παρέχει την δυνατότητα της καλύτερης συντήρησης των εκχυλισμάτων χωρίς απώλεια των ιδιοτήτων των βιοδραστικών συστατικών των φυτών, καθώς και της ευκολότερης χρήσης σε τρόφιμα και καλλυντικά. Στην παρούσα εργασία, ερευνήθηκε ο εγκλεισμός των βιοενεργών συστατικών του δενδρολίβανου σε μικροκάψουλες. Για τη μορφοποίηση των φαινολικών συστατικών σε μικροκάψουλες, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ξήρανσης με ψεκασμό, σε υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας A, με μαλτοδεξτρίνη ως μέσο εγκλεισμού. Η σκόνη που προέκυψε, αναλύθηκε και ποσοτικοποιήθηκαν τα δραστικά συστατικά μέσω HPLC-DAD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό του ροσμαρινικού οξέος που ενθυλακώθηκε στις μικροκάψουλες ήταν ιδιαίτερα υψηλό (95.96%). Παρόμοια ποσοστά είχαν και τα φαινολικά οξέα (94.05%) και οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες (94.59%). Αντίθετα, οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες παρουσιάζουν μικρότερο ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού (67.53%)

# Comparative study of rosemary bioactive components based on variety and harvest season

## Abstract

*Rosmarinus officinalis* is a plant with high antioxidant and antibacterial activity, whose properties have attracted the interest of the scientific community. Those strong biological activities are connected with the presence of a plethora of bioactive components, such as the phenolic compounds, found in rosemary, and its essential oil. Furthermore, the essential oil of rosemary finds frequent applications in the perfume industry, due to its distinctive odor. In this thesis, the phenolic content and the essential oil of three rosemary varieties (A, B and C), were studied on the effects of the harvest season (spring or autumn) or the year (2017,2019), to the quantity and the quality of the phenolic compounds found on the plant, as well as the composition of the essential oil. Also, the antioxidant activity of the rosemary extracts and its correlation to the phenolic content, was reviewed.

Initially, to study the effects of the variety of rosemary, on the composition and quantity of the essential oil, water-steam-distillations were performed on samples of rosemary and the essential oil was collected. The results showed that rosemary B displays the highest yield of essential oil (2.9%) and rosemary C the lowest (0.4%). Furthermore, during the spring, the essential oil of the varieties B and C, displays higher yields of rosemary oil than during the autumn (2.9 % and 0.5%, and 2.1 % and 0.4 %, accordingly). Regarding, the year of harvest, which was examined with variety B, it was found that the percentage of the rosemary essential oil on the year 2017 was decreased compared to the year 2019.

Further analysis of the samples of the essential oil, with the use of the GC-MS method, showed that variety A belongs to the 1,8-cineole chemotype, variety B to the  $\alpha$ -pinene chemotype and variety C to the chemotype with same amounts of 1,8-cineole, camphor and  $\alpha$ -pinene. Subsequently it was observed that, in the essential oil of both varieties (B and C), the quantity of 1,8-cineole does not show changes between spring and autumn. On contrary, changes are showed in the quantity of  $\alpha$ -pinene, but they are not similar in all varieties. Specifically, variety C has a lower quantity of  $\alpha$ -pinene in autumn, while variety B has similar amounts of  $\alpha$ -pinene during the seasons. Meanwhile, camphor shows changes to its quantity in variety C, with the lowest amount displayed in spring. Variety A has the lowest percentage of camphor (0.4%) and at same time it has the highest amount of 1,8-cineole, which are very important qualities for the essential oil regarding the perfume industry. On regard, of the number of constituents of the essential oil, the least components were identified in variety A (21) and the most in variety B (33).

To study the effect of the variety and the season of harvest on the phenolic content and the antioxidant activity of rosemary, a series of extractions of deoiled and ground rosemary of each variety and harvest, were performed, first with acetone, as solvent, and then with water, to separate the polar from the non-polar constituents, and make them easier to identify. The total phenolic content of the extracts was measured by the Folin-Ciocalteu method and was expressed in gallic acid equivalents (GAE) and their antioxidant activity was measured by the scavenging of the free radical DPPH and was expressed in 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid equivalents (Trolox equivalent (TE)). Aqueous extracts recovered higher concentrations of phenolic compounds, on average, (42323 $\pm$ 5418 mg GAE/kg of dried plant weight (DW)) compare to acetone extracts (19035 $\pm$ 2691 mg GAE/kg DW) and showed higher antioxidant properties, on average (67812 $\pm$ 11900 mg TE/kg DW and 38352 $\pm$ 14676 mg TE/kg DW

accordingly), in all varieties. On regard of seasonal harvests, in all the varieties, the October harvest displays an increase in average antioxidant activity (117634 mg TE/kg DW) and phenolic content (70880mg GAE/kg DW), compared to the May harvest (97455 mg TE/kg DW and 62198 mg GAE/kg DW, accordingly). In terms of the phenolic content, for variety B, spring of 2017 was less efficient than spring of 2019 (59194±3524 and 67205±889 mg GAE/kg DW), but shows similar antioxidant activity (113513±5370 and 108960±5844 mg TE/kg DW). Variety B shows on average a stronger overall antioxidant activity (111925 mg TE/kg DW) and a higher concentration of total phenolic components (67852 mg GAE/kg DW) than variety C (103163 mg TE/kg DW and 65226 mg GAE/kg DW), but regarding the sample, the highest antioxidant activity and concentration of phenolic compounds is similar to both varieties. (120377±7790 and 114890±9189 mg TE/kg DW and 73260±2606 and 68499±4923 mg GAE/kg DW, accordingly). In addition, variety B, compared to variety A in the samples of 2017, displays similar concentrations of phenolic components (59194±3524 mg GAE/kg DW) and antioxidant properties (113513±5370 mg TE/kg DW) with that of variety A (62440±4272 mg GAE/kg DW and 115103±4881 mg TE/kg DW). Regarding the selectivity of the extraction (percentage of extracted phenolic constituents relative to the total extracted solids), the aqueous extractions were more selective in average (17.23%) than the acetone extracts.

The HPLC-DAD method was used to evaluate the composition of the varieties and the effect of seasonal harvest on it. The results of the method show that, in rosemary extracts the main phenolic constituents are phenolic acids, phenolic diterpenes and flavonoids. In this thesis seven (7) phenolic acids, eleven (11) flavonoids and four (4) phenolic diterpenes were detected. Also, with the use of the HPCL-DAD method and by comparing the retention times and UV spectra of literature, six (6) flavonoids, nepitrin, isoscutellarein, cirsimaritin, salvigenin, genkwanin and ladanein, were identified, as well as two (2) phenolic acids, caffeic acid and rosmarinic acid and three (3) phenolic diterpenes, carnosol, methyl carnosate and carnosic acid.

Of the phenolic acids the main compound was rosmarinic acid and of the phenolic diterpenes the carnosic acid. In regard with the rosmarinic acid, variety C displays higher concentrations, on average (19565 mg/kg DW) than variety B (17244 mg/kg DW), as well as variety A, which is compared with variety B in 2017 (12937±400 mg/kg DW). During the spring, rosmarinic acid, on average is reduced in quantity (15313 mg/kg DW), in comparison with autumn (21496 mg/kg DW) and the year 2017 presents similar concentrations to the year 2019 (12937±400 and 13989±950 mg/kg DW).

Regarding phenolic diterpenes, in the studied varieties, carnosic acid is the predominant compound. Variety B shows higher percentages of carnosic acid, in 2017, (28818±859 mg/kg DW) than in 2019 (25862±1359 mg/kg DW) and has similar concentrations with variety A (29798±430 mg/kg DW). Variety C presents a lower concentration of carnosic acid, on average (11014±190 mg/kg DW) than variety B (23866 mg/kg DW). It is, also, observed that carnosic acid has higher concentrations, on average, during the spring harvest (19111 mg/kg DW), in comparison with the autumn harvest (15770 mg/kg DW).

Subsequently, the correlation of the phenolic compounds and the essential oil of the varieties, was investigated. During the autumn of 2019, the yield of the essential, for both the varieties (B and C), was reduced compared to the spring, while the phenolic content was increased. However, the percentage of the essential oil does not seem to correlate with the phenolic content of the different varieties. In addition to the correlation with the essential oil, the correlation of the phenolic constituents with each other was also studied. Specifically, emphasis was placed on carnosic acid and total phenolic diterpenes, flavonoids, rosmarinic acid and total phenolic acids. Carnosic acid shows an inverse correlation with rosmarinic acid,



total phenolic acids and flavonoid aglycones, regarding the seasonal variation. In particular, the concentration of rosmarinic acid, was increased during the autumn, while the concentration of the carnosic acid and the glucoside nepitrin is reduced. The phenolic diterpenes, during the autumn, presents a stable concentration and maybe a slight decrease during the spring.

In addition, in the present work the correlation of the antioxidant activity and the phenolic content of the rosemary extracts, was studied. The results show that the aqueous extracts have a moderate linear correlation ( $R^2=0.76$ ) of antioxidant activity and phenolic content, which is significantly due to rosmarinic acid, which has a very large positive correlation ( $R^2=0.96$ ) with the antioxidant properties of the extracts. On the other hand, carnosic acid presents a moderate correlation ( $R^2=0.71$ ) of its concentration and the antioxidant activity, as assessed by free radical scavenging.

In conclusion, the formulation of bioactive compounds in nanoemulsions or microcapsules, has attracted interest, as it provides the possibility of better preservation of extracts, without losing the properties of bioactive constituents of plants, as well as the more convenient use in food and cosmetics. In this paper, the encapsulation of bioactive compounds found in rosemary in microcapsules, was studied. For the formulation of the phenolic compounds in microcapsules, the spray frying method was used in an aqueous extract of variety A, with maltodextrin as the encapsulation medium. The resulting powder, was analyzed and the active ingredients were quantified by HPLC-DAD. The results show that, the percentage of rosmarinic acid, encapsulated in the microcapsules, was particularly high (95.96 %). Phenolic acids and flavonoid glucosides showed similar results (94.05 % and 94.59% accordingly). In contrast, flavonoid aglycones presents a lower percentage (67.53%)

## Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	11
2. Γενικά στοιχεία για το δενδρολίβανο και τα καλλιεργούμενα είδη .....	12
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού και ιστορικά στοιχεία.....	12
2.2 Είδη και ποικιλίες.....	13
2.3 Χώρες καλλιέργειας.....	13
3. Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου .....	13
3.1 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με την ποικιλία .....	17
3.2 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής .....	18
3.4 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση .....	20
4. Φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου.....	22
4.1 Τα κύρια φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου και η ταξινόμησή τους σε ομάδες.....	22
4.2 Φαινολικά οξέα.....	22
4.3 Φαινολικά Διτερπένια .....	24
4.4 Φλαβονοειδή .....	25
4.5 Φαινολικά Τριτερπένια.....	26
4.6 Διαφοροποίηση φαινολικών συστατικών ανάλογα με την ποικιλία και την περίοδο συγκομιδής	27
4.7 Αντιοξειδωτική δράση .....	30
5. Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών .....	32
5.1 Απόσταξη αιθερίου ελαίου.....	32
5.1.1 Υδρο-ατμοαπόσταξη.....	32
5.2 Εκχύλιση.....	32
5.2.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης .....	32
5.2.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης.....	34
5.3 Διαφοροποίηση συστατικών με βάση τη μέθοδο εκχύλισης.....	36
5.4 Είδος διαλύτη.....	38
6.Πειραματικό μέρος.....	40
6.1. Σχεδιασμός πειραμάτων .....	40
6.2 Πρώτες ύλες, αντιδραστήρια και συσκευές .....	40
6.2.1 Πρώτες ύλες.....	40

6.2.2 Αντιδραστήρια .....	41
6.2.3 Συσκευές .....	41
6.3 Πειραματικές τεχνικές .....	42
5.3.1 Υδροατμο-απόσταξη και απομάκρυνση αιθέριου ελαίου .....	42
6.3.2 Εκχύλιση σταθερής κλίνης .....	42
6.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	42
6.3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH .....	43
6.3.5 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα .....	43
6.3.6. Ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC .....	44
6.3.7 Ανάλυση και ποσοτικοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου με GC-MS.....	44
6.3.8 Παρασκευή μίγματος για ξήρανση με ψεκασμό .....	44
6.3.9 Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying) .....	45
7. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	45
7.1 Παραλαβή αιθέριου ελαίου με υδροατμο-απόσταξη .....	45
7.1.1 Ανάλυση αιθέριου ελαίου .....	49
7.2 Ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμός των φαινολικών συστατικών .....	51
7.2.1 Σύγκριση φαινολικού περιεχομένου των τριών ποικιλιών .....	52
7.2.3 Σύγκριση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Β .....	53
7.2.4 Σύγκριση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της Ποικιλία C .....	55
7.3. Ανάλυση Αντιοξειδωτικής Δράσης των εκχυλισμάτων των ποικιλιών.....	56
7.3.1 Ανάλυση Αντιοξειδωτική ικανότητα ποικιλίας Β.....	59
7.3.2 Ανάλυση Αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας C.....	60
7.4 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο HPLC.....	61
7.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο HPLC .....	65
7.5.1 Ποσοτικοποίηση Φαινολικών διτερπενίων με την μέθοδο HPLC .....	65
7.5.2 Ποσοτικοποίηση Φαινολικών οξέων με την μέθοδο HPLC .....	68
7.5.3 Ποσοτικοποίηση Φλαβονοειδών με την μέθοδο HPLC.....	70
7.6 Συσχέτιση των συστατικών του δενδρολίβανου .....	72
7.7. Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δράσης με φαινολικό περιεχόμενο.....	79
7.8 Εκλεκτικότητα εκχύλισης .....	83
7.9 Ξήρανση με ψεκασμό .....	84
8.Συμπεράσματα.....	85
9.Βιβλιογραφία.....	88

## 1.Εισαγωγή

Στην σύγχρονη εποχή, υπάρχει ζήτηση από τους καταναλωτές, για τρόφιμα, στα οποία γίνεται χρήση φυσικών συντηρητικών χωρίς συνθετικά πρόσθετα. Για τον λόγο αυτό, έχουν μελετηθεί πολλά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και εκχυλίσματά τους, λόγω των βιολογικών δράσεών τους. Το *Rosmarinus officinalis* είναι ένα μεσογειακό φυτό, μέλος της οικογένειας *Lamiaceae*, το οποίο διαχρονικά είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και φαρμακευτικές ιδιότητές του. Έχει αποδειχτεί ότι οι σημαντικές του δράσεις οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι το δενδρολίβανο είναι πλούσιο σε φαινολικά συστατικά. Συστατικά που συναντώνται στα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φαινολικά διτερπένια και τα φλαβονοειδή αλλά και ενώσεις που απομονώνονται στο αιθέριο έλαιό του, του προσδίδουν μια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, το δενδρολίβανο είναι ανθεκτικό φυτό και καλλιεργείται όλες τις εποχές σε όλο τον κόσμο, και ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες, όπως η Ελλάδα. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι αυτές οι βιολογικές δράσεις του δενδρολίβανου εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Για αυτό, προέχει να μελετηθεί η επίδραση παραγόντων όπως η εποχή συγκομιδής και ο χημειότυπος του δενδρολίβανου στη συγκέντρωση και τη σύσταση των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματά του, αλλά και η συσχέτιση του περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά με την αντιοξειδωτική του δράση και η συσχέτιση των επιμέρους φαινολικών συστατικών μεταξύ τους. Επιπλέον, είναι σημαντικό να ερευνηθεί και η αποτελεσματικότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την μορφοποίηση των φαινολικών συστατικών σε νανογαλακτώματα ή μικροκάψουλες για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων, όπως η ξήρανση μέσω ψεκασμού. Τέλος, είναι γεγονός ότι το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου χρησιμοποιείται συχνά στην αρωματοβιομηχανία λόγω της χαρακτηριστικής του οσμής. Όμως, οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου, που το καθιστούν κατάλληλο για βιομηχανική χρήση, εξαρτώνται από τη σύστασή του κυρίως σε α-πινένιο, 1,8-κινεόλη και καμφορά. Θεωρείται, λοιπόν, κρίσιμο να δοθεί προσοχή και στην ποσότητα και στη σύσταση του αιθέριου ελαίου, σε σχέση με το φαινολικό περιεχόμενο αλλά και την εποχή συγκομιδής.

Στην παρούσα διπλωματική, εξετάστηκαν 3 διαφορετικές ποικιλίες δενδρολίβανου, από το Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ “Δήμητρα”. Η μία από αυτές μελετήθηκε σε δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής (2017 και 2019), ενώ δύο ποικιλίες μελετήθηκαν σε διαφορετική εποχή συγκομιδής (άνοιξη και φθινόπωρο).

## 2. Γενικά στοιχεία για το δενδρολίβανο και τα καλλιεργούμενα είδη

### 2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού και ιστορικά στοιχεία

Το *Rosmarinus officinalis*, με την κοινή ονομασία δενδρολίβανο, είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Το δενδρολίβανο είναι ένα ξυλώδες, πολυετές, ποώδες βότανο. Τα φύλλα του είναι αειθαλή, σε μορφή βελόνων και μπορούν να παραγάγουν το αιθέριο έλαιο που προσδίδει στο δενδρολίβανο τη χαρακτηριστική του οσμή. Είναι σκούρο πράσινο στην κορυφή και στην κάτω πλευρά είναι καλυμμένο από πυκνά, κοντά, άσπρα τριχίδια. Κάποιες ποικιλίες του δενδρολίβανου έχουν μια όρθια ανάπτυξη και οι μίσχοι φτάνουν μέχρι τα 1.5 m. Άλλες ποικιλίες έχουν μια μορφή, στην οποία τα κλαδιά κάμπτονται προς τα κάτω, δημιουργώντας ένα φαινόμενο καταρράκτη. Τα μικρά άνθη του δενδρολίβανου μπορούν να είναι μπλε, βιολετί, μοβ, ροζ ή άσπρα, ανάλογα με την ποικιλία. Σε εύκρατα κλίματα το δενδρολίβανο ανθεί την άνοιξη και το καλοκαίρι, αλλά σε θερμότερες περιοχές ανθεί όλο το χρόνο.

Αυτό το ανθεκτικό Μεσογειακό φυτό χρειάζεται έντονη ηλιοφάνεια, μεγάλη φωτοπερίοδο και ελαφρύ έδαφος το οποίο δεν μετατρέπεται σε βαρύ αργιλώδες έδαφος. Έχει προσαρμοστεί σε παρατεταμένα, ζεστά καλοκαίρια και αντέχει περιόδους ξηρασίας. Στα νεότερα στάδια της ανάπτυξης του είναι μαλακό και εύκαμπτο και περιέχει το περισσότερο αιθέριο έλαιο. Οι γηραιότεροι μίσχοι γίνονται ξυλώδεις και με το χρόνο σχηματίζουν ένα θαμνώδη κορμό.

Το δενδρολίβανο έχει υπάρξει σημαντικό μπαχαρικό από τα αρχαία χρόνια. Πέρα από τη διεθνή χρήση του ως γαστρονομικό έδεσμα, λόγω του ευχάριστου χαρακτηριστικού αρώματος του, αυτό το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς από την αρχαιότητα. Η χρήση του ελαίου του δενδρολίβανου χρονολογείται από το 1500. Πριν την εφεύρεση της κατάψυξης το έλαιο του δενδρολίβανου χρησιμοποιούταν για τη συντήρηση των τροφίμων καθώς και για σκοπούς αντισηψίας ή συντήρησης και εξακολουθεί να έλκει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών του συστατικών.

Στη παραδοσιακή ιατρική, το δενδρολίβανο έχει χρησιμοποιηθεί ως τονωτικό και ήπιο αναλγητικό και θεωρείται ως ένα από τα πιο αποτελεσματικά βότανα για την θεραπεία πονοκεφάλων, κακού κυκλοφορικού, φλεγμονωδών ασθενειών και σωματικής και νοητικής κούρασης. Το δενδρολίβανο έχει χρησιμοποιηθεί εμπειρικά ως αγχολυτικός και υπατοπροστατευτικός παράγοντας στην λαϊκή φαρμακευτική (al-Sereiti et al 1999 ;Yu et al 2013)

Σήμερα, το φυτό καλλιεργείται παγκοσμίως, λόγω της ευρύτατης χρήσης του, ως κοινό σπιτικό μαγειρικό μπαχαρικό για βελτίωση της γεύσης. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων, λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής του δράσης. Το δενδρολίβανο, επίσης, έχει πολλές σημαντικές βιολογικές δράσεις κυρίως αντιμικροβιακή, αντιθρομβωτική, διουρητική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. Έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι τα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου και τα απομονωμένα συστατικά του εμφανίζουν ανασταλτικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, συκωτιού, προστάτη, πνεύμονα και της λευχαιμίας (de Oliveira et al 2019)

Αυτές οι ισχυρές βιολογικές δράσεις συνδέονται με την παρουσία πολλών βιοενεργών συστατικών στο φυτό.

## 2.2 Είδη και ποικιλίες

Το δενδρολίβανο καλλιεργείται διεθνώς και υπάρχουν παραπάνω από 24 ευρέως γνωστές ποικιλίες. Μερικές από αυτές είναι οι Benenden Blue, Flora Rosa, Tuscan Blue, Majorca Pink, Arp, Albiflorus, Hundington Carpet, McConnells Blue, Irene, Holly Hyde Hill Hurdy.

Το ευρύτερα γνωστό είδος δενδρολίβανου, είναι το κοινό *Rosmarinus officinalis*. Υπάρχουν επίσης άλλα δύο είδη δενδρολίβανου τα *Rosmarinus tomentosus* και *Rosmarinus eriocalyx*, αλλά είναι λιγότερο γνωστά από το *Rosmarinus officinalis*. (Baydar et al 2009).

## 2.3 Χώρες καλλιέργειας

Το δενδρολίβανο καλλιεργείται διεθνώς, αλλά οι κορυφαίες περιοχές καλλιέργειας δενδρολίβανου είναι οι χώρες της Μεσογείου, της Βόρειας Αφρικής, η Αγγλία, το Μεξικό, η Βραζιλία και οι ΗΠΑ. Στη Μεσόγειο το δενδρολίβανο καλλιεργείται στην Ελλάδα, την Κύπρο, την Τουρκία, την Ισπανία, τη Σερβία και τη Γαλλία ενώ στη Βόρεια Αφρική το φυτό συναντάται στην Τυνησία και στο Μαρόκο.

## 3. Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου

Τα αιθέρια έλαια είναι περίπλοκα μίγματα πτητικών ενώσεων που συντίθενται στα διάφορα όργανα των φυτών και ασκούν ποικίλες οικολογικές λειτουργίες. Λόγω των βιολογικών ικανοτήτων τους τα αιθέρια έλαια έχουν αναφερθεί ότι είναι χρήσιμα για την συντήρηση τροφίμων, στην αρωματοβιομηχανία και στην αρωματοθεραπεία (Kadri et al 2011).

Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου παράγεται από τις ανθοφόρες άκρες του φυτού μέσω απόσταξης με ατμό και είναι άχρωμο ή ωχρό κίτρινο υγρό, με τη χαρακτηριστική οσμή του φυτού. Λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής του δράσης (Kadri et al 2007), το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου είναι ικανό να αυξήσει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων τροφίμων και να διατηρήσει την ποιότητά τους κατά την αποθήκευση. Επομένως έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοσυντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων (Ojeda-Sana et al 2013).

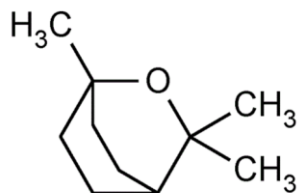
Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο που απομονώνεται από το δενδρολίβανο κατέχει ποικίλες θεραπευτικές εφαρμογές και οφέλη στην υγεία. Σύμφωνα με τη σύσταση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων από το 2010, το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία της δυσπεψίας και ήπιων σπασμωδικών διαταραχών της γαστρεντερικής οδού, καθώς και ως ανοσοενισχυτικό, στην ανακούφιση μυϊκών και αρθρικών πόνων και σε μικρές διαταραχές του περιφερικού κυκλοφορικού (Neves et al 2018). Τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί με το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου δείχνουν τις διάφορες σημαντικές φαρμακολογικές εφαρμογές του, ως αντιφλεγμονώδες (Takaki et al 2008) και αντικαταθλιπτικό (Machado et al 2013) αλλά επιδεικνύουν και την δράση του στην ενίσχυση της μνήμης (Moss et al 2003), και της προστασίας του DNA (Slameňová et al 2011), καθώς και την αντικαρκινική του δράση (Wang et al 2012).

Πέρα από την φαρμακευτική του χρήση το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου χρησιμοποιείται συχνά ως συστατικό σε άλατα και έλαια μπάνιου, γέλες και αλοιφές. Συναντάται επίσης σε καλλυντικά όπως νερό λεβάντας, κολόνιες και σε σαπούνια ως αρωματικό αλλά και για την περιποίηση των μαλλιών καθώς θρέφει τα μαλλιά και ενισχύει την ανάπτυξη τους (Sarkic et al 2018).

Τα κύρια συστατικά του είναι τα οξειδωμένα μονοτερπένια, μονοτερπενιο-υδραγονάνθρακες και οξειδωμένα σεσκουιτερπένια. Συγκεκριμένα, στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου εμφανίζονται ενώσεις όπως η 1,8-κινεόλη, η βιριντιφλορόλη, η καμφορά, το β-καρυοφυλλένιο, η α-τερπινεόλη, το α-πινένιο, το β-πινένιο, το β-μυρκήνιο και η βορνεόλη.

### 1,8 Κινεόλη

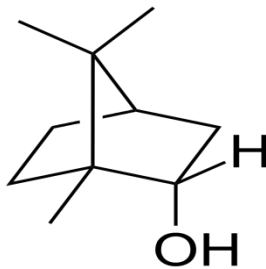
Η 1,8 Κινεόλη, με την κοινή ονομασία ευκαλυπτόλη, έχει μια πικάντικη, δροσερή γεύση μέντας και προσδίδει στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου την χαρακτηριστική του οσμή. Γι' αυτόν τον λόγο είναι επιθυμητό συστατικό στο αιθέριο έλαιο. Είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά αναμίξιμη με τον αιθέρα, την αιθανόλη και το χλωροφόρμιο. Το σημείο βρασμού της είναι στους 176°C (Maciel et al 2010).



Εικόνα 3.1 Δομή 1,8-κινεόλης

### Βορνεόλη

Η Βορνεόλη είναι μια οργανική ένωση σε μορφή άσπρων σβόλων, με έντονη οσμή καμφοράς. Η βορνεόλη οξειδώνεται πολύ εύκολα σε κετόνη, δηλαδή καμφορά. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών της δεν είναι επιθυμητή σε σημαντικές ποσότητες σε αιθέριο έλαιο που χρησιμοποιείται στην αρωματοβιομηχανία. Το σημείο βρασμού της είναι οι 208 °C. Η βορνεόλη διαλύεται δύσκολα στο νερό και είναι αναμίξιμη με το χλωροφόρμιο, την αιθανόλη, την ακετόνη και τον αιθέρα (Lide et al 2005).

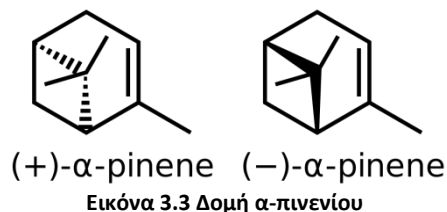


Εικόνα 3.2 Δομή βορνεόλης

### α-Πινένιο

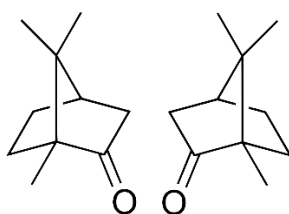
Το α-πινένιο έχει διακριτικά αρώματα από πεύκο και έλατο. Υπάρχουν δύο δομικά ισομερή του πινένιου που απαντώνται στη φύση: το α-πινένιο και το β-πινένιο. Το α-πινένιο είναι σε μορφή καθαρού άχρωμου υγρού και το σημείο βρασμού του είναι στους 157 °C. Το α-πινένιο είναι δυσδιάλυτο στο νερό και αναμίξιμο στους γνωστούς οργανικούς διαλύτες.

Το α-πινένιο χρησιμοποιείται στην ιατρική ως αντιφλεγμονώδες, αποχρεμπτικό, βρογχοδιασταλτικό και τοπικό αντισηπτικό. Παρά τις πολλές του βοηθητικές ιδιότητες το α-πινένιο σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση στο δέρμα. (Russo et al 2011)



### Καμφορά

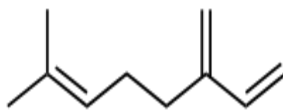
Η καμφορά εμφανίζεται με τη μορφή λευκών διαφανών ή αδιαφανών κρυστάλλων με κηρώδη υφή και με χαρακτηριστική, διαπεραστική αρωματική οσμή. Λόγω της χαρακτηριστικής της οσμής και του γεγονότος ότι είναι αλλεργιογόνα ένωση η καμφορά είναι ανεπιθύμητη στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου. Το σημείο τήξεως της κυμαίνεται στους 175-177 °C ενώ το σημείο ζέσεως στους 204 °C. Είναι διαλυτή στο νερό και εξαιρετικά διαλυτή στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες (Lincoln et al 1984).



Εικόνα 3.4 Δομή καμφοράς

### Β-μυρκένιο

Το β-μυρκένιο είναι ένας αλκενικός φυσικός υδρογονάνθρακας που ανήκει στα μονοτερπένια. Παράγεται κυρίως ημι-συνθετικά από τη μυρκία, από στην οποία οφείλει το όνομά του. Το μυρκένιο είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο που έχει ευρεία χρήση στην αρωματοβιομηχανία (Behr et al 2009). Έχει ευχάριστη οσμή, αλλά σπάνια χρησιμοποιείται ευθέως. Είναι ασταθές στον αέρα και τείνει να πολυμεριστεί. Το σημείο βρασμού του είναι ανάμεσα στους 166 με 168 °C.



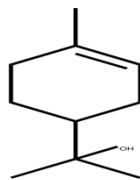
Εικόνα 3.5 Δομή Β-μυρκένιου

### α-τερπινεόλη

Η α-τερπινεόλη είναι μια μονοτερπινική αλκοόλη. Έχει ευχάριστη οσμή, παρόμοια με της πασαλιάς, είναι σε μορφή άχρωμου υγρού και είναι συχνό συστατικό σε αρώματα και καλλυντικά. Η α-τερπινεόλη είναι ένα από τα δύο πιο άφθονα συστατικά του τσαγιού lapsang souchong, καθώς προέρχεται από τον



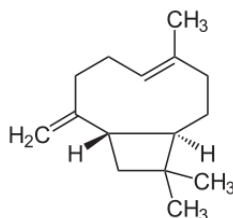
καπνό πεύκου που χρησιμοποιείται για την ξήρανση του τσαγιού. Συχνά η τερπινεόλη παράγεται από το α-πινένιο. Έχει σημείο βρασμού στους 214–217 °C (Yao et al 2005).



Εικόνα 3.6 Δομή α-τερπινεόλης

### Β-καρυοφυλλένιο

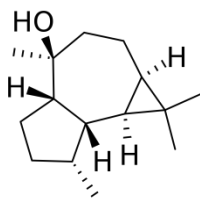
Το β-καρυοφυλλένιο είναι ένα φυσικό δικυκλικό σесκουιτερπένιο το οποίο είναι συστατικό του αιθέριου ελαίου πολλών φυτών, όπως το δενδρολίβανο και ο λυκίσκος. Το β-καρυοφυλλένιο συνήθως βρίσκεται σε μίγμα με το ισοκαρυοφυλλένιο και το α-καρυοφυλλένιο, ένα ανοιχτού δακτυλίου ισομερές. Το καρυοφυλλένιο είναι γνωστό για την ύπαρξη ενός δακτύλιου κυκλοβουτανίου, καθώς και ενός *trans*-διπλού δεσμού σε ένα εννιαμερές δακτύλιο, τα οποία είναι σπάνια στη φύση. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αλλεργιογόνος δράση του β-καρυοφυλλένιου εξαρτάται από την οξείδωση του και συγκεκριμένα το οξειδωμένο β-καρυοφυλλένιο εμφανίζει ελάχιστη αλλεργία στο δέρμα. (Sköld et al 2006). Το σημείο βρασμού του είναι στους 262–264 °C.



Εικόνα 3.7 Δομή β-καρυοφυλλένιου

### Βιριντιφλορόλη

Η βιριντιφλορόλη είναι η μια χημική ένωση που ανήκει στην ομάδα των σесκουιτερπενοειδών και έχει απομονωθεί από τα αιθέρια έλαια ποικιλίας φυτών όπως το δενδρολίβανο και το *Melaleuca alternifolia*. Έχει γλυκιά, φρουτώδη γεύση τροπικής μέντας γεγονός που το καθιστά επιθυμητό συστατικό του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου (Ireland et al 2002).

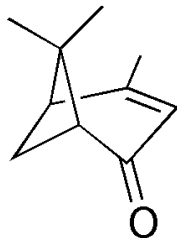


Εικόνα 3.8 Δομή βιριντιφλορόλης

### Βερμπενόνη

Η βερμπενόνη είναι μια φυσική οργανική ένωση που ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων και βρίσκεται φυσικά σε ποικιλία φυτών, όπως το δενδρολίβανο. Η βερμπενόνη έχει ευχάριστη, χαρακτηριστική οσμή

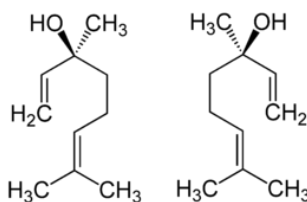
και για αυτό το λόγο είναι επιθυμητή στα αιθέρια έλαια. Το σημείο βρασμού της είναι στους 227 to 228 °C.



Εικόνα 3.9 Δομή βερμπενόνης

### Λινανοόλη

Με τον όρο λινανοόλη γίνεται αναφορά σε δύο εναντιομερή μιας φυσικής αλκοόλης που συναντάται σε πολλά άνθη και μπαχαρικά. Η λινανοόλη έχει πολλαπλές εμπορικές εφαρμογές, η πλειονότητα των οποίων βασίζεται στην ευχάριστη ελαφρά πικάντικη οσμή της. Το σημείο βρασμού της είναι στους 198-199 °C.



Εικόνα 3.10 Δομή Λινανοόλης

### 3.1 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με την ποικιλία

Το δενδρολίβανο παρουσιάζει διαφορετικούς χημειότυπους ανάλογα την περιοχή, το κλίμα και το περιβάλλον στο οποίο καλλιεργείται. Αυτοί είναι: χημειότυπος α-πινενίου, χημειότυπος καμφοράς, χημειότυπος 1,8-κινεόλης και χημειότυπος που περιέχει περίπου ίσα ποσοστά α-πινενίου, 1,8-κινεόλης και καμφοράς. Οι τέσσερις αυτοί τύποι εμφανίζουν διαφορετική χημική και φυσική σύσταση. Συγκεκριμένα έρευνες έχουν δείξει ότι ο χημειότυπος 1,8-κινεόλης εμφανίζει ποσοστά 1,8-κινεόλη πάνω από 40 %. και ο χημειότυπος καμφοράς περιέχει 41–53% καμφορά. Ο χημειότυπος α-πινενίου περιέχει 37–40% α-πινένιο (Sarkic et al 2018).

Όσο αφορά την χώρα προέλευσης ο χημειότυπος 1,8 κινεόλης συναντάται σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Τουρκία, η Τυνησία, το Μαρόκο, η Ιταλία και η Γαλλία και ο χημειότυπος ισόποσου α-πινενίου, καμφοράς και 1,8 κινεόλης συναντάται σε χώρες όπως η Γαλλία, η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα (al-Sereiti et al 1999).

Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στη βιβλιογραφία αιθέριου ελαίου πλούσιου σε βερμπενόνη και βορνεόλη που εμφανίζονται σε ποικιλίες στην Σαρδηνία ενώ στην Αργεντινή, τη Πορτογαλία και την Ισπανία εμφανίζεται αιθέριο έλαιο πλούσιο σε μυρκενίιο (Yu et al 2013).

Πίνακας 3.1 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την ποικιλία (Amin et al 2017)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %			
	Δενδρολίβανο α	Δενδρολίβανο β	Δενδρολίβανο γ	Δενδρολίβανο δ
<b>Α-πινένιο</b>	7.3	5.7	3.3	6.1
<b>Καμφήνιο</b>	-	5.4	-	0.2
<b>β-πινένιο</b>	6.9	0.7	2.5	4.2
<b>1,8-κινεόλη</b>	13.7	11.7	6.4	11.6
<b>γ-τερπινένιο</b>	-	-	-	-
<b>ρ-κυμενιο</b>	-	-	-	-
<b>Λιναλοόλη</b>	-	1.0	0.4	1.5
<b>Καμφορά</b>	38.6	53.4	34.3	28.2
<b>β-καρυοφυλλένιο</b>	0.2	0.6	0.4	1.0
<b>Τερπινεόλη</b>	0.7	0.7	0.8	1.5
<b>Βορνεόλη</b>	5.0	1.7	5.0	3.9

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζεται η σύσταση του αιθέριου ελαίου διαφορετικών δενδρολίβανων που αναπτύσσονται στην ίδια περιοχή (πεδιάδα Kashmir). Παρατηρείται ότι όλα τα φυτά ανήκουν στον χημειότυπο καμφοράς παρόλο που εμφανίζουν διαφορές στα συστατικά τους. Παρά το γεγονός ότι καλλιεργήθηκαν στην ίδια περιοχή και ανήκουν στον ίδιο χημειότυπο, τα φυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερη ποικιλομορφία. Είναι φανερό ότι η σύσταση του αιθέριου ελαίου επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων πέρα από την περιοχή συγκομιδής και το χημειότυπο του αιθέριου ελαίου.

### 3.2 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής

Πίνακας 3.2 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την περίοδο συγκομιδής (Parageorgiou et al 2008)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %					
	2005			2006		
	Φεβρουάριος	Μάιος	Αύγουστος	Φεβρουάριος	Μάιος	Αύγουστος
<b>Α-πινένιο</b>	3.3	4.0	3.2	3.2	3.4	3.8
<b>Καμφήνιο</b>	1.6	0.8	0.3	1.1	0.8	0.7
<b>β-πινένιο</b>	2.7	2.0	5.0	3.5	2.5	3.2
<b>1,8-κινεόλη</b>	46.0	47.9	52.9	52.5	58.9	56.9
<b>γ-τερπινένιο</b>	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
<b>ρ-κυμενιο</b>	0.6	1.0	0.4	0.8	0.4	0.4
<b>Λιναλοόλη</b>	0.2	0.3	1.5	-	-	1.4
<b>Καμφορά</b>	5.8	2.0	0.7	3.0	1.8	2.6
<b>β-καρυοφυλλένιο</b>	5.1	3.4	2.0	2.4	3.3	1.0
<b>Τερπινεόλη</b>	4.3	4.0	3.4	3.9	2.8	3.9
<b>Βορνεόλη</b>	0.8	0.3	0.1	0.9	0.1	0.9

<b>Απόδοση αιθέριο έλαιο(%) σε</b>	1.8	1.6	3.2	1.8	2.7	2.9
------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η εποχική διακύμανση των συστατικών δενδρολίβανου από την Ζάκυνθο. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό α-πινενίου, για το 2005, εμφανίζεται τον Μάιο, στο 4 %, ενώ για το 2006 τον Αύγουστο, στο 3.8 %. Το μεγαλύτερο ποσοστό της 1,8 κινεόλης εμφανίζεται, για το 2005 τον Αύγουστο, στο 52.9%, και για το 2006 τον Μάιο, στο 58.9 %. Επιπλέον, η καμφορά εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό τον Φεβρουάριο για το 2005 και για το 2006, στο 5.8 % και 3 %, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, από τον Πίνακα 3.2, γίνεται αντιληπτό ότι η περίοδος συγκομιδής του φυτού επηρεάζει έντονα τη σύσταση του φυτού σε καμφορά, ενώ επιφέρει μικρές αλλαγές στη σύστασή του σε α-πινένιο και σε 1,8-κινεόλη. Αναφορικά με την απόδοση σε αιθέριο έλαιο φαίνεται ότι ο χημειότυπος 1,8 κινεόλης εμφανίζει μια μείωση στην ποσότητα του από Φεβρουάριο στο Μάιο τη χρονιά 2005 ενώ το 2006 εμφανίζει αύξηση. Και τις δύο χρονιές η μεγαλύτερη ποσότητα του αιθέριου ελαίου συναντάται τον Αύγουστο.

Πίνακας 3.3 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την εποχή συγκομιδής (Melito et al 2019)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %			
	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο	Χειμώνας
<b>Α-πινένιο</b>	25.6	30.2	26.9	26.4
<b>Καμφήνιο</b>	7.4	7.6	7.7	7.5
<b>β-πινένιο</b>	3.1	1.8	0.8	0.8
<b>1,8-κινεόλη</b>	18.0	17.2	18.9	19.1
<b>γ-τερπινένιο</b>	0.5	0.7	0.2	0.2
<b>Λιναλόλη</b>	1.7	1.3	1.4	1.8
<b>Καμφορά</b>	4.9	7.6	11.3	8.7
<b>β-καρνοφυλλένιο</b>	-	-	-	-
<b>Τερπινεόλη</b>	1.7	1.5	1.6	1.7
<b>Βορνεόλη</b>	8.1	7.8	7.1	8.4
<b>Απόδοση αιθέριο έλαιο(%) σε</b>				
	0.82	0.87	0.74	0.68

Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η εποχική διαφοροποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου από τη Σαρδηνία. Συγκεκριμένα είναι φανερό ότι το δενδρολίβανο ανήκει στο χημειότυπο ισόποσου α-πινενίου και 1,8 κινεόλης. Το α-πινένιο εμφανίζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση του την άνοιξη και την μεγαλύτερη το καλοκαίρι. Η 1,8 κινεόλη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση τον χειμώνα και χαμηλότερη το καλοκαίρι. Επιπλέον το φθινόπωρο η ποσότητα της 1,8-κινεόλης αυξάνεται σε σχέση με τη άνοιξη. Η καμφορά παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της το φθινόπωρο και την χαμηλότερη την άνοιξη. Τέλος η ποσότητα του αιθέριου ελαίου αυξάνεται από την άνοιξη στο καλοκαίρι και το φθινόπωρο μειώνεται μέχρι που το χειμώνα φτάνει ελάχιστο.

Πίνακας 3.4 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την χρονιά συγκομιδής (Atti-Santos et al 2005)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %		
	1998	1999	2000
<b>Α-πινένιο</b>	40.55	45.10	41.63
<b>Καμφήνιο</b>	5.17	6.06	4.73
<b>β-πινένιο</b>	2.7	2.86	2.40
<b>1,8-κινεόλη</b>	17.40	17.59	19.35
<b>γ-τερπινένιο</b>	1.11	0.75	0.82
<b>Λιναλοόλη</b>	2.02	1.71	2.16
<b>Καμφορά</b>	2.13	1.63	2.42
<b>β-καρυοφυλλένιο</b>	2.80	2.11	2.16
<b>Τερπινεόλη</b>	0.75	0.51	0.70
<b>Βορνεόλη</b>	2.97	2.24	3.10
<b>Απόδοση σε αιθέριο έλαιο(%)</b>	0.49	0.37	0.45

Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζεται η διαφοροποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου, δενδρολίβανου χημειότυπου α-πινενίου, από την Νότια Βραζιλία. Είναι εμφανές ότι το α-πινένιο εμφανίζει μια διαφοροποίηση στο ποσοστό του ανάμεσα στις διαφορετικές χρονιές με το 1998 να έχει τα χαμηλότερα ποσοστά και το 1999 τα μεγαλύτερα. Όσο αφορά την 1,8 -κινεόλη και τη καμφορά φαίνεται ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση στις ποσότητες τους στις διαφορετικές χρονιές. Τέλος η απόδοση σε αιθέριο έλαιο εμφανίζει διαφοροποίηση μεταξύ των χρονιών.

### 3.4 Διαφοροποίηση συστατικών ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση

Πίνακας 3.5 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την γεωγραφική προέλευση (Salido et al 2003)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %			
	Las Chozuelas (Νότια Ισπανία)	El Vadillo-Castril (Νοτιοανατολική Ισπανία)	Garganta de Hornos (Κεντρική Ισπανία)	Peria del Olivar (Βόρεια Ισπανία)
<b>Α-πινένιο</b>	12.9	11.8	11.8	10.2
<b>Καμφήνιο</b>	7.5	8	6.2	6.1
<b>β-πινένιο</b>	3.8	7.5	4.6	4.6
<b>1,8-κινεόλη</b>	13.1	13.5	14.2	13.3
<b>γ-τερπινένιο</b>	0.7	0.7	0.7	0.6
<b>ρ-κυμενιο</b>	1	0.7	0.9	0.9
<b>Λιναλοόλη</b>	0.3	0.4	0.6	0.5
<b>Καμφορά</b>	27.4	35.3	27.2	32.7

<b>β-καρυοφυλλένιο</b>	3.7	3.6	5.1	4.1
<b>Τερπινεόλη</b>	1.4	1.4	2.5	1.5
<b>Βορνεόλη</b>	5	7.7	3.5	5.5

Στον πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η διαφορά στα συστατικά του αιθέριου ελαίου που προέρχεται από διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας. Το α-πινένιο εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του στην Garganta de Hornos, στην κεντρική Ισπανία και στην El Vadilo-Castril, στη νοτιοανατολική Ισπανία, ενώ τη χαμηλότερη στην Peria del Olivar, στην βόρεια Ισπανία με ποσοστό 10.2 %.

Η 1,8-κινεόλη παρουσιάζει τα μεγαλύτερα ποσοστά της στη κεντρική Ισπανία, στο 14.2% και τα χαμηλότερα στη Las Chozuelas, στη Νότια Ισπανία, στο 13.1% . Τέλος, η καμφορά εμφανίζει μεγάλη συγκέντρωση στη Νοτιοανατολική Ισπανία, στο 35.3% και τη χαμηλότερη συγκέντρωση, στο 27.2%, στη κεντρική Ισπανία. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η σύσταση του αιθέριου ελαίου επηρεάζεται ελάχιστα από την γεωγραφική προέλευσή του στην ίδια χώρα.

Πίνακας 3.6 Διαφοροποίηση συστατικών αιθέριου ελαίου με βάση την χώρα (Satyal et al 2017; Parageorgiyou et al 2008; Salido et al 2003)

Συστατικά αιθέριου ελαίου	Ποσοστό συστατικού %								
	Ινδία	Ελλάδα	Ισπανία	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	Νότια Αφρική	Κένυα	Αυστραλία	Νεπάλ	Υεμένη
<b>Α-πινένιο</b>	6.1	3.4	11.8	25.4	33.6	31.7	37.9	38.1	13.5
<b>Καμφήνιο</b>	0.2	0.8	6.2	2.5	7.6	2.6	4.6	4.6	1.5
<b>β-πινένιο</b>	4.2	2.5	4.6	1.4	2.3	2.1	3.0	2.8	1.0
<b>1,8-κινεόλη</b>	11.6	58.9	14.2	18.8	16.3	20.9	29.4	23.0	20.6
<b>γ-τερπινένιο</b>	-	0.2	0.7	1.0	0.4	1.0	0.8	1.2	0.1
<b>ρ-κυμενιο</b>	-	0.4	0.9	0.9	1.6	0.4	1.6	1.5	1.1
<b>Λιναλοόλη</b>	1.5	-	0.6	2.7	3.1	2.8	2.3	2.2	3.8
<b>Καμφορά</b>	28.2	1.8	27.2	2.4	0.7	2.1	1.7	1.7	7.0
<b>β-καρυοφυλλένιο</b>	1.0	3.3	5.1	0.6	2.5	0.7	1.3	1.4	1.2
<b>Τερπινεόλη</b>	1.5	2.8	2.5	2.9	1.0	2.6	0.9	1.5	3.2
<b>Βορνεόλη</b>	3.9	0.1	3.5	4.0	7.0	2.8	2.1	2.5	5.5

Στον πίνακα 2.6 παρουσιάζεται η διαφορά στην σύσταση του αιθέριου ελαίου με βάση την χώρα προέλευσης του φυτού. Το α-πινένιο εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό του 37.9 % στο Νεπάλ ενώ το χαμηλότερο 3.4 % στην Ελλάδα. Η 1,8-κινεόλη εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά της στην Ελλάδα στα 58.9 % και τα χαμηλότερα στην Ινδία στα 11.6 % ενώ η καμφορά εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό στην Ινδία στα 28.2 % και χαμηλότερο στην Αυστραλία και το Νεπάλ στα 1.7 % . Στον πίνακα 2.4 φαίνεται ότι η σύσταση του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου επηρεάζεται σημαντικά από την χώρα προέλευσης ειδικά αν βρίσκεται σε διαφορετική ήπειρο και με διαφορετικό κλίμα.

## 4. Φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου

### 4.1 Τα κύρια φαινολικά συστατικά του δενδρολίβανου και η ταξινόμησή τους σε ομάδες

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια κύρια ομάδα δευτεροταγών μεταβολιτών στα φυτά τα οποία είναι παράγωγα της πεντόζης, του φωσφορικού άλατος και των φαινυλπροπανοειδών οδών στα φυτά. Διακρίνονται στα φαινολικά οξέα, τα φαινολικά διτερπένια και τα φλαβονοειδή. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται συνδυασμένες με μόνο- και πολυσακχαρίτες, συνδεδεμένες με μια ή περισσότερες φαινολικές ομάδες ή μπορούν να εμφανιστούν ως παράγωγα, όπως εστέρες ή μεθυλεστέρες. Πολλές έρευνες έχουν δείξει μια δυνατή και θετική συσχέτιση ανάμεσα στα περιεχόμενα των φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτών. Αυτός ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός, που εμφανίζεται στα φυτά, έχει σημαντικό ρόλο στη μείωση της λιπιδικής οξείδωσης στους ιστούς, γιατί όταν συμπεριληφθεί στην ανθρώπινη διατροφή, όχι μόνο μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών αλλά βελτιώνει και την ποιότητα των τροφίμων (Minatel et al 2017). Επιπλέον, αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος φυσικών ιδιοτήτων, όπως αντι-αλλεργιογόνα, αντιθρομβωτικές, αντι-φλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (Balasundram et al 2006).

Πολλά βότανα και μπαχαρικά, όπως το δενδρολίβανο και το φασκόμηλο, που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* είναι εξαιρετικές πηγές φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν εμφανίσει έντονη αντιοξειδωτική δράση (Schwartz et al (1992)). Οι κύριες οικογένειες που βρίσκονται στο δενδρολίβανο είναι τα φαινολικά οξέα περιλαμβάνοντας το ροσμαρικό οξύ και το καφεϊκό οξύ, τα φαινολικά διτερπένια περιλαμβάνοντας το καρνοσικό οξύ, τη καρνοσόλη και τη ροσμανόλη, τα φλαβονοειδή όπως η γκεκουανίνη, η κισιμαριτίνη και η ομοπλανταγινίνη και τα φαινολικά τριτερπένια, όπως το ουρσολικό οξύ (Borrás-Linares et al 2014).

Η αντιοξειδωτικές δράσεις του δενδρολίβανου μπορούν να ταυτιστούν κυρίως με τις φαινολικές ενώσεις, ιδιαίτερα με τα φαινολικά διτερπένια και το ροσμαρινικό οξύ (Gerhart and Schröter, 1983; Capecka et al., 2005; Dorman et al., (2003); Erdemoglu et al., 2006). Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα του δενδρολίβανου προτάθηκαν ως σημαντικοί παράγοντες στη ανθρώπινη διατροφή και ερευνώνται ως προς τις θεραπευτικές τους ιδιότητες ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα ακετονικά εκχυλίσματα δενδρολίβανου, σε συσχέτιση με το περιεχόμενο του σε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, έδειξαν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια αλλά και σε μαγιά. Από την άλλη το υδατικό του εκχύλισμα που περιείχε κυρίως ροσμαρικό οξύ έδειξε χαμηλή αντιμικροβιακή δράση (Moreno et al 2006).

### 4.2 Φαινολικά οξέα

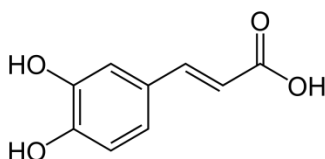
Τα φαινολικά οξέα είναι παράγωγα βενζοϊκών (υδροξυβενζοϊκά) και κινναμωμικών (υδροξυκινναμωμικά) οξέων και βρίσκονται στα φυτά. Αυτά τα οξέα εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και έτσι παρουσιάζουν πολλαπλές χρήσεις με σκοπό τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Οι Hahn et al. (1983) αναγνώρισαν ελεύθερα και συνδεδεμένα φαινολικά οξέα, τα οποία μπορούν να εκχυλιστούν σε οξυνημένη μεθανόλη. Ελεύθερα φαινολικά οξέα μπορούν να βρεθούν στα εξωτερικά στρώματα των πυρήνων, ενώ τα συνδεδεμένα φαινολικά οξέα βρίσκονται μέσα στα κυτταρικά

τοιχώματα. Το δενδρολίβανο περιέχει πολλά φαινολικά οξέα, όπως το ροσμαρινικό οξύ και το καφεϊκό οξύ .

### Καφεϊκό οξύ

Το καφεϊκό οξύ είναι μια οργανική ένωση που κατηγοριοποιείται ως υδροξυκιναμωμικό οξύ. Αυτό το κίτρινο στερεό, με σημείο ζέσεως στους 223 to 225 °C, αποτελείται από φαινολικές και ακρυλικές λειτουργικές ομάδες. Ανιχνεύεται σε όλα τα φυτά, γιατί είναι κομβικό μέσο για τη βιοσύνθεση της λιγνίνης, ένα από τα κυρία συστατικά των ξυλωδών φυτών (Boerjan et al 2003).

Το καφεϊκό οξύ είναι ένα αντιοξειδωτικό *in vitro* και *in vivo*. Επιπλέον, παρουσιάζει ανοσοτροποποιητική και αντιφλεγμονώδη δράση (Olthof et al 2001).

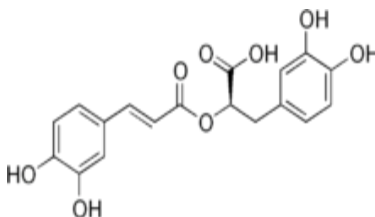


Εικόνα 4.1 Δομή καφεϊκού οξέος

### Ροσμαρινικό οξύ

Μια ιδιαίτερα σημαντική ένωση στα βότανα της οικογένειας Lamiaceae είναι το ροσμαρινικό οξύ, που παρουσιάζει υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό (Carccka et al. 2005), γεγονός που σχετίζεται με την παρουσία τεσσάρων ομάδων υδροξυλίου στο μόριο του (Houlihan et al., 1985). Το ροσμαρινικό οξύ είναι ένας εστέρας του καφεϊκού οξέος και του 3,4-διυδροχουφαινυλλακρικού οξέος. Συναντάται σε μορφή κοκκινο-πορτοκαλί σκόνης και είναι ελαφρά διαλυτό στο νερό και διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες

Η έντονα δραστική αντίδραση των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου με την ελεύθερη ρίζα DPPH οφείλεται κυρίως στο ροσμαρινικό οξύ το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων του δενδρολίβανου (Parageorgiou et al 2008). Πολλαπλές βιολογικές δράσεις του ροσμαρινικού οξέος έχουν περιγράψει όπως η αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική και η αντιμεταλλαξιγόνο δράση του. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι αυτή η ένωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός παράγοντας στη νόσο του Alzheimer (Moreno et al 2006).



Εικόνα 4.2 Δομή ροσμαρινικού οξέος



### 4.3 Φαινολικά Διτερπένια

Τα πρώτα φαινολικά διτερπένια που απομονώθηκαν ήταν το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη (Briekorn *et al.*, 1964; Linde, 1964), αλλά από τότε απομονώθηκαν και η ροσμανόλη (Inatani *et al.*, 1982; Nakatani and Inatani, 1983), η επιροσμανόλη και ισοροσμανόλη (Nakatani and Inatani, 1984), η ροσμαδιάλη (Nakatani and Inatani, 1983), ο καρνοσικός μεθυλεστέρας (Cuvelier *et al.*, 1994) και ο ροσμανολ-9-αιθυλαιθέρας (Djarmati *et al.*, 1991; Masa *et al.* 2007).

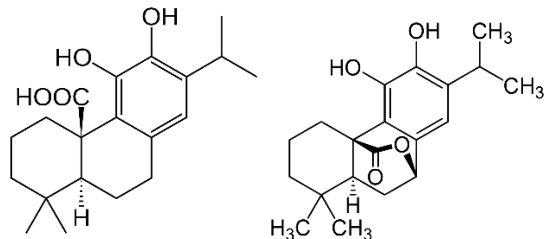
#### Καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη

Το καρνοσικό οξύ είναι ένα σημαντικό φαινολικό διτερπένιο το οποίο συναντάται στα φύλλα του δενδρολίβανου. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως η καρνοσόλη και η ροσμανόλη σχηματίζονται καθώς αυτό υπόκειται μια οξειδωτική υποβάθμιση και μια εκ νέου αναβάθμιση μέσα στο φυτό και *in vitro* (Wellwood *et al.* 2004).

Το καρνοσικό οξύ θεωρείται ιδιαίτερα ασταθές, καθώς μετατρέπεται σε καρνοσόλη όταν οξειδώνεται από τον αέρα, αλλά παρατηρείται ότι στα συστήματα των τροφίμων είναι ευσταθές. Η καρνοσόλη, από την άλλη, θεωρείται ο πρόδρομος των g- και d-λακτόνη PDAs, το οποία σχηματίζονται ύστερα από μια οξειδωτική διαδικασία (Wenkert *et al.*, 1965; Schwarz and Ternes, 1992).

Το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη έχει θεωρηθεί ότι ευθύνονται για πάνω από 90% της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου (Aguoma *et al.*, 1992), παρόλο που δεν έχει επιβεβαιωθεί συστηματικά. Αυτή η σημαντική συμβολή του καρνοσικού οξέος στην αντιοξειδωτική αντίδραση των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου οφείλεται πιθανόν στη μεγάλη αφθονία του καρνοσικού οξέος, σε σύγκριση με τα άλλα φαινολικά διτερπένια του φυτού. Κατά την οξείδωση, το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει διαφορετικές αντιοξειδωτικές δυνατότητες, οι οποίες εξαρτώνται από την λιπιδική σύνθεση του πλέγματος και από τις οξειδωτικές συνθήκες (Horia *et al.*, 1996, Huang *et al.*, 1996).

Πολλαπλές εφαρμογές στην υγεία έχουν αναπτυχθεί βασισμένες στα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του κυτοχρώματος, της προστασία της πρωτεΐνης α<sub>1</sub>-αντιπρωτεϊνάση από την απενεργοποίηση (Aguoma *et al.*, 1992) και τη φωτοπροστατευτική δραστηριότητα ενάντια στην UVA οξείδωση στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Offord *et al.*, 2002). Επιπλέον με το καρνοσικό οξύ από δενδρολίβανο έχουν ταυτιστεί και αντικαρκινικές δράσεις (Danilenko and Studzinski, 2004, Einbond *et al.*, 2012, Rajasekaran *et al.*, 2013, Tsai *et al.*, 2011 (Barni *et al.*, 2012, Costa *et al.*, 2007, Dickmann *et al.*, 2012, Einbond *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2007, Lopez-Jimenez *et al.*, 2013, Nakamura *et al.*, 2006, Ngo *et al.*, 2011, Sharabani *et al.*, 2006, Steiner *et al.*, 2001, Tsai *et al.*, 2011, Yesil-Celiktas *et al.*, 2010).



Εικόνα 4.3 Καρνοσικό οξύ Εικόνα 4.4 Καρνοσόλη

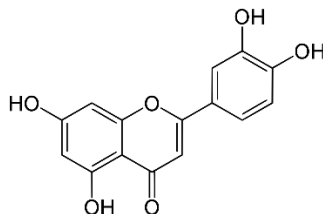
## 4.4 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα φυσικών ουσιών με ποικίλες φαινολικές δομές χαμηλού μοριακού βάρους, που συναντώνται σε φρούτα, λαχανικά, κορμούς, ρίζες, λουλούδια, τσάγια και κρασιά και αποτελούν μια από τις πιο χαρακτηριστικές ομάδες στα φυτά. Αυτά τα φυσικά προϊόντα είναι γνωστά για τις ευεργετικές ιδιότητές τους στην υγεία και έχουν γίνει προσπάθειες για την απομόνωσή τους. Τα φλαβονοειδή θεωρούνται σημαντικά με μια ποικιλία από θρεπτικές, φαρμακευτικές και καλλυντικές εφαρμογές. Αυτό οφείλεται στην αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμεταλλαξιγόνα και αντικαρκινογενική τους ικανότητα σε συνδυασμό με την δυνατότητα τους να ελέγχουν κομβικές κυτταρικές ενζυμικές δράσεις (Panche et al 2016). Επιπλέον συμμετέχουν σε μια ποικιλία βιολογικών δράσεων στα φυτά, στα ζώα και στα βακτήρια. Στα φυτά τα φλαβονοειδή συντίθενται σε συγκεκριμένα σημεία και είναι υπεύθυνα για το χρώμα και το άρωμα των ανθών, και στα φρούτα είναι υπεύθυνα για την προσέλκυση επικονιαστών και κατά συνέπεια τη διασπορά τους και την ανάπτυξη τους ενώ στα λαχανικά χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη. Τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά από διάφορες βιοτικές και αβιοτικές μορφές καταπόνησης και δρουν ως μοναδικά φίλτρα της ακτινοβολίας UV. Επιπροσθέτως, συμβάλλουν στην μικροβιακή προστασία και στην αντοχή του φυτού στο κρύο και την ξηρασία. Χωρίζονται σε διάφορες υποομάδες, οι οποίες περιέχουν τις χαλκόνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες και τις ισοφλαβονόλες. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με βάση τη θέση στο C δακτύλιο στην οποία συνδέεται ο B δακτύλιος, και με βάση το βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του C δακτυλίου. Ισοφλαβόνες ονομάζονται τα φλαβονοειδή στα οποία ο B δακτύλιος είναι συνδεδεμένος στην θέση 3 του C δακτυλίου ενώ τα φλαβονοειδή στα οποία ο B δακτύλιος συνδέεται στην θέση 4 ονομάζονται νεοφλαβονοειδή (Panche et al. 2016).

Γνωστά φλαβονοειδή στο δενδρολίβανο είναι η λουτεολίνη, η απιγενίνη καθώς και παράγωγά της όπως η γκενκουανίνη.

### Λουτεολίνη

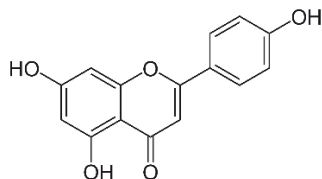
Η λουτεολίνη είναι ένα σύνθετος φλαβονοειδής που βρίσκεται σε αφθονία σε ποικίλα φυτικά προϊόντα, όπως το μπρόκολο, το δενδρολίβανο, το πιπέρι και το θυμάρι. Έχει κίτρινη κρυσταλλική εμφάνιση και είναι η κύρια ένωση της κίτρινης βαφής, που παραλαμβάνεται από το φυτό *Reseda luteola*, και χρησιμοποιείται από την πρώτη χιλιετία π.Χ. (Maan et al 1992). Έρευνες έχουν δείξει ότι η λουτεολίνη έχει αντιοξειδωτικές και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες και κατέχει ευεργετικές νευροπροστατευτικές εφαρμογές in vitro και in vivo .



Εικόνα 4.5 Δομή της Λουτεολίνης

## Απιγενίνη

Η απιγενίνη είναι μια φλαβόνη, η οποία συναντάται στα φρούτα και τα λαχανικά και από αυτή προέρχονται πολλοί φυσικοί γλυκοζίτες και φλαβόνες όπως η γκεκουανίνη. Έχει κίτρινη κρυσταλλική στερεά μορφή και έχει χρησιμοποιηθεί ως βαφή στο έριο. Η απιγενίνη έχει αναφερθεί σε έρευνες ότι εμφανίζει θετική επίδραση στον διαβήτη, την αμνησία και την ασθένεια Alzheimer, στην κατάθλιψη και την αυπνία καθώς και στον καρκίνο. (Salehi et al 2019)



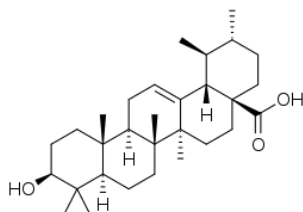
Εικόνα 4.6 Δομή της Απιγενίνης

## 4.5 Φαινολικά Τριτερπένια

Μια άλλη ομάδα υποσχόμενων δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών που βρίσκεται στο δενδρολίβανο είναι τα τριτερπένια τα οποία παρουσιάζουν σημαντική βιοδραστικότητα, ειδικά στη θεραπεία του καρκίνου, καθώς και άλλες δράσεις. Την τελευταία δεκαετία, πολλές έρευνες παρουσιάζουν άλλες δράσεις, οι οποίες δικαιολογούν αυτές τις προσδοκίες. Σε αυτές τις έρευνες τονίζονται ενώσεις όπως το ολεανολικό, βετουλινικό και ουρσολικό οξύ, τα οποία είναι πεντακυκλικά τριπτενοειδή με αντικαρκινική, αντιυπερλιπιδαιμική, υπατοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Borrás-Linares et al 2014).

### Ουρσολικό οξύ

Το ουρσολικό οξύ είναι ένα φυσικό τριτερπένιο, το οποίο συναντάται σε ποικίλα φυτά, φρούτα και λαχανικά, όπως το δενδρολίβανο, το θυμάρι και το μήλο. Υπάρχει αναπτυσσόμενο ενδιαφέρον για το ουρσολικό οξύ, λόγω των ευεργετικών δράσεων του, όπως η αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική του δράση. (Seo et al 2018)



Εικόνα 4.7 Δομή ουρσολικού οξέος

#### 4.6 Διαφοροποίηση φαινολικών συστατικών ανάλογα με την ποικιλία και την περίοδο συγκομιδής

Πίνακας 4.1 Διαφοροποίηση φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων με βάση την περίοδο συγκομιδής (Baydar et al 2009)

Φαινολικά Συστατικά	Συγκέντρωση συστατικών (mg g <sup>-1</sup> ξηρού φυτού)			
	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Σεπτέμβριος
Καφεϊκό οξύ	0.03	0.02	0.02	0.01
Βιτεξίνη	0	0.03	0.05	0
Ρουτίνη	0.07	0	0.05	0
Ναρινγίνη	0.10	0.09	0.08	0.13
Εσπεριδίνη	1.43	1.60	2.00	0.52
Απιγενίνη-7-γλυκοζίδιο	0	0	0.03	0
Ροσμαρινικό οξύ	4.10	6.05	10.37	7.26
Εριοδικτιόλη	0	0	0	0
Κερκετίνη	0.09	0.13	0.10	0.07
Ναρινγκενίνη	0.10	0.10	0.12	0.04
Γενιστίνη	0.01	0.02	0.02	0.01
Απιγενίνη	0.07	0.05	0.07	0.04
Ακεκετίνη	0.10	0.10	0.14	0.11
Λουτεολίνη	0.00	0.00	0.00	0.00

Στον Πίνακα 4.1 φαίνεται ότι η σύσταση του δενδρολίβανου σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή δεν είναι σταθερή ανά περίοδο συγκομιδής, καθώς υπάρχουν συστατικά των οποίων μειώνεται η ποσότητα, ενώ σε άλλα αυξάνεται. Παρόλα αυτά, οι αλλαγές στα περισσότερα συστατικά είναι ελάχιστες πλην του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο εμφανίζει μέγιστο τον Αύγουστο, στο 10.37 mg/g ξηρού φυτού και ελάχιστο στα 4.10 mg/g ξηρού φυτού τον Ιούνιο.

Πίνακας 4.2 Διαφοροποίηση φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων με βάση την περίοδο συγκομιδής ανά χρόνο (Parageorgiou et al 2008)

Φαινολικά Συστατικά	Συγκέντρωση συστατικών					
	2005			2006		
	Φεβρουάριος	Μάιος	Αύγουστος	Φεβρουάριος	Μάιος	Αύγουστος
Καφεϊκό οξύ <sup>a</sup>	1.5	0.8	1.65	0.85	0.4	1.3
Βανιλλικό οξύ <sup>a</sup>	5.4	-	0.3	1	-	1.5
p-κουμαρικό οξύ <sup>a</sup>	-	-	-	0.2	0.2	0.65
Φερουλλικό οξύ <sup>a</sup>	4.2	1.6	3.7	2.95	0.75	3.35
Ροσμαρινικό οξύ <sup>a</sup>	1.7	0.6	0.95	0.5	0.2	1.3
Κερκετίνη <sup>a</sup>	4.1	9.6	2.6	2.45	3.1	0.8

Ρουτίνη <sup>b</sup>	2.75	-	5.45	1.75	0.6	5.8
Λουτεολίνη <sup>b</sup>	1.45	2.75	1.10	2.2	3.8	1.15
Μη-αναγνωρισμένα φλαβονοειδή <sup>b</sup>	3.4	1.2	1.7	2.25	7.4	1.55
Μη-αναγνωρισμένα φαινολικά οξέα <sup>a</sup>	1.5	0.95	1.55	-	1	3.7
Συνολικές φαινόλες <sup>c</sup>	133.90	122.70	123.20	58.85	50.00	106.00

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>mg g-1 ξηρού φυτού, <sup>b</sup>mg ισοδύναμα κερκετίνης g-1 ξηρού φυτού, <sup>c</sup> mg GAE g-1 ξηρού φυτού

Ο πίνακας 4.2 παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με τον πίνακα 4.1 όσον αφορά τις αλλαγές στη συγκέντρωση των συστατικών ανά περίοδο συγκομιδής. Επιπλέον, παρατηρείται ότι από χρόνο σε χρόνο οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των συστατικών είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται στο ροσμαρινικό οξύ, το οποίο και τις δυο χρονιές παρουσιάζει μέγιστο ποσοστό τον Φεβρουάριο, στο 1.7 και 0.5 mg/g ξηρού φυτού το 2005 και 2006, αντίστοιχα και ελάχιστο τον Μάιο, στα 0.6 και 0.2 mg/g ξηρού φυτού το 2005 και 2006, αντίστοιχα. Επίσης παρατηρείται ότι στις συνολικές φαινόλες δεν υπάρχει σταθερή διακλυμανση στην ποσότητα τους στις δύο χρονιές, καθώς το 2005 εμφανίζεται μέγιστο τον Φεβρουάριο και ελάχιστο τον Μάιο, στο 133.90 και 122.70 mg/g ξηρού φυτού, αντίστοιχα, και το 2006 ελάχιστο τον Μάιο και μέγιστο τον Αύγουστο, στο 50.00 και 106.00 mg/g ξηρού φυτού αντίστοιχα. Τέλος, το 2005, εμφανίζει περισσότερες συνολικές φαινόλες από όλους τους μήνες του 2006.

Συγκρίνοντας τους δύο πίνακες (4.1,4.2), φαίνεται ότι, ανάλογα με την ποικιλία, το δενδρολίβανο παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στη σύστασή του όσον αφορά τα συνολικά φαινολικά συστατικά του. Συγκεκριμένα το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει αισθητή διαφορά μεταξύ των δύο ποικιλιών ενώ το καφεϊκό οξύ είναι μειωμένο στον πίνακα 4.1. Το ροσμαρινικό οξύ είναι παράγωγο του καφεϊκού οξέος (Zelic et al., 2005), και οι χαμηλές τιμές του πρώτου σε συνδυασμό με τις υψηλές τιμές του δεύτερου στον Πίνακα 4.2, μπορεί να οφείλονται σε διάσπαση.

Πίνακας 4.3 Ανάλυση των φαινολικών συστατικών του δενδρολίβανου (Mena et al, 2016)

Φαινολικά Συστατικά	Συγκέντρωση συστατικών
Καφεϊκό οξύ <sup>a</sup>	0.03
p-κουμαρικό οξύ <sup>b</sup>	0.01
4-hydroxybenzoic acid <sup>b</sup>	0.01
Ροσμαρινικό οξύ <sup>a</sup>	0.14
Απιγενίνη <sup>a</sup>	0.55
Λουτεολίνη <sup>a</sup>	0.14
Ομπολνταγινίνη <sup>c</sup>	0.12
Καρνοσικό οξύ <sup>a</sup>	128.00
Καρνοσόλη <sup>a</sup>	28.89

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg/L , <sup>b</sup> mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος/L, <sup>c</sup>mg ισοδύναμα απιγενίνης/ L

Στον πίνακα 4.3 φαίνεται ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι το επικρατέστερο φαινολικό οξύ και το καρνοσικό οξύ το επικρατέστερο φαινολικό διτερπένιο. Επιπλέον το καφεϊκό οξύ βρίσκεται σε παρόμοια συγκέντρωση με αυτή του δείγμα το πίνακα 4.1 και παρατηρείται ότι το φυτό μεγάλη ποικιλία φλαβονοειδων με την απιγενίνη να είναι σε αισθητά μεγαλύτερη ποσότητα.

Πίνακας 4.4 Εξάρτηση των φαινολικών συστατικών από την εποχή συγκομιδής (Yeddes et al 2019)

	Ροσμαρινικό οξύ <sup>a</sup>	Καρνοσικό οξύ <sup>a</sup>	Συνολικά φλαβονοειδή <sup>b</sup>	Συνολικά φαινολικά <sup>c</sup>
Χειμώνας	12.81	105.42	2.03	25.33
Άνοιξη	16.51	58.71	2.59	28.47
Καλοκαίρι	6.19	114.50	2.49	24.86
Φθινόπωρο	8.64	102.63	1.99	29.17

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>mg g<sup>-1</sup> ξηρού φυτού, <sup>b</sup> mg ισοδύναμα κερκετίνης g<sup>-1</sup> ξηρού φυτού, <sup>c</sup> mg GAE g<sup>-1</sup> ξηρού φυτού

Στον πίνακα 4.4 περιγράφεται η εποχική διακύμανση κύριων φαινολικών συστατικών του δενδρολίβανου. Συγκεκριμένα το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει τη μέγιστη συγκέντρωση του την άνοιξη και την χαμηλότερη το καλοκαίρι ενώ ο χειμώνας έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση από το φθινόπωρο. Το καρνοσικό οξύ, παρουσιάζει ακριβώς τα αντίστροφα αποτελέσματα με την άνοιξη να έχει τη χαμηλότερη και το καλοκαίρι τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Από την άλλη τα συνολικά φλαβονοειδή δεν εμφανίζουν πολύ μεγάλη διακύμανση στις τιμές τους, με το φθινόπωρο να εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή και την άνοιξη την υψηλότερη. Τέλος τα συνολικά φαινολικά παρουσιάζουν μέγιστο το φθινόπωρο και ελάχιστο το καλοκαίρι, ενώ η άνοιξη έχει παρόμοια συγκέντρωση με το φθινόπωρο και μεγαλύτερη από τον χειμώνα .

Πίνακας 4.5 Εξάρτηση του φαινολικού περιεχομένου από την εποχή και την περιοχή συγκομιδής (Yeddes, et al 2019; Papageorgiou et al 2008; Baydar et al 2009; Hadi et al 2018)

	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών (mg GAE g <sup>-1</sup> ξηρού φυτού)			
	Χειμώνας	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
Τυνησία	25.33	28.47	24.86	29.17
Ιράν	28.59	36.79	3.97	28.3
Τουρκία	-	4.10	10.37	7.26
Ελλάδα	58.85	50.00	106.00	-

Στον Πίνακα 4.5 περιγράφεται η εξάρτηση του φαινολικού περιεχομένου του δενδρολίβανου από την εποχή και από την χώρα συγκομιδής. Όσο αφορά την χώρα συγκομιδής η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιστοιχεί στο χειμώνα και το καλοκαίρι στο δενδρολίβανο της Ελλάδας, την άνοιξη και το φθινόπωρο στο δενδρολίβανο της Τουρκίας. Στην ποικιλία από το Ιράν η άνοιξη έχει το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο τη άνοιξη και το καλοκαίρι το χαμηλότερο, ενώ στην ποικιλία από την Τουρκία η άνοιξη έχει το χαμηλότερο φαινολικό περιεχόμενο και το φθινόπωρο το μεγαλύτερο. Τέλος η ποικιλία από την Ελλάδα εμφανίζει μειωμένη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών την άνοιξη και μεγαλύτερη το καλοκαίρι και η ποικιλία από την Τυνησία παρουσιάζει παραπλήσιες συγκεντρώσεις την άνοιξη και το φθινόπωρο ενώ το καλοκαίρι έχει την ελάχιστη συγκέντρωση της. Με εξαίρεση την ποικιλία από το Ιράν η άνοιξη παρουσιάζει μειωμένα ποσοστά φαινολικών συστατικών ενώ το φθινόπωρο αυξημένα.

Φαίνεται λοιπόν ότι η διαφορετικές ποικιλίες δενδρολίβανου εμφανίζουν διαφορετικές εποχικές διακυμάνσεις.

Πίνακας 4.6 Εξάρτηση του ροσμαρινικού οξέος από την εποχή και την περιοχή συγκομιδής (Yeddes et al 2019, Parageorgioly et al 2008, Baydar et al 2009 , Hadi et al 2018)

Ροσμαρινικό οξύ (mg g <sup>-1</sup> ξηρού φυτού)	Χειμώνας	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
Τυνησία	12.81	16.51	6.19	8.64
Τουρκία	-	94.29	99.37	101.39
Ελλάδα	1.7	0.6	0.95	-

Στον πίνακα 4.6 παρουσιάζεται η εποχική διακύμανση του ροσμαρινικού οξέος σε διάφορες ποικιλίες δενδρολίβανου. Όσο αφορά την εποχική διακύμανση στην ποικιλία της Τυνησία η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται την άνοιξη και η χαμηλότερη το καλοκαίρι. Αντίστοιχα στην ελληνική και την τούρκικη ποικιλία η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται την άνοιξη και η υψηλότερη στους χειμερινούς μήνες. Φαίνεται λοιπόν ότι η εποχική διακύμανση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος εξαρτάται από την χώρα συγκομιδής και την ποικιλία του δενδρολίβανου.

#### 4.7 Αντιοξειδωτική δράση

Η εκτίμηση των αντιοξειδωτικών εξαρτάται από τη μέτρηση της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή να παρεμποδίζουν την οξειδωση ενός πλούσιου σε λιπαρά υποστρώματος για να καθυστερούν την εμφάνιση της οξειδωτικής τάγγισης. Η οξειδωση των λιπιδίων χαρακτηρίζεται από τρία στάδια: έναρξη, σχηματισμός λιπιδικών ριζών, διάδοση μέσω υπεροξειδίων, σχηματισμός υδροπεροξειδίων και τερματισμός, κυρίως μέσω διάσπασης των υδροπεροξειδίων. Καθώς η αντιοξειδωση μπορεί να περιέχει ποικίλους πιθανούς δρόμους ή μεθόδους, ανάλογα με το οξειδωτικό μέσο, αντιοξειδωτικό και τη θερμοκρασία, ερευνητές έχουν τονίσει τη σημασία του προσδιορισμού της αναχαιτίησης σε παραπάνω από ένα στάδια και σε παραπάνω από ένα οξειδωμένο υπόστρωμα (Wellwood et al 2004).

Τα φυτά της Μεσογείου εκτίθενται σε ένα συνδυασμό από περιβαλλοντικές συνθήκες καταπόνησης, συμπεριλαμβανόμενων της χαμηλής διαθεσιμότητας νερού, της έντονης ηλιοφάνειας, των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας και της έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Τέτοιες καταπονήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε ανισορροπία μεταξύ των αντιοξειδωτικών άμυνών και το ποσό των, παγκόσμια καλούμενων ως, reactive oxygen species ROS, με αποτέλεσμα την οξειδωτική καταπόνηση. Κάποια φυτά παράγουν, ως απάντηση στην οξειδωτική καταπόνηση, το καρνοσικό οξύ, το οποίο εμφανίζει έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες in vitro και κατέχει σημαντικό ρόλο στην προστασία του χλωροπλάστη (Birtic et al 2015).

Όπως έχει αναφερθεί, τα πιο σημαντικά συστατικά του δενδρολίβανου, όσον αφορά την αντιοξειδωτική του δράση, είναι το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη, το καφεϊκό οξύ με τα παράγωγά του και το ροσμαρινικό οξύ. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων δενδρολίβανου εξαρτάται από το φαινολικό του περιεχόμενο. Στα λιπιδικά συστήματα, τα εκχυλίσματα με μεγαλύτερο περιεχόμενο σε φαινολικά

διτερπένια είναι πιο αποτελεσματικά (Horia et al 1996), ενώ σε υδατικά συστήματα, το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Frankel et al 1996).

Στη βιβλιογραφία η αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος αναφέρεται σε IC<sub>50</sub> (mg/L), EC<sub>50</sub> (mg/g DPPH), TEAC (mg TE/g) καθώς και AAEAC (mg AAE/g). Η σε IC<sub>50</sub> είναι η ανασταλτική συγκέντρωση, που ορίζεται ως η συγκέντρωση εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της συγκέντρωσης του DPPH ενώ η EC<sub>50</sub> είναι η αποτελεσματική συγκέντρωση, δηλαδή το ποσό του εκχυλίσματος σε σχέση με το ποσό του αρχικού DPPH και υπολογίζεται από τη σχέση  $EC_{50} = IC_{50} / [DPPH] = 0$ . Η TEAC είναι η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος με βάση το Trolox και μετρείται σε ισοδύναμα Trolox (TE). Το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) είναι ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E και είναι αντιοξειδωτικό το οποίο χρησιμοποιείται σε βιολογικές ή βιοχημικές εφαρμογές για την μείωση της οξειδωτικής καταπόνησης ή βλάβης. Η AAEAC είναι η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός εκχυλίσματος με βάση το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και μετρείται σε ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE).

Πίνακας 4.7 Διαφοροποίηση φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει της περιόδου συγκομιδής ( Baydar et al 2009)

	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Σεπτέμβριος
<b>Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο<sup>a</sup></b>	94.29	104.44	99.37	101.39
<b>Αντιοξειδωτική ικανότητα<sup>b</sup></b>	128.22	178.35	151.19	142.95

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>mg GAE/g εκχυλίσματος, <sup>b</sup>mg AAE/g εκχυλίσματος

Στον πίνακα 4.7 φαίνεται η συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Είναι εμφανές, από τον πίνακα, ότι τους μήνες που το φυτό έχει μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο εμφανίζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητά του. Συγκεκριμένα, το μέγιστο φαινολικό περιεχόμενο και η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται τον Ιούλιο, ενώ το ελάχιστο και αντίστοιχα η ελάχιστη εμφανίζονται τον Ιούνιο.

Πίνακας 4.8 Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης από την εποχή συγκομιδής και την χώρα συγκομιδής (Yeddes et al 2019)

Χώρα Συγκομιδής	Τυνησία		Τουρκία		Ελλάδα	
	Συνολικά φαινολικά <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>d</sup>	Συνολικά φαινολικά <sup>a</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>c</sup>	Συνολικά φαινολικά <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>d</sup>
<b>Χειμώνας</b>	25.33	8.00	-	-	133.90	3.5
<b>Άνοιξη</b>	28.47	10.84	94.29	128.22	122.70	3.6
<b>Καλοκαίρι</b>	24.86	7.27	99.37	151.19	123.20	4.3



<b>Φθινόπωρο</b>	29.17	9.19	101.39	142.95	-	-
------------------	-------	------	--------	--------	---	---

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>mg GAE/g εκχυλίσματος <sup>b</sup> mg GAE/g ξηρού φυτού , <sup>c</sup>mg AAE/g εκχυλίσματος , <sup>d</sup> IC<sub>50</sub> mg/L εκχυλίσματος

Στον πίνακα 4.9 περιγράφεται η επίδραση της εποχικής διακύμανσης του φαινολικού περιεχομένου στην αντιοξειδωτική δράση, δενδρολίβανου από διαφορετικές χώρες . Συγκεκριμένα στην Τυνησία η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση αντιστοιχεί στην συγκομιδή του καλοκαιριού και η χαμηλότερη στην συγκομιδή της άνοιξης, η οποία έχει και το χαμηλότερο φαινολικό περιεχόμενο. Το δενδρολίβανο από την Ελλάδα εμφανίζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική του δράση το καλοκαίρι και την χαμηλότερη τον χειμώνα, παρόλο που το καλοκαίρι έχει παρόμοιο φαινολικό περιεχόμενο με την άνοιξη. Από τον πίνακα 4.9 φαίνεται ότι υπάρχει μια συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική δράση αν και επηρεάζεται από την χώρα συγκομιδής και την ποικιλία του φυτού.

## 5. Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών

### 5.1 Απόσταξη αιθέριου ελαίου

#### 5.1.1 Υδρο-ατμοαπόσταξη

Η υδρο-ατμοαπόσταξη είναι μια παραδοσιακή μέθοδος εκχύλισης των αιθέριων ελαίων και βιοενεργών συστατικών. Η μέθοδος αυτή εμπεριέχει τρεις βασικές φυσικοχημικές διεργασίες, την υδρο-διάχυση, την υδρόλυση και τη διάσπαση με χρήση θερμοκρασίας. Κατά την μέθοδο αυτή, το στερεό υλικό τοποθετείται σε ένα βραστήρα όπου θερμαίνεται νερό. Το ζεστό νερό και ο ατμός δρουν ως τα κύρια μέσα για την απομάκρυνση των βιοενεργών ενώσεων από τη φυτική μήτρα. Το μίγμα ατμών ψύχεται, μέσω έμμεσης ψύξης, και το μίγμα συμπυκνώνεται και πραγματοποιείται φυσικά ο διαχωρισμός των αιθέριων ελαίων και του νερού. Καθώς η υδρο-ατμοαπόσταξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες του σημείου βρασμού του νερού, κάποια πτητικά συστατικά, και φυσικές χρωστικές, είναι πιθανό να χαθούν. (Aragamueang et al 2019) Επιπλέον, είναι σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου το γεγονός ότι δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών.

### 5.2 Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι μία διαδικασία διαχωρισμού μιας ουσίας από ένα μίγμα ή στερεό πλέγμα. Κοινά παραδείγματα εκχύλισης αποτελούν η εκχύλιση υγρού-υγρού και η εκχύλιση στερεής φάσης. Η κατανομή της ουσίας, ανάμεσα στις δύο φάσεις, είναι μια κατάσταση ισορροπίας που περιγράφεται από τη σχέση  $S_{aq} \rightarrow S_{org}$ , όπου  $S_{aq}$  είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην υδατική φάση και  $S_{org}$  η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην οργανική φάση. Αυτή η κατάσταση ισορροπίας βασίζεται στο πώς ακριβώς η αναλυόμενη ουσία κινείται από το αρχικό υγρό μίγμα ή από τη στερεή μήτρα στον διαλύτη της εκχύλισης. Η εκχύλιση υγρού-στερεού βρίσκεται στην πλειονότητα των εφαρμογών, ενώ η εκχύλιση υγρού-υγρού κατέχει δευτερεύοντα ρόλο. (Brennan et al 1976; McCabe et al 2001; Tzia et al 2003)

#### 5.2.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

##### 5.1.1.1 Εκχύλιση Υγρού-Στερεού (SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια μέθοδος εκχύλισης κατά την οποία, οι ενώσεις οι οποίες έχουν διαλυθεί σε ένα υγρό διάλυμα διαχωρίζονται από άλλες ενώσεις, με βάση τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των τροφίμων, η διεργασία της εκχύλισης είναι ιδιαίτερα πιο σύνθετη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το τρόφιμο είτε περιέχει από τη φύση του μια υγρή φάση είτε εμποτίζεται από τον διαλύτη, έτσι ώστε, η διάχυση της υγρής φάσης στο στερεό να καθορίζει τη μεταφορά μάζας στην όλη διεργασία. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για μια διεργασία μεταφοράς μάζας πολλών συστατικών, συχνά, μέσω περισσότερων από δύο διακριτών φάσεων, υπό μη μόνιμες συνθήκες.

Ο μηχανισμός της εκχύλισης στα τρόφιμα ακολουθεί μια σειρά από βήματα ως εξής: Αρχικά, εισέρχεται ο διαλύτης στη μήτρα του στερεού και διαλυτοποιείται το συστατικό. Στην συνέχεια, γίνεται μεταφορά του συστατικού προς το εξωτερικό της μήτρας και μεταφορά από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού, μέσω του στατικού υμένα που περιβάλλει το στερεό, προς τον κύριο όγκο του διαλύτη. Τέλος, πραγματοποιείται η μετακίνηση του συστατικού στον κύριο όγκο του διαλύτη και διαχωρίζεται το εκχύλισμα από το στερεό. Η εκχύλιση υποβοηθείται με ανάδευση (agitated extraction), ή μπορεί να γίνει χωρίς ανάδευση, με μεγάλους χρόνους παραμονής (maceration). (Brennan et al 1976; McCabe et al 2001; Tzia et al 2003)

Οι κύριοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση του δενδρολίβανου είναι η αιθανόλη, η ακετόνη, η μεθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό. Συχνά, χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών με νερό. (Borrás-Linares et al 2014)

#### 5.2.1.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για προπαρασκευαστικούς σκοπούς, στους οποίους ο αναλυτής συγκεντρώνεται από τη μήτρα ολόκληρος ή διαχωρίζεται από μια συγκεκριμένη ουσία. Η συμβατική εκχύλιση Soxhlet είναι μία από τις παλαιότερες τεχνικές εκχύλισης και παραμένει μία από τις πιο σχετικές τεχνικές στο πεδίο της περιβαλλοντικής εκχύλισης.

Η συσκευή Soxhlet σχεδιάστηκε το 1870 από τον Γερμανό χημικό Franz Ritter von Soxhlet. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό της κρέμας γάλακτος από στερεές πρωτεϊνικές δομές. Σήμερα, η τεχνική που σχεδίασε ο von Soxhlet χρησιμοποιείται στην εκχύλιση ενώσεων από στερεά προϊόντα, όπως τα φυτά. Οι περισσότεροι διαλύτες είναι κατάλληλοι για χρήση στη μέθοδο αυτή.

Ο μηχανισμός της εκχύλισης βασίζεται στις αρχές της συμβατικής εκχύλισης υγρού-στερεού. Αρχικά τοποθετείται στον πάτο της φύσιγγας ένα πορώδες πώμα, ώστε τα στερεά συστατικά να μην παρασύρονται, επιτρέποντας τον επιθυμητό διαχωρισμό των ενώσεων. Το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή και προστίθεται ένας συμπυκνωτήρας. Στη συνέχεια, θερμαίνεται ο διαλύτης και όταν φτάσει στο σημείο βρασμού, εισερχόμενος στην αέρια φάση, εισέρχεται στον συμπυκνωτήρα, όπου υγροποιείται και στάζει στη φύσιγγα, όπου πραγματοποιείται η εκχύλιση. Όταν ο όγκος του υγρού φτάσει στην κορυφή του σιφωνιού, η φύσιγγα ξεχειλίζει και το υγρό μεταφέρεται στο δοχείο θέρμανσης. Κάθε κύκλος διαλυτοποίησης-εκχύλισης απομακρύνει περισσότερες διαλυτές ενώσεις. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν ο διαλύτης στη φύσιγγα αποχρωματιστεί.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής Soxhlet είναι ότι μπορεί να επιτευχθεί μια πλήρης εκχύλιση, με ελάχιστη απώλεια διαλύτη και χωρίς την ανάγκη για επέμβαση στον εξοπλισμό, κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Τα κύρια μειονεκτήματα της είναι αφενός το γεγονός ότι είναι πολύ χρονοβόρα, καθώς μπορεί να απαιτείται έως και μια μέρα για την ολοκλήρωσή της, και αφετέρου ότι η υψηλή θερμοκρασία που απαιτείται μπορεί να προκαλέσει θερμική αποικοδόμηση των συστατικών. (Ridgway et al 2012).

### 5.2.2 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Βιοενεργές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά διτερπένια και τα φαινολικά τριτερπένια από φυτικές πηγές, έχουν παραδοσιακά εκχυλιστεί με τη συμβατική στερεού-υγρού εκχύλιση. Αυτή η τεχνική παρουσιάζει διάφορα μειονεκτήματα, κυρίως, το γεγονός ότι είναι μία επίπονη, χρονοβόρα διαδικασία, που απαιτεί υψηλή κατανάλωση διαλυτών και, σε κάποιες περιπτώσεις, παρέχει μικρή ανάκτηση. Για αυτόν τον λόγο, τα τελευταία χρόνια, νέες υποσχόμενες μέθοδοι εκχύλισης αναπτύσσονται. Συγκεκριμένα, οι πιο διαδεδομένες εναλλακτικές μέθοδοι είναι η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE), η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE), η εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF), η εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (PLE) και η εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE).

#### 5.2.2.1 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (MAE)

Η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία για την παραλαβή χρήσιμων ενώσεων από φυτά (Flórez et al., 2015; Adetunji et al., 2017). Τα μικροκύματα παράγουν απευθείας θερμότητα, ξεκινώντας μοριακές κινήσεις του νερού και τον ηλεκτρολυτών του φυτού, με αποτέλεσμα τα ακτινοβολημένα συστατικά να θερμαίνονται γρήγορα από το εσωτερικό. Επιπλέον, τα μικροκύματα ενισχύουν τη διάχυση των ενώσεων, με την απευθείας θέρμανση της βιομάζας από το εσωτερικό και διευκολύνουν τη μεταφορά μάζας από το εσωτερικό των φυτών στο διαλύτη (Flórez et al., 2015). Στη MAE δεν είναι απαραίτητη η χρήση διαλύτη, καθώς χρησιμοποιείται το νερό που υπάρχει φυσικά στα φυτικά συστατικά.

Η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE) αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική στη συμβατική εκχύλιση, καθώς βελτιώνει την ταχύτητα και την απόδοση της διεργασίας της εκχύλισης και μειώνει την κατανάλωση των διαλυτών. Η MAE έχει χρησιμοποιηθεί, επιτυχώς, για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από ποικίλα φυτικά υλικά και, στην περίπτωση του δενδρολίβανου, τα μικροκύματα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την απόσταξη του αιθέριου ελαίου, μέσω απόσταξης ατμού. (Borrás-Linares et al 2014).

#### 5.2.2.2 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE)

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων είναι μια ενδιαφέρουσα διεργασία για την ανάκτηση υψηλής αξίας ενώσεων και μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της αξίας κάποιων προϊόντων τροφίμων, όταν χρησιμοποιούνται ως πηγή φυσικών ενώσεων. Η UAE είναι μια καθαρή, πράσινη μέθοδος εκχύλισης ποικίλων μορίων και βιοσυστατικών, περιλαμβανομένων πολυσακχαριτών, αιθέριων ελαίων, πρωτεϊνών, πεπτιδίων, χρωστικών και βιοενεργών μορίων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο φαινόμενο της σπηλαίωσης. Κατά την διάδοσή τους στο φυτό, που περιέχει υγρά, οι υπέρηχοι σχηματίζουν πυκνώματα και αραιώματα, μέσω των οποίων προκαλείται το φαινόμενο της σπηλαίωσης, κατά το οποίο παράγονται

και εκτονώνονται φυσαλίδες, προκαλώντας διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Έτσι αυξάνεται η επιφάνεια επαφής και τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στη μήτρα διαλύονται και παρασύρονται από τον διαλύτη, με αποτέλεσμα τη γρήγορη μεταφορά μάζας.

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων είναι μια απλή, φθηνή και αποτελεσματική εναλλακτική τεχνική στις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης υπερήχων στην εκχύλιση στερεού-υγρού συμπεριλαμβάνουν πιο γρήγορες κινητικές, αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης και καλύτερη διείσδυση του διαλύτη. Επιπλέον, με τη χρήση των υπερήχων είναι δυνατή η μείωση της θερμοκρασίας λειτουργίας, επιτρέποντας την απόσταξη θερμοευαίσθητων ενώσεων και την ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας (Pacheco-Fernández et al 2020).

#### *5.2.2.3 Εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF)*

Η εκχύλιση με χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων είναι μια μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την προκατεργασία των φυτικών υλικών, καθώς τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία αυξάνουν τη διαπερατότητα των κυττάρων, διευκολύνοντας τη μεταφορά μάζας. Κατά τη μέθοδο αυτή, το υλικό τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια, τα οποία εφαρμόζουν τάση για μικρά χρονικά διαστήματα. Με την εφαρμογή του παλμικού φορτίου στα κύτταρα προκαλείται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα της μεμβράνης και με βάση τη διπολική φύση των ενώσεων, τα μόρια διαχωρίζονται πάνω στη μεμβράνη. Μετά την υπέρβαση της κρίσιμης τιμής του διαμεμβρανικού δυναμικού, τα μόρια με αντίθετα φορτία εγκαταλείπουν τη μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αδύναμων σημείων στη μεμβράνη, γεγονός που προκαλεί αύξηση στη διαπερατότητά της.

Τα πλεονεκτήματα της PEF είναι η αυξημένη απόδοση στην εκχύλιση, η μείωση στον χρόνο λειτουργίας και η αύξηση της καθαρότητας του εκχυλίσματος. Παράλληλα, η μέθοδος αυτή είναι μη-θερμική και επιτρέπει την παραλαβή θερμοευαίσθητων συστατικών και έχει χαμηλό ενεργειακό κόστος. Η εκχύλιση με τη χρήση παλμικών ηλεκτρικών πεδίων χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πηκτίνων και oligo- αλλά και πολυμοριακών ενώσεων. Εξάλλου, καθώς η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί την επιτάχυνση διαφόρων χημικών αντιδράσεων μεταξύ των συστατικών του εκχυλίσματος, η PEF φαίνεται να είναι κατάλληλη μέθοδος για την εκχύλιση καθαρής ξηρής μάζας, καροτενοειδών, βιταμινών, πρωτεϊνών, σακχαρόζης και ινουλίνης. (De la Guardia et al 2011).

#### *5.2.2.4 Εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό (PLE)*

Η εκχύλιση με χρήση συμπιεσμένου υγρού θεωρείται μια ανεπτυγμένη μέθοδος, λόγω των πλεονεκτημάτων της, σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Η PLE χρησιμοποιεί διαλύτη, σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, κάτω από τα κρίσιμα σημεία, ώστε ο διαλύτης να διατηρείται σε υγρή κατάσταση, καθ' όλη την εκχύλιση. Ως αποτέλεσμα των συγκεκριμένων συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης, προκαλείται αλλαγή στις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη. Για παράδειγμα, ενισχύεται ο ρυθμός μεταφοράς μάζας, ενώ, παράλληλα, μειώνεται η επιφανειακή τάση του διαλύτη και το ιξώδες του, και η διαλυτότητα των αναλυτών αυξάνεται. Αυτό επιτρέπει στον διαλύτη να διαπεράσει ευκολότερα και βαθύτερα στη στερεή μήτρα που εκχυλίζεται, με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Η αυξημένη πίεση προκαλεί την αύξηση της επιφάνειας επαφής του διαλύτη και του στερεού, ενώ, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, οι λιποπρωτεΐνες της μεμβράνης μετουσιώνονται, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης. (Hirondart et al 2020; Herrero et al 2010)

Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με τις συμβατικές, καθώς οδηγεί σε γρηγορότερες διεργασίες εκχύλισης και σε μειωμένη κατανάλωση διαλύτη. Επιπλέον, ο εξοπλισμός είναι αυτοματοποιημένος, επιτρέποντας την ανάπτυξη λιγότερο εργασιακά έντονων διεργασιών και την επαναληψιμότητα. Κατά την εκχύλιση με συμπιεσμένο υγρό, είναι δυνατή η χρήση μιας ευρείας ποικιλίας διαλυτών. Ο διαλύτης, συνήθως, επιλέγεται, με βάση τη φύση των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Ιδιαίτερη προτίμηση εμφανίζεται σε διαλύτες φιλικούς ως προς το περιβάλλον, όπως η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, το d-λιμονένιο, η ακετόνη και το νερό. (Alvarez-Rivera et al ,2020)

#### 5.2.2.5 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)

Τα συστήματα εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό εκχυλίζουν χημικές ενώσεις, χρησιμοποιώντας διοξείδιο του άνθρακα έναντι οργανικού διαλύτη. Η κατάσταση υπερκρίσιμου υγρού επιτυγχάνεται, όταν το υγρό βρίσκεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία του και την κρίσιμη πίεση, όταν είναι μεταξύ της τυπικής αέριας και υγρής κατάστασης. Το υπερκρίσιμο υγρό έχει ιδιότητες και του υγρού και του αέριου. Για παράδειγμα, το ιξώδες του είναι παρόμοιο με του αέριου, ενώ η πυκνότητα του είναι κοντά στην τιμή του υγρού. Επιπλέον, οι τιμές της διάχυσης βρίσκονται ανάμεσα σε αυτές του υγρού και του αέριου. Οι αλλαγές στη θερμοκρασία και την πίεση, πέρα των κρίσιμων σημείων, επίσης, επηρεάζουν, κυρίως, την πυκνότητα, αλλάζοντας τις διαλυτικές δυνατότητες του υγρού, επιτρέποντας έναν υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας. Με έλεγχο της θερμοκρασίας και της πίεσης του ρευστού, διαλυτοποιούνται και εκχυλίζονται οι επιθυμητές ενώσεις. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο υγρό στην SFE, καθώς είναι χημικά αδρανές, με χαμηλή τοξικότητα και η κρίσιμη θερμοκρασία του είναι 31 °C και η κρίσιμη πίεση του 74 bar. Επίσης, το CO<sub>2</sub> είναι μη εύφλεκτο, με ικανοποιητική διαλυτική ικανότητα και διαθεσιμότητα, σε καθαρή μορφή. Κάποιες φορές, το διοξείδιο του άνθρακα συνοδεύεται με άλλους διαλύτες, όπως η αιθανόλη ή η μεθανόλη, για την ενίσχυση της πολικότητας του CO<sub>2</sub>. (Sánchez-Camargo et al 2014)

Σε ένα σύστημα εκχύλισης με υπερκρίσιμο υγρό, το δείγμα τοποθετείται σε ένα εκχυλιστικό σκεύος και συμπιέζεται με CO<sub>2</sub>, ώστε να διαλυτοποιηθεί μέρος των συστατικών. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε κλασματικό συλλέκτη, όπου εκτονώνεται και το CO<sub>2</sub> χάνει τη διαλυτική του ικανότητα, με αποτέλεσμα το επιθυμητό υλικό να καταβυθίζεται. Το CO<sub>2</sub> δύναται να ανακυκλωθεί.

Η SFE παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Έχει βελτιωμένη εκλεκτικότητα, υψηλότερες αποδόσεις, καλύτερες δυνατότητες κλασμάτωσης και χαμηλότερη επίδραση στο περιβάλλον.

### 5.3 Διαφοροποίηση συστατικών με βάση τη μέθοδο εκχύλισης

Πίνακας 5.1 Διαφοροποίηση του φαινολικού περιεχόμενου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας στις μεθόδους PLE και SFE (Herrero et al 2010)

Μέθοδος εκχύλισης	Είδος Διαλύτη	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο <sup>a</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>b</sup>
PLE			
	Αιθανόλη	0.078	11.4
	Νερό	0.157	6.4

SFE			
	CO <sub>2</sub>	0.123	12.1
	CO <sub>2</sub> +7% αιθανόλη	0.121	8.1

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg GAE/mg εκχυλίσματος <sup>b</sup> EC<sub>50</sub>(μg/mL)

Στον πίνακα 5.1, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά εμφανίζεται με τη μέθοδο PLE, μόνο όταν χρησιμοποιείται το νερό ως διαλύτης, καθώς, αντίστοιχα, η μικρότερη συγκέντρωση εμφανίζεται στην μέθοδο PLE, όταν η αιθανόλη δρα ως διαλύτης. Η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα αντιστοιχεί στο δείγμα της μεθόδου PLE, όπου το νερό χρησιμοποιείται ως διαλύτης, ενώ η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται στο δείγμα της μεθόδου SFE, που χρησιμοποιεί ως διαλύτη καθαρό CO<sub>2</sub>.

Στην μέθοδο PLE, παρατηρείται έντονη διαφορά στο φαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος, ανάλογα με το διαλύτη, όπου η μικρότερη συγκέντρωση εμφανίζεται στην αιθανόλη. Το ίδιο ισχύει με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Στη μέθοδο SFE, το φαινολικό περιεχόμενο φαίνεται να μην επηρεάζεται από το διαλύτη, αλλά η αντιοξειδωτική ικανότητα διαφέρει σημαντικά και εμφανίζεται μεγαλύτερη τιμή όταν χρησιμοποιείται CO<sub>2</sub> σε συνδυασμό με 7% αιθανόλη.

Πίνακας 5.2 Διαφοροποίηση συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση των μεθόδων συμβατικής εκχύλισης, UAE και PEF (Ψαρρού 2019)

Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση συστατικών (mg/g ξηρού φυτού)		
	Ροσμαρινικό οξύ <sup>a</sup>	Φαινολικό Περιεχόμενο <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική δράση <sup>c</sup>
Μηχανική ανάδευση	10.0	59.3	1196
UAE	14.1	67.5	1890
PEF	-	64	1746

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg/g εκχυλίσματος <sup>b</sup> mg GAE/g εκχυλίσματος <sup>c</sup> mg GAE/L εκχυλίσματος

Στον πίνακα 5.2 περιγράφονται οι διαφοροποιήσεις των συγκεντρώσεων και της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών δενδρολίβανου από την Ελλάδα με βάση την μέθοδο εκχύλισης του. Φαίνεται λοιπόν ότι η συμβατική εκχύλιση εμφανίζει την χαμηλότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών και τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση ενώ η εκχύλιση με την χρήση υπερήχων εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών και την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Η μέθοδος PEF παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Πίνακας 5.3 Διαφοροποίηση συγκεντρώσεων ροσμαρινικού οξέος, καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης στις μεθόδους Soxhlet και PLE (Hirondart et al 2020)

Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση συστατικών (mg/g ξηρού φυτού)		
	Ροσμαρινικό οξύ	Καρνοσικό οξύ	Καρνοσόλη

<b>Soxhlet</b>	9.86	17.68	4.39
<b>PLE</b>	10.01	21.13	1.86

Τα δείγματα στον πίνακα 5.3 συλλέχθηκαν από το Μαρόκο το 2015. Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση για το ροσμαρινικό οξύ και το καρνοσικό εμφανίζεται με τη μέθοδο PLE, ενώ η καρνοσόλη εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση με τη μέθοδο Soxhlet. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πιθανό να οφείλονται στο γεγονός ότι στην Soxhlet το καρνοσικό και το ροσμαρινικό οξύ δέχονται θερμική διάσπαση, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσής τους στο εκχύλισμα.

Πίνακας 5.4 Διαφοροποίηση συγκεντρώσεων των φαινολικών διτερπενίων στις μεθόδους Soxhlet , UAE και SFE (Bicchi et al 2000)

Μέθοδος εκχύλισης	Ποσοστό συστατικού (%)	
	Καρνοσικό οξύ	Καρνοσόλη
<b>Soxhlet</b>	0.23	0.018
<b>UAE</b>	0.20	0.015
<b>SFE</b>	0.28	0.029

Στον Πίνακα 5.4, παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών διτερπενίων συλλέχθηκε με τη μέθοδο SFE, ενώ το χαμηλότερο με την μέθοδο UAE. Επίσης, καθώς η καρνοσόλη είναι παράγωγο του καρνοσικού οξέος, φαίνεται ότι η SFE είναι πιο αδρανής από την παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης. (Bicchi et al 2000)

## 5.4 Είδος διαλύτη

Στις εκχυλίσεις φυτικών προϊόντων χρησιμοποιούνται διάφορα είδη διαλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι σημαντική, καθώς ο τύπος του διαλύτη επηρεάζει τη συγκέντρωση και το είδος των εκχυλιζόμενων συστατικών και μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμισή τους. Ο διαλύτης πρέπει να έχει χαμηλή τοξικότητα, να μην είναι εύφλεκτος, να είναι εκλεκτικός, ώστε να μην παρασύρονται μη επιθυμητά συστατικά και να έχει χαμηλό κόστος. Επιπλέον ο διαλύτης χρειάζεται να έχει χαμηλό ιξώδες και να επιτυγχάνει γρήγορη μεταφορά μάζας, ώστε να διεισδύει εύκολα στην φυτική μήτρα. Όσον αφορά τα επιθυμητά συστατικά, είναι απαραίτητο ο διαλύτης να μπορεί να τα διαλύει αλλά και να έχει χαμηλό σημείο βρασμού, ώστε να διαχωρίζεται εύκολα από αυτά.

Σημαντικός παράγοντας στην επιλογή κατάλληλου είδους διαλύτη για την εκχύλιση, είναι η πολικότητα. Για πολικά συστατικά, προτιμώνται πολικοί διαλύτες, ενώ για μη πολικά συστατικά οι μη πολικοί. Οι κύριοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το νερό, η αιθανόλη, η ακετόνη και η μεθανόλη. Στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί και η χρήση διαιθυλαιθέρα, χλωροφορμίου και πετρελαϊκού αιθέρα αλλά και μίγματα οργανικών διαλυτών με το νερό ( Zheng et al 2019; Herrero et al 2010).

Πίνακας 5.5 Διαφοροποίηση φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει του διαλύτη εκχύλισης σε δενδρολίβανο από την Αργεντινή. (Moreno et al 2006)

	Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος <sup>a</sup>	Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος <sup>a</sup>	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>c</sup>
<b>Ακετόνη</b>	40	215	190	18
<b>Μεθανόλη</b>	55	162	120	25.6

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg/g εκχυλίσματος <sup>b</sup> mg GAE/g εκχυλίσματος <sup>c</sup> EC<sub>50</sub> μg/L εκχυλίσματος

Πίνακας 5.6 Διαφοροποίηση φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει του διαλύτη εκχύλισης σε δενδρολίβανο από την Ισπανία. (Rodríguez-Rojo et al 2012)

	Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος <sup>a</sup>	Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος <sup>a</sup>	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>c</sup>
<b>Αιθανόλη</b>	0.7	2.11	2.6	45
<b>Νερό</b>	6.5	-	7.7	17

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg/g εκχυλίσματος <sup>b</sup> mg GAE/g εκχυλίσματος <sup>c</sup> EC<sub>50</sub> μg/L εκχυλίσματος

Στον Πίνακα 5.5, παρουσιάζεται η ανάκτηση του φαινολικού περιεχομένου του δενδρολίβανου και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση. Παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο και η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται στην ακετόνη. Στον πίνακα 5.6 φαίνεται ότι το νερό εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την αιθανόλη.

Πίνακας 5.7 Διαφοροποίηση φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει του διαλύτη εκχύλισης σε δενδρολίβανο από την Ελλάδα (Ψαρρού 2019)

	Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος <sup>a</sup>	Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος <sup>a</sup>	Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο <sup>b</sup>	Αντιοξειδωτική ικανότητα <sup>c</sup>
<b>Αιθανόλη</b>	2.2	18.4	27.4	619
<b>Ακετόνη</b>	8.8	37.0	16.0	568
<b>Νερό</b>	15.1	-	39.3	1022

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup> mg/g εκχυλίσματος <sup>b</sup> mg GAE/g εκχυλίσματος <sup>c</sup> mg GAE/L εκχυλίσματος

Στον Πίνακα 5.7 παρουσιάζεται η διαφοροποίηση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής δράσης δενδρολίβανου από το Κιλκίς της Ελλάδας, με βάση τους διαφορετικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση του. Παρατηρείται ότι όσο αφορά το ροσμαρινικό οξύ η μεγαλύτερη συγκέντρωσή του εκχυλίζεται με τη χρήση νερού ως διαλύτη ενώ η χαμηλότερη με τη χρήση αιθανόλης. Αναφορικά με το καρνοσικό οξύ φαίνεται ότι με το νερό το καρνοσικό οξύ εκχυλίζεται σε ίχνη ενώ η μεγαλύτερη του ποσότητα εκχυλίζεται με την ακετόνη. Επιπλέον φαίνεται ότι με τη χρήση του νερού ως διαλύτη εκχυλίζεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών και παρουσιάζεται η υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα του ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών και η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα αντιστοιχεί στα εκχυλίσματα της ακετόνης.



## 6. Πειραματικό μέρος

### 6.1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των βιοδραστικών συστατικών των διαφορετικών ποικιλιών δενδρολίβανου, ώστε να προσδιορισθούν οι καταλληλότερες συνθήκες για καλλιέργεια και αξιοποίηση. Επιπρόσθετα, στόχο αποτελεί η μελέτη της μορφοποίησης των βιοδραστικών συστατικών σε μικροκάψουλες, προκειμένου να παρασκευασθούν έτοιμα προς χρήση προϊόντα για τρόφιμα ή καλλυντικά. Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε στην εργασία ήταν η διαφοροποίηση των φαινολικών συστατικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δενδρολίβανου, με βάση την περίοδο συγκομιδής. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποικιλίες δενδρολίβανου αλλά και ίδιες ποικιλίες, οι οποίες είχαν συλλεχθεί κατά την χρονιά 2017 και κατά την άνοιξη και το φθινόπωρο του 2019.

Αρχικά, το δενδρολίβανο υπέστη υδροατμο-απόσταξη για τον διαχωρισμό του αιθέριου ελαίου του. Προτιμήθηκε η υδροατμο-απόσταξη, καθώς το δενδρολίβανο τοποθετείται σε πλέγμα μέσα στη συσκευή και δεν έρχεται σε επαφή με το νερό, με αποτέλεσμα την αποφυγή εκχύλισης των φαινολικών συστατικών, κατά τον διαχωρισμό του αιθέριου ελαίου. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου, το ανθόνερο, δηλαδή οι υγροποιημένοι ατμοί της απόσταξης που περιέχουν ίχνη των συστατικών του αιθέριου ελαίου, και τέλος το αφέψημα, δηλαδή το υπόλειμμα του νερού που παρέμεινε στη συσκευή και ελάχιστο μέρος της φυτομάζας που έχει εκχυλιστεί σε αυτό, με αποτέλεσμα την παρουσία ιχνών φαινολικών συστατικών. Το αιθέριο έλαιο και το ανθόνερο αναλύθηκαν για την ταυτοποίηση των συστατικών του με GC-MS.

Το δενδρολίβανο μετά την υδροατμο-απόσταξη ξηράθηκε και εκχυλίστηκε σε εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης, με ακετόνη και στη συνέχεια με νερό μέχρι αποχρωματισμό του υδατικού εκχυλίσματος. Στόχος ήταν να διαχωρισθούν και να ταυτοποιηθούν καλύτερα τα συστατικά του. Στο ακετονικό εκχύλισμα περιέχονται, κυρίως, τα φαινολικά διτερπένια, όπως το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη αλλά και φαινολικά οξέα, κυρίως το ροσμαρινικό οξύ, και φλαβονοειδή σε μικρές ποσότητες. Το υδατικό εκχύλισμα και το αφέψημα αποτελούνται κυρίως από φαινολικά οξέα, ειδικά το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή αλλά και σε μικρές συγκεντρώσεις από καρνοσικό οξύ.

Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν ως προς το φαινολικό τους περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο DPPH. Επιπλέον, στα εκχυλίσματα ταυτοποιήθηκαν τα συστατικά τους με τη χρήση της μεθόδου HPLC.

Τέλος, επιλέχθηκε ένα από τα υδατικά εκχυλίσματα και υπέστη ενθυλάκωση σε φορέα μαλτοδεξτρίνης και αραβικού κόμμεος με ξήρανση με ψεκασμό, ώστε να αποκτήσει τη μορφή κόνεως για την προστασία των δραστικών συστατικών. Τα δείγματα που παραλήφθηκαν και αναλύθηκαν στην HPLC.

### 6.2 Πρώτες ύλες, αντιδραστήρια και συσκευές

#### 6.2.1 Πρώτες ύλες

Στην παρούσα εργασία η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε είναι αποξηραμένο δενδρολίβανο που έχει καλλιεργηθεί, σε διαφορετικές χρονιές και περιόδους, στη Θεσσαλονίκη στο Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων του ΕΛΓΟ “Δήμητρα”. Τα χαρακτηριστικά του φαίνονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Χαρακτηριστικά δειγμάτων δενδρολίβανου

ID	Χρονιά καλλιέργειας	Περίοδος Συγκομιδής	Μάζα (g)
A <sub>A2017</sub>	2017	Μάιος	727.76
B <sub>A2017</sub>	2017	Μάιος	751.16
B <sub>A2019</sub>	2019	Μάιος	745.46
B <sub>Φ2019</sub>	2019	Οκτώβριος	724.50
C <sub>A2019</sub>	2019	Μάιος	715.00
C <sub>Φ2019</sub>	2019	Οκτώβριος	717.00

### 6.2.2 Αντιδραστήρια

Για τις εκχυλίσεις του δενδρολίβανου χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες ακετόνη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και απιονισμένο νερό. Για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) και ανθρακικό νάτριο (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri) και για την καμπύλη αναφοράς έγινε χρήση γαλλικού οξέος 98% w/w (Aros Organics, Fair Lawn, New Jersey). Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα DPPH ή 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), ενώ για την καμπύλη αναφοράς έγινε χρήση του ίδιου αντιδραστηρίου, γαλλικό οξύ, με την καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των φαινολικών. Τέλος, για τις χρωματογραφικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν νερό, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και τριφθοροξικό οξύ ποιότητας HPLC και βαθμού MS (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς εγκλεισμού, ήταν η μαλτοδεξτρίνη (Astron Chemicals SA, maltodextrin, MD, 18-20DE) και το αραβικό κόμμι (Nexira Food France, Arabic gum, GA), τα οποία προσφέρθηκαν από τη ΒΙΟΡΥΛ Α.Ε..

### 6.2.3 Συσκευές

Η απόσταξη του αιθέριου ελαίου από το δενδρολίβανο πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, σε πιλοτικής κλίμακας συσκευή, αποτελούμενη από χάλκινο καζάνι 17 L (Χαλκός, Θεσσαλονίκη).

Για την κατάτμηση της φυτόμαζας του απεσταγμένου δενδρολίβανου, χρησιμοποιήθηκε οικιακό blender Kenwood Chef A701A (England).

Η ξήρανση των φρέσκων βελών δενδρολίβανου, πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό φούρνο κυκλοφορίας αέρα Binder BD 400 (Tuttlingen, Germany).

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών, καθώς και οι δοκιμές DPPH έγιναν με χρήση του φασματοφωτόμετρου HITACHI U2900 (Tokyo, Japan).

Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ανοξειδωτού εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης, χωρητικότητας 50 mL. Ο εκχυλιστήρας ήταν συνδεδεμένος με περισταλτική αντλία.

Οι χρωματογραφικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC πραγματοποιήθηκαν σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης, ο οποίος αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλουσης HP 1100 και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett-Packard, Waldborn, Germany), συνδεδεμένο με στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 μm, 250 x 4.6 mm, Agilent, USA). Για τις φασματομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Hitachi U29000.

Η ομογενοποίηση των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (UnidriveX 1000, CAT).

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα HP 6890 GC (plus +) συνδεδεμένο με HP 5973 ανιχνευτή μάζας (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), και εξοπλισμένο με HP-5 MS στήλη (30m×20 μm×0.25 μm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

### 6.3 Πειραματικές τεχνικές

#### 5.3.1 Υδροατμο-απόσταξη και απομάκρυνση αιθέριου ελαίου

Αρχικά τοποθετούνται στη συσκευή απόσταξης 4 L απιονισμένου νερού και σε πλέγμα εντός της συσκευής περίπου 750 g δενδρολίβανου, αφού αφαιρεθούν όποια κλαδιά υπάρχουν. Στη συνέχεια, συνδέεται το θερμόμετρο και ο μηχανισμός συλλογής του αιθέριου ελαίου και του ανθόνερου με την συσκευή απόσταξης και θερμαίνεται το νερό. Η θερμοκρασία παρακολουθείται μέχρι να σταθεροποιηθεί. Ως σημείο έναρξης της απόσταξης θεωρούμε τη στιγμή που εμφανίζεται η πρώτη σταγόνα ανθόνερου. Η συλλογή του ανθόνερου γίνεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL. Σε όλη τη διάρκεια της απόσταξης χρονομετρείται και σημειώνεται ο ρυθμός της. Όταν σε τρεις (3) συνεχόμενες μετρήσεις των 20 λεπτών η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που αποστάχθηκε σε εκείνο το χρονικό διάστημα παραμένει σταθερή στα 0.1 mL, η απόσταξη τερματίζεται. Το αιθέριο έλαιο συλλέγεται και το δενδρολίβανο ξηραίνεται στους 40 °C για 24 ώρες. Η συσκευή συλλογής δεν αποσυναρμολογείται για 24 ώρες και σε αυτή συλλέγονται και οι τελευταίες σταγόνες του αιθέριου ελαίου.

#### 6.3.2 Εκχύλιση σταθερής κλίνης

Το δενδρολίβανο, αφού απομακρυνθεί η υγρασία, ζυγίζεται και 30 g δενδρολίβανου αλέθονται σε οικιακό blender Kenwood Chef A701A (England). Στη συνέχεια, ζεύγη των 5 g ξηραίνονται σε φούρνο για 24 ώρες, για τον προσδιορισμό της υγρασίας και 20 g δενδρολίβανου τοποθετούνται σε εκχυλιστήρα ,όγκου 50 mL, συνδεδεμένο, μέσω σωλήνων ,όγκου 20 mL, με περισταλτική αντλία. Η αντλία συνδέθηκε με ογκομετρικό κύλινδρο που περιείχε 250 mL ακετόνης με 200 μL ορθοφωσφορικού οξέος και ρυθμίστηκε σε μέσο ρυθμό ροής 2.5 mL/min. Η διαβίβαση του διαλύτη στον εκχυλιστήρα έγινε από το κάτω σημείο του και το εκχύλισμα παρελήφθη από την πάνω εκροή. Το εκχύλισμα ογκομετρήθηκε και συλλέχθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε απιονισμένο νερό ως διαλύτης σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250 mL και με σταθερό ρυθμό επαναλήφθηκε η προηγούμενη διαδικασία.

#### 6.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών-Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu , που χρησιμοποιήθηκε στην διάρκεια της παρούσας εργασίας, είναι μια μέθοδος προσδιορισμού φαινολικών συστατικών. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι μεταφέρονται ηλεκτρόνια από τα φαινολικά συστατικά προς συμπλέγματα φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος, παρουσία αλκαλικού περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλοκών μπλε χρώματος. Η ανίχνευση αυτών των συμπλοκών γίνεται φωτομετρικά στα 765 nm. Για τη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος, πραγματοποιείται προσθήκη ανθρακικού νατρίου.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων αραιώνονται τα δείγματα σε ζεύγη ογκομετρικών φιαλών ,των 10 mL, με αιθανόλη στην περίπτωση των ακετονικών εκχυλισμάτων και απιονισμένο νερό στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων και του αφεψήματος. Έπειτα, 100 μL του αραιωμένου δείγματος προστίθενται σε 7.9 mL απιονισμένου νερού, 500 μL αντιδραστηρίου Folin και 1500 μL κορεσμένου ανθρακικού νατρίου σε ζεύγη δοκιμαστικών σωλήνων. Σε

κάθε μέτρηση, ετοιμάστηκε ένα τυφλό δείγμα στο οποίο, αντί για δείγμα, προστέθηκαν 100 μL απιονισμένου νερού. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν με vortex και επώαστηκαν σε σκιερό, δροσερό μέρος για δύο (2) ώρες. Τέλος, φωτομετρήθηκαν στα 765 nm σε φωτόμετρο HITACHI U2900 (Tokyo, Japan).

Για τον σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, ζυγίζονται 100 mg γαλλικού οξέος και διαλυτοποιούνται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με απιονισμένο νερό. Δείγματα των 7, 5, 2 και 1 mL και συγκεντρώσεις 700, 500, 200 και 100 mg/L, μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, ανά ζεύγη, και αραιώνονται μέχρι πληρώσεως με οινόπνευμα. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu και κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς:  $A=0.00114 \cdot C_{\text{φαινολικών}} - 0.02358$  με γραμμικότητα  $R^2 = 0.998$

#### 6.3.4. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο DPPH

Η μέθοδος DPPH βασίζεται στη σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), η οποία έχει χαρακτηριστικό χρώμα και όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική ισχύ ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη και συμβαίνει μετατροπή του χρώματος σε κίτρινο. Η ρίζα DPPH παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 515 nm, ενώ η 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη εμφανίζει μειωμένη απορρόφηση στα 515 nm.

Για την παραγωγή του διαλύματος DPPH, ζυγίστηκαν 0.0025 g σκόνης DPPH και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια συμπληρώθηκε η φιάλη με μεθανόλη και τα διάλυμα αναδεύτηκε, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της DPPH.

Στην παρούσα διπλωματική, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες 3,9 mL του διαλύματος DPPH που παρασκευάστηκε και 100 μL αραιωμένου εκχυλίσματος ανά ζεύγη σωληνών. Τα ακετονικά εκχυλίσματα αραιώθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL με μεθανόλη, ενώ τα υδατικά σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL με απιονισμένο νερό. Σε κάθε μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα στο οποίο προστέθηκαν 3,9 mL διαλύματος DPPH και 100 μL μεθανόλης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επώαση για 30 λεπτά σε σκιερό και δροσερό μέρος και με το πέρας της τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε φωτόμετρο HITACHI U2900 (Tokyo, Japan) στα 515 nm και καταγράφηκαν οι απορροφήσεις τους.

Τέλος, για τον σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς για την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου, κατασκευάστηκε stock διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 971.034 mg/L. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1,3,5,7 και 8 mL του διαλύματος σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL και αραιώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Έπειτα, 100 μL από κάθε δείγμα προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 3,9 mL διαλύματος DPPH και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε σκιερό και δροσερό μέρος. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση σε φωτόμετρο HITACHI U2900 (Tokyo, Japan) στα 515 nm και προέκυψε η καμπύλη αναφοράς:  $A=0.0025 \cdot C_{\text{Trolox}} + 0.0189$  με γραμμικότητα  $R^2 = 0.999$  και  $C_{\text{Trolox}}$  εκφρασμένη σε ppm.

#### 6.3.5 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα

Κατά την παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των στερεών στα εκχυλίσματα με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας και της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Σε ζεύγη

γυάλινων σκευών προστέθηκαν 10 mL από το υδατικό εκχύλισμα του αφεψήματος, ζυγίστηκαν και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φούρνο (Binder, Germany) 100 °C για 24 ώρες όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση. Με το πέρας της ξήρανσης, τα σκεύη τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για 20 λεπτά και ζυγίστηκαν εκ νέου. Η διαφορά των δυο ζυγίσεων αποτελεί την μάζα των στερεών στο εκχύλισμα. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και στα ακετονικά και υδατικά εκχυλίσματα, με τη διαφορά ότι προστέθηκαν 5 mL και πριν τοποθετηθούν στον φούρνο αφέθηκαν για 24 ώρες μέχρι να εξατμιστεί η ακετόνη για αποφυγή ανάφλεξης της στον φούρνο.

#### 6.3.6. Ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με HPLC

Για την ποσοτικοποίηση και για τον ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HPLC. Αρχικά δείγματα από τα εκχυλίσματα, περίπου 1-2 mL, διηθήστηκαν για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών με φίλτρα σύριγγας 0,45 μm (PVDF, Teknokroma, Βαρκελώνη, Ισπανία) και εισήλθαν σε μια στήλη ανάστροφης φάσης ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 μm, 250 x 4.6 mm, Agilent, USA). Κατά την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι στην HPLC. Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Flav, με την οποία πραγματοποιήθηκε κυρίως ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών. 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 και η ροή τους μέσα στην στήλη ορίστηκε στο 1 mL/min. 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 5 min, σε 71% A, 17.4% B και 11.6% C σε διάστημα 30 min και 0% A, 85% B και 15% C σε διάστημα 60 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL και η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 280 nm. Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Carnosicref με την οποία πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε υπό ισοκρατικές συνθήκες με 0.1% φωσφορικό οξύ-60% ακετονιτρίλιο ως τη κινητή φάση και ο ρυθμός ροής ορίστηκε στο 1 mL/min. Η ανίχνευση DAD πραγματοποιήθηκε στα 230 nm και ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL. Η ποσοτικοποίηση των συστατικών έγινε με την χρήση καμπυλών αναφοράς και η ταυτοποίηση με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας και των φασμάτων της HPLC.

#### 6.3.7 Ανάλυση και ποσοτικοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου με GC-MS

Μετά την απόσταξη το αιθέριο έλαιο αποθηκεύτηκε για 24 ώρες σε ψυγείο και 0,2 mL του αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με εξάνιο με συμπλήρωση μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ένεση 1 mL του δείγματος σε σύστημα HP 6890 GC (plus+) συνδεδεμένο με HP 5973 ανιχνευτή μάζας (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), και εξοπλισμένο με HP-5 MS στήλη (30m×20 μm×0.25 μm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Η θερμοκρασία έναρξης του φούρνου ήταν 50 °C, αυξήθηκε στους 100 °C με ρυθμό 10 °C/min, και μετά στους 220 °C με ρυθμό 15 °C/min και διατηρήθηκε στους 220 °C για 7 min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο σε ροή στήλης 1 mL/min, με αρχική θερμοκρασία 220 °C και λόγο 20:1. Το εύρος των μαζών ορίστηκε στα 40–400 και η ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με τα αρχεία των βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας των NIST και Wiley, καθώς και της βάσης δεδομένων του Adams (2007)

#### 6.3.8 Παρασκευή μίγματος για ξήρανση με ψεκασμό

Για τον εγκλεισμό των συστατικών των υδατικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα μαλτοδεξτρίνης (MD) και αραβικού κόμμεος (GA) σε αναλογία 2:1 αντιστοίχως. Προστέθηκε ποσότητα υδατικού εκχυλίσματος που περιείχε 4 g στερεών μαζί με 16 g του μίγματος μαλτοδεξτρίνης και αραβικούς κομμεος και συμπληρώθηκαν 47.8 g απιονισμένου νερού, ώστε τα ολικά στερεά να έχουν

περιεκτικότητα περίπου 30% στο τελικό δείγμα και οι ολικές φαινόλες 5 %. Στην παρούσα εργασία 4.65 g GA τοποθετήθηκαν σε νερό θερμοκρασίας 50 °C, υπό ανάδευση μέχρι να διαλυτοποιηθεί, και στο διάλυμα προστέθηκαν 11.35 g MD . Όταν το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε το υδατικό εκχύλισμα μέχρι ο όγκος να φτάσει στα 72.5 mL και αφέθηκε να ηρεμήσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος . Τέλος αποθηκεύτηκε σε ψυγείο για 24 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε ομογενοποίηση του διαλύματος με χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (UnidriveX 1000, CAT) για 15 min στις 15000 rpm.

### 6.3.9 Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying)

Για την ξήρανση του μίγματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ξήρανσης με ψεκασμό. Η θερμοκρασία εισόδου αέρα ρυθμίστηκε στους 140 °C και η θερμοκρασία εξόδου αέρα κυμάνθηκε στους 65-75 °C. Η θερμοκρασία της τροφοδοσίας των γαλακτωμάτων ήταν 25 °C και ο ρυθμός τροφοδοσίας παρέμεινε σταθερός . Η πίεσης εκνέφωσης παρέμεινε σταθερή στα 5 bar. Προέκυψαν 6.5 g σκόνης. Τέλος 1 g από το τελικό προϊόν επαναδιαλύθηκε σε νερό ώστε να διαμορφωθεί ο ισοδύναμος όγκος και οδηγήθηκε προς ανάλυση στην HPLC και το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε σε πολυστρωματική συσκευασία, η οποία σφραγίστηκε επαρκώς, και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μελλοντική χρήση.

## 7. Αποτελέσματα-Συζήτηση

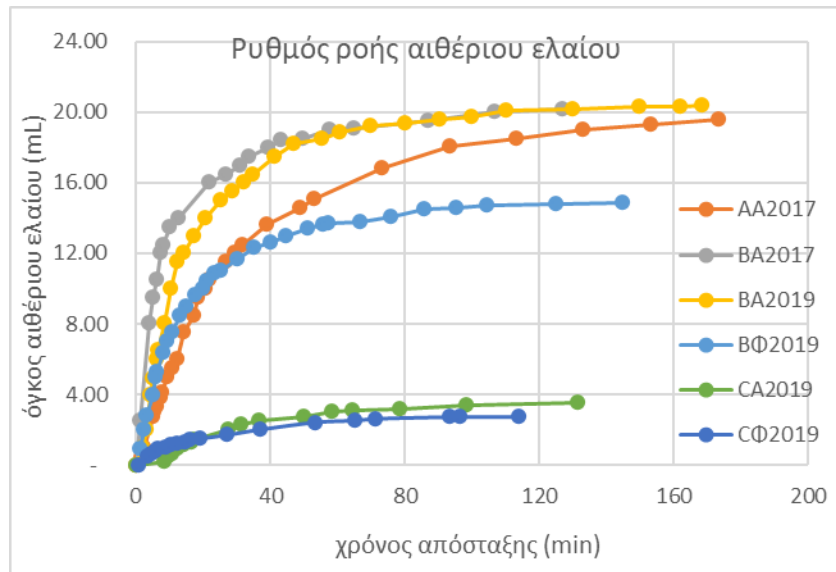
### 7.1 Παραλαβή αιθέριου ελαίου με υδροατμο-απόσταξη

Η παραλαβή του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υδροατμο-απόσταξης, σε εργαστηριακή συσκευή 17 L. Η θερμοκρασία αυξανόταν μέχρι που σταθεροποιήθηκε στους 100 °C και χρόνος έναρξης θεωρήθηκε ο χρόνος που εμφανίστηκε η πρώτη σταγόνα του αιθέριου ελαίου. Από τη στιγμή εκείνη, ανά τακτά διαστήματα, καταγραφόταν ο όγκος του αιθέριου ελαίου και ο ρυθμός παραλαβής του. Με το πέρας της απόσταξης, συλλέχθηκε το νερό που παρέμεινε στον αποστακτήρα και αποθηκεύτηκε, καθώς περιείχε φαινολικά συστατικά, λόγω έκλυσης του δενδρολίβανου κατά τη διεργασία. Το νερό αυτό ονομάστηκε αφέψημα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος δενδρολίβανου και της υδροατμο-απόσταξης του.

Πίνακας 7.1. Χαρακτηριστικά της μεθόδου της υδροατμο-απόσταξης

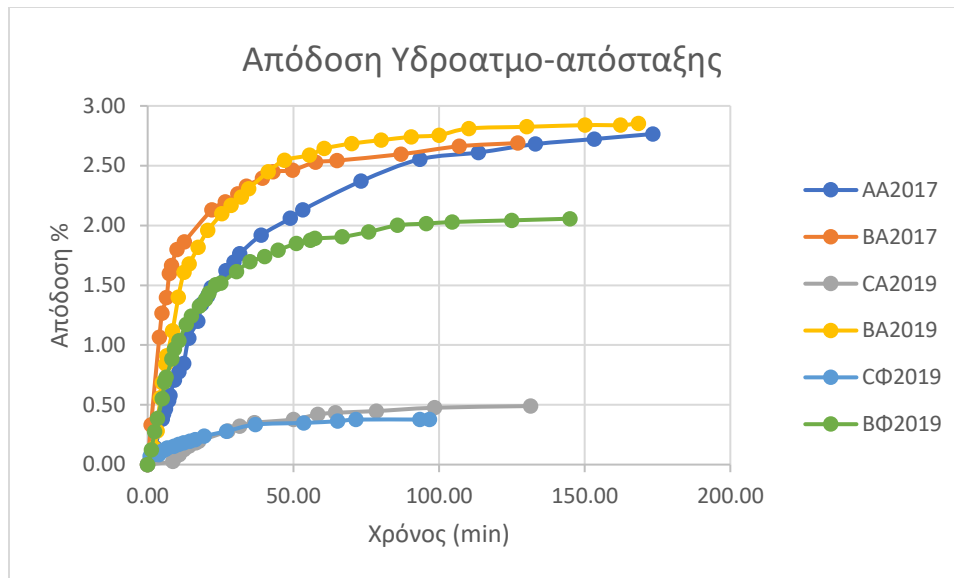
Δενδρολίβανο	Μάζα Δενδρολίβανού (g)	Όγκος Αφεψήματος (mL)	Όγκος Αιθέριου Ελαίου(mL)	Απόδοση Αιθέριου Ελαίου %	Μέση ροή Αποστάγματος (mL/min*kg)	Χρόνος Απόσταξης (min)
<b>A</b> <sub>A2017</sub>	708.82	2800	19.0	2.70	3.21	173.43
<b>B</b> <sub>A2017</sub>	751.16	3200	20.2	2.70	2.56	127.00
<b>C</b> <sub>A2019</sub>	715.00	3000	3.5	0.50	3.55	131.48
<b>B</b> <sub>A2019</sub>	715.00	2800	20.4	2.90	3.69	168.42
<b>C</b> <sub>Φ2019</sub>	717.00	3200	2.9	0.40	2.88	114.03
<b>B</b> <sub>Φ2019</sub>	724.50	3050	15.5	2.10	2.67	144.97

Οι κυριότεροι παράμετροι για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου της υδροατμο-απόσταξης είναι ο όγκος του αιθέριου ελαίου που αποστάχθηκε και η απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο. Στον πίνακα 7.1 φαίνεται ότι οι ποικιλίες Α και Β εμφανίζουν πολύ υψηλούς όγκους αιθέριου ελαίου αλλά και πολύ υψηλά ποσοστά απόδοσης του φυτού σε αιθέριο έλαιο, ενώ η ποικιλία C εμφανίζει πιο φτωχά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικότερα στα διαγράμματα 7.1 και 7.2.



Διάγραμμα 7.1 Ρυθμός ροής αιθέριου ελαίου των ποικιλιών

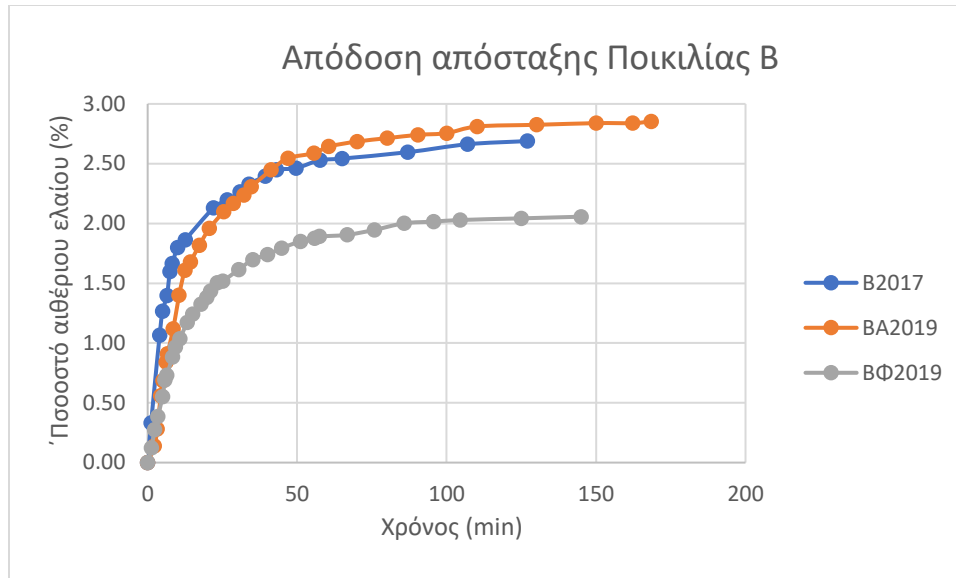
Στο διάγραμμα 7.1 περιγράφεται η ροή του αιθέριου ελαίου. Παρατηρείται ότι την άνοιξη του 2017 η ποικιλία Α έχει χαμηλό όγκο αιθέριου ελαίου σε σχέση με την ποικιλία Β. Την άνοιξη του 2019, η ποικιλία Β έχει τον μεγαλύτερο όγκο αιθέριου ελαίου στα δείγματα, ενώ η ποικιλία C έχει πολύ μικρό όγκο. Ο πιο χαμηλός τελικός όγκος αιθέριου ελαίου και για τις δύο ποικιλίες εμφανίζεται το φθινόπωρο του 2019, με την ποικιλία C να έχει τον μικρότερο όγκο από όλα τα δείγματα εκείνη την εποχή.



**Διάγραμμα 7.2 Απόδοση της Υδροατμο-απόσταξης των ποικιλιών σε αιθέριο έλαιο**

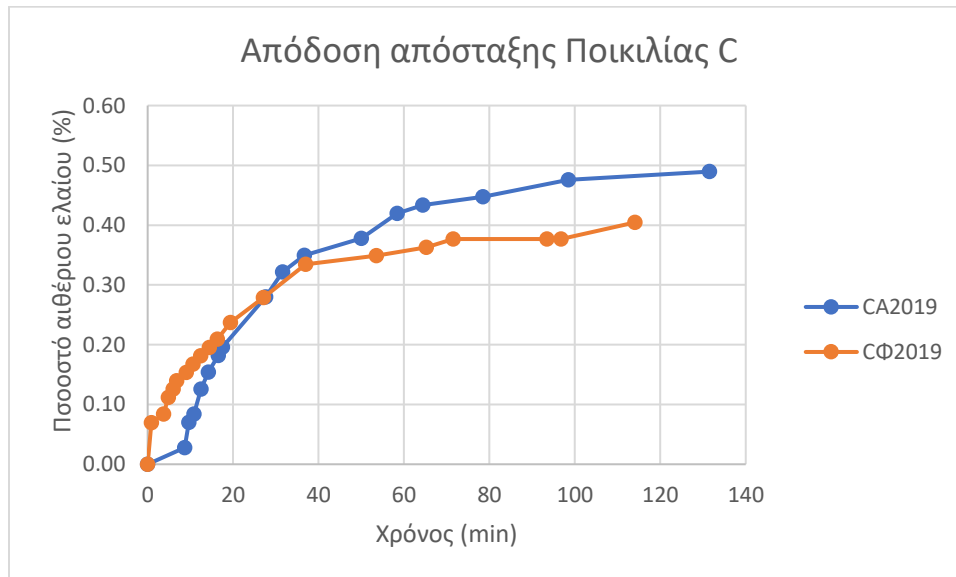
Στο διάγραμμα 7.2 , παρουσιάζεται η διαφορά της απόδοσης σε αιθέριου ελαίου μεταξύ των τριών ποικιλιών δενδρολίβανου, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Η ισχυρότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο ανήκει στο δείγμα  $B_{A2019}$  και η χαμηλότερη στο δείγμα  $C_{\Phi2019}$  . Το φθινόπωρο η μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζεται στην ποικιλία B και η χαμηλότερη απόδοση είναι αυτή της ποικιλίας C. Η ποικιλία C εμφανίζει πολύ χαμηλά ποσοστά σε αιθέριο έλαιο, συγκριτικά με τις άλλες ποικιλίες. Όπως και στη φθινοπωρινή συγκομιδή, η ποικιλία C εμφανίζει τη χαμηλότερη απόδοση, ενώ η ποικιλία B έχει πολύ υψηλή απόδοση σε σχέση με τη C. Οι ποικιλίες A και B, δεν παρουσιάζουν οποιαδήποτε διαφορά στην τελική απόδοσή τους, ειδικά μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και οι δύο ποικιλίες ανήκουν στη συγκομιδή του έτους 2017. Τα αποτελέσματα για την ποικιλία A εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με αυτά της βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα οι Parageorgiou et al. 2008 αναφέρονται σε υψηλά ποσοστά αιθέριου ελαίου σε δείγματα δενδρολίβανου της Ελλάδας, χημειότυπου 1,8-κινεόλης, που αντιστοιχούν στα αποτελέσματα της ποικιλία A.





**Διάγραμμα 7.3** Απόδοση της Υδροατμο-απόσταξης της ποικιλίας Β σε αιθέριο έλαιο

Στο διάγραμμα 7.3 φαίνεται ότι η χαμηλότερη απόδοση της ποικιλίας Β εμφανίζεται το φθινόπωρο του 2019, με ποσοστό 2.1 %, ενώ η μεγαλύτερη εμφανίζεται την άνοιξη του 2019, με ποσοστό 2.9 %. Δηλαδή η απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο μειώνεται το φθινόπωρο κατά 27.6 %. Αντίστοιχα αποτελέσματα συναντώνται στην βιβλιογραφία, με τους Atti-Santos et al 2005 να παρουσιάζουν μείωση της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο φυτού του ίδιου χημειότυπου (α-πινενίου) κατά το φθινόπωρο.



**Διάγραμμα 7.4** Απόδοση της Υδροατμο-απόσταξης της ποικιλίας C σε αιθέριο έλαιο

Με τη σύγκριση των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο της ποικιλίας C, τον Μάρτιο και το φθινόπωρο του 2019, παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση εμφανίζεται την άνοιξη στα 0.5 % ενώ η χαμηλότερη το Φθινόπωρο στα 0.4 %. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της ποικιλίας Β για το 2019, αλλά η μείωση στην ποικιλία C είναι χαμηλότερή αφού είναι της τάξεως του 18.4 %. Επιπλέον τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά των Melito et al 2019, σύμφωνα με τα οποία η ποσότητα του αιθέριου ελαίου

δενδρολίβανου χημειότυπου ισόποσου α-πινενίου, καμφοράς και 1,8-κινεόλης μειώνεται από την άνοιξη στο φθινόπωρο.

### 7.1.1 Ανάλυση αιθέριου ελαίου

Με το τέλος της υδροατμο-απόσταξης το αιθέριο έλαιο των ποικιλιών, αναλύθηκε με τη χρήση της μεθόδου GC-MS για τον χαρακτηρισμό των συστατικών του αλλά και του χημειότυπού των ποικιλιών, καθώς και τη μελέτη της επίδρασης της εποχής συγκομιδής στη σύνθεση του. Στον πίνακα 7.2 παρατίθενται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 7.2 Σύσταση αιθέριου ελαίου των ποικιλιών

Αιθέριο έλαιο(%)						
	A <sub>A2017</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>
ALPHA-PINENE	16.2	16.06	10.06	27.58	41.93	42.72
CAMPHENE	4	3.53	2.66	3.71	4.19	4.32
VERBENENE	0	1.61	0.86	0	0.74	0.64
BETA-MYRCENE	1.4	1.81	1.3	1.91	1.51	1.72
I-PHELLANDRENE	0.2	0.64	0.25	0.28	0.33	0.29
DELTA 3-CARENE	0.1	2.46	1.44	0	0	0
ALPHA-TERPINENE	0.6	0.85	0.27	0.77	1.02	0.74
P-CYMENE	3.5	1.81	2.62	1.18	1.16	1.7
DL-LIMONENE	2.8	4.86	4.33	3.94	3.44	4.01
1,8-CINEOLE	49.7	16.37	16.45	29.46	28.66	29.56
LINALOOL L	0.5	3.76	4.97	1.94	1.23	1.36
FILIFOLONE	0	0.25	0.33	0.30	0.18	0.14
D-FENCHYL-ALCOHOL	0.1	0.03	0.1	0	0.06	0.07
(+)-SABINOL	0	0.13	0.12	0	0.05	0.06
L-CAMPHOR	0.4	14.04	19.33	4.26	3.08	3.5
3-PINANONE	0	1.4	1.2	0	0	0
1-BORNEOL	8.8	6.26	10.46	3.25	2.45	2.31
TRANS-3-PINANONE	0.7	2.76	3.35	0	0.01	0
BETA-FENCHYL-ALCOHOL	2.6	1.2	2.38	0	1.86	1.78
MYRTENOL	0	0.2	0.38	0	0.1	0.08
NOPOL	0	0.39	0.82	0	0.16	0.16
CIS-VERBENONE	0	5.58	7.57	5.13	2.66	2.35
PIPERITONE	0	0	0.01	0	0.01	0

<b>L-BORNYL-ACETATE</b>	1.4	3.26	0.67	0.94	1.13	0.3
<b>m-THYMOL</b>	0.2	3.28	0.06	0	1.13	0.3
<b>CARVACROL</b>	4.3	1.05	2.67	0	0	0
<b>PIPERITENONE</b>	0	0	0.17	0.12	0	0
<b>YLANGENE</b>	0	0.12	0.15	0	0.05	0.04
<b>a-COPAENE</b>	0	0.59	0.63	0	0.23	0.17
<b>METHYL-EUGENOL</b>	0	0	0.07	0.13	0.01	0
<b>TRANS-CARYOPHYLLEN E</b>	2	3.87	1.86	0.21	1.2	0.7
<b>alpha-humulene</b>	0.1	0.5	0.33	0.13	0.7	0.4
<b>NAPHTHALENE</b>	0	0.44	0.54	0	0.22	0.15
<b>beta-bisabolene</b>	0.1	0.1	0.14	0	0.03	0.02
<b>GAMMA-CADINENE</b>	0	0.2	0.4	0	0.12	0.09
<b>delta-cadinene</b>	0	0.55	1.03	0	0.36	0.25
<b>Απόδοση</b>	2.7	0.5	0.4	2.7	2.9	2.1

Στον πίνακα 7.2, είναι εμφανές ότι το αιθέριο έλαιο κάθε ποικιλίας ανήκει σε συγκεκριμένο χημειότυπο. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ένας από τους τύπους του αιθέριου ελαίου από δενδρολίβανο, που προέρχεται από την Ελλάδα, εμφανίζει περίπου ίσα ποσοστά α-πινένιου, καμφοράς και 1,8-κινεόλης. Αυτή η περίπτωση είναι φανερό ότι αφορά την ποικιλία C, καθώς την άνοιξη εμφανίζει ποσοστά α-πινένιου στα 16.06 %, καμφοράς στα 14.04 % και 1,8-κινεόλης στα 16.37 %. Παρόλα αυτά, τον Οκτώβριο συναντάται μείωση στην ποσότητα του α-πινένιου στα 10.06 % και σημαντική αύξηση της καμφοράς στα 19.33 %, χωρίς όμως κάποια μεταβολή της συγκέντρωσης της 1,8-κινεόλης. Τα αποτελέσματα της ποικιλία C, φαίνεται να συμφωνούν με την βιβλιογραφία και τα αποτελέσματα των Melito et al (2019). Στη βιβλιογραφία, σε αιθερία έλαια αυτού του χημειότυπου, η 1,8-κινεόλη δεν παρουσιάζει κάποια σημαντική διαφοροποίηση με τις εποχές, και η καμφορά εμφανίζει μια αύξηση το φθινόπωρο σε σχέση με την άνοιξη. Το α-πινένιο, όμως, εμφανίζει μια ελάχιστη αύξηση το φθινόπωρο σε σχέση με την άνοιξη, ενώ στα δείγματα της ποικιλία C το φθινόπωρο περιγράφεται μια σημαντική μείωση του ποσοστού του α-πινένιου. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυτά έχουν καλλιεργηθεί σε διαφορετικές περιοχές και χρονιές.

Ο δεύτερος τύπος χημειότυπου του αιθέριου ελαίου, δενδρολίβανου, που καλλιεργείται στην Ελλάδα παρουσιάζει υψηλά ποσοστά 1,8-κινεόλης όπως το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου της ποικιλία A. Φαίνεται λοιπόν ότι το δενδρολίβανο της ποικιλίας A ανήκει στο χημειότυπο 1,8-κινεόλης, καθώς τα ποσοστά της 1,8-κινεόλης φτάνουν τα 49.7 %. Παράλληλα, εμφανίζει σχεδόν μηδαμινή ποσότητα καμφοράς, με ποσοστό 0.4 % και ποσοστό α-πινένιου στα 16.2 %.

Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου της ποικιλία B εμφανίζει την άνοιξη του 2019 ποσοστό α-πινένιου 41.93 %, καμφοράς 3.08 % και 1,8-κινεόλης 28.66 %. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το δενδρολίβανο αυτό ανήκει στο χημειότυπο α-πινένιου, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου B της φθινοπωρινής συγκομιδής (B<sub>Φ2019</sub>) εμφανίζει ελάχιστες αποκλίσεις στα κύρια συστατικά του από αυτό του Μάιου. Το δείγμα B<sub>A2017</sub> εμφανίζει μεγάλη ιδιομορφία σε σχέση με την ποικιλία του καθώς σε αντίθεση με το 2019 το α-πινένιο και η 1,8-κινεόλη έχουν παραπλήσιες τιμές στα 27.58 και 29.46 %. Το δείγμα αυτό εμφανίζει πολύ μειωμένη ποσότητα α-πινένιου σε σχέση με τα άλλα δείγματα της ποικιλίας B άλλα παρόμοια συγκέντρωση 1,8-κινεόλης και καμφοράς. Είναι σημαντικό να

αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο από το δείγμα B<sub>A2019</sub> αποστάχθηκε και αναλύθηκε στην Θεσσαλονίκη στο Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών πόρων του ΕΛΓΟ “Δήμητρα”, γεγονός στο οποίο πιθανώς οφείλονται οι διαφορές από τα υπόλοιπα δείγματα.

Όμως τα αποτελέσματα της ποικιλίας Β, συμφωνούν με την βιβλιογραφία και τους Atti-Santos et al (2005), καθώς ανάμεσα στις δύο χρόνιες ο χημειότυπος α-πινενίου, εμφανίζει σταθερά ποσοστά της 1,8-κινεόλης και της καμφοράς. Στη βιβλιογραφία επίσης το α-πινένιο εμφανίζει μια σχετική διαφοροποίηση στην ποσότητα του παρόλο που είναι μικρότερη από αυτή που παρατηρείται στην ποικιλία Β.

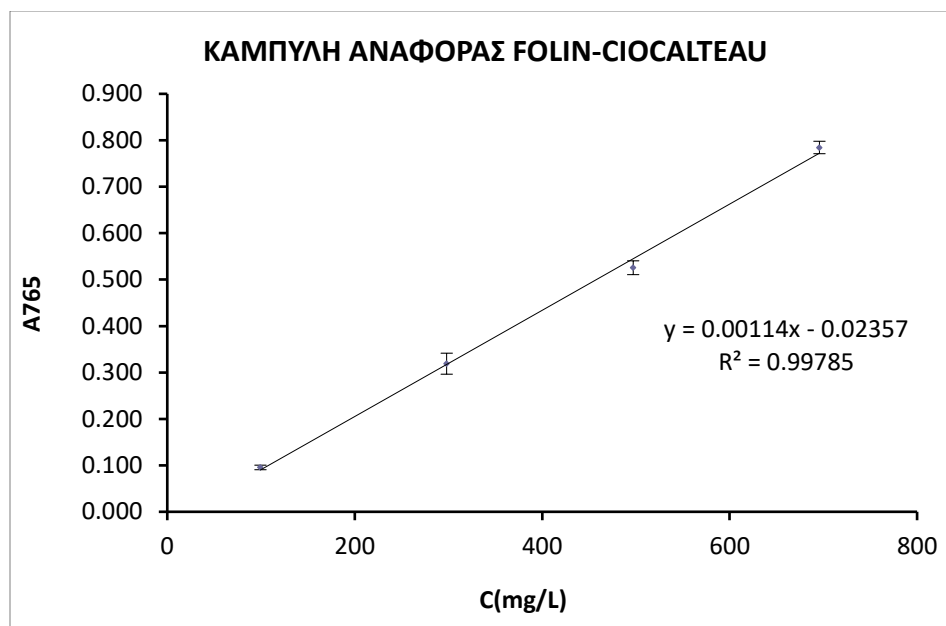
Επιπλέον, αναφορικά με την σύσταση των αιθέριο ελαίων, το αιθέριο έλαιο της ποικιλίας Α περιέχει τα λιγότερα συστατικά σε σχέση με αυτό των άλλων ποικιλιών. Συγκεκριμένα, περιέχει 21 χημικές ενώσεις, ενώ η ποικιλία Β και η C 33 και 29 αντίστοιχα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ποσοστά δ-3-καρενίου, καθώς στην ποικιλία C έχει χαμηλές τιμές, (περίπου 2 % στην ανοιξιιάτικη συγκομιδή), στην ποικιλία Α βρίσκεται σε ίχνη με ποσοστό 0.1 %, ενώ στην ποικιλία Β δεν ανιχνεύεται. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του δ-3-καρενίου παρουσιάζει και η τρανς-3-πινενόνη. Ειδικότερα, στην ποικιλία Β ανιχνεύεται μόνο κατά την ανοιξιιάτικη συγκομιδή, άλλα σε ίχνη, ενώ στην ποικιλία Α το ποσοστό της είναι ιδιαίτερα χαμηλό, στα 0,7 %. Στην ποικιλία C η τρανς-3-πινενόνη έχει ποσοστό 2.76 και 3.35 % στην ανοιξιιάτικη και την φθινοπωρινή συγκομιδή. Αντίστοιχα, η 3-πινανόνη εμφανίζει στην ποικιλία C ποσοστά 1.4 και 1.2 % στην ανοιξιιάτικη και στη φθινοπωρινή συγκομιδή αλλά δεν παρουσιάζει ούτε ίχνη στις άλλες δύο ποικιλίες.

Ένα άλλο συστατικό του αιθέριου ελαίου του δενδρολίβανου που ξεχωρίζει για την συγκέντρωση του είναι η λινανοόλη, η οποία είναι ένα επιθυμητό συστατικό στο αιθέριο έλαιο, λόγω της ευχάριστης οσμής της άλλα και της ευρείας εμπορικής της χρήσης. Στην ποικιλία Α βρίσκεται σχεδόν σε ίχνη με ποσοστό 0.5 %, ενώ στην ποικιλία C εμφανίζει ποσοστά 3.76 % και 4.96 % στην ανοιξιιάτικη και τη φθινοπωρινή συγκομιδή. Επιπλέον, στην ποικιλία Β έχει χαμηλότερα ποσοστά με τιμές 1.94, 1.23 και 1.36 %. Τέλος, το αιθέριο έλαιο της ποικιλίας C έχει υψηλότερα ποσοστά cis-βερμπενόνης από την ποικιλία Β, ενώ στην ποικιλία Α η cis-βερμπενόνη δεν ανιχνεύεται. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά της cis-βερμπενόνης στην C<sub>A2019</sub> και C<sub>Φ2019</sub> είναι 5.58 και 7.57 % ενώ στις B<sub>A2019</sub> και B<sub>Φ2019</sub> είναι 2.66 και 2.33 %. Όμως το 2017 στην ποικιλία Β η cis-βερμπενόνη έχει ποσοστό 5.13 %, δηλαδή παρόμοιο με αυτό της ανοιξιιάτικης συγκομιδής της ποικιλίας C. Η βερμπενόνη είναι μια ουσία με πολύ χαρακτηριστική και ευχάριστη οσμή και για αυτό τον λόγο είναι επιθυμητή στο αιθέριο έλαιο.

Όσο αφορά την ποιότητα του, το αιθέριο έλαιο των δειγμάτων είναι πλούσιο σε 1,8-κινεόλη, γεγονός που του δίνει ευχάριστη οσμή. Όμως, το δενδρολίβανο της ποικιλίας C παρόλο που εμφανίζει ικανοποιητικές ποσότητες και από άλλα επιθυμητά συστατικά όπως η βερμπενόνη και η λινανοόλη, περιέχει μεγάλη ποσότητα καμφοράς, γεγονός που το καθιστά λιγότερο εύχρηστο, καθώς του προσδίδει μια δυσάρεστη, χαρακτηριστική οσμή και μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις. Οι άλλες δύο ποικιλίες περιέχουν ελάχιστη καμφορά, αλλά υψηλά ποσοστά α-πινενίου, το οποίο μπορεί να έχει αλλεργιογόνο δράση, οπότε, αν υποστούν μια διεργασία αποτερπενίωσης, χωρίς μείωση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών, τα αιθέρια έλαια τους θα είναι κατάλληλα για βιομηχανική χρήση, ειδικά της ποικιλία Α που έχει αισθητά λιγότερο α-πινένιο και αισθητά περισσότερη 1,8-κινεόλη.

## 7.2 Ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμός των φαινολικών συστατικών

Για την προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu και με χρήση της γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς όπως προαναφέρθηκε στη παράγραφο 6.3.3.

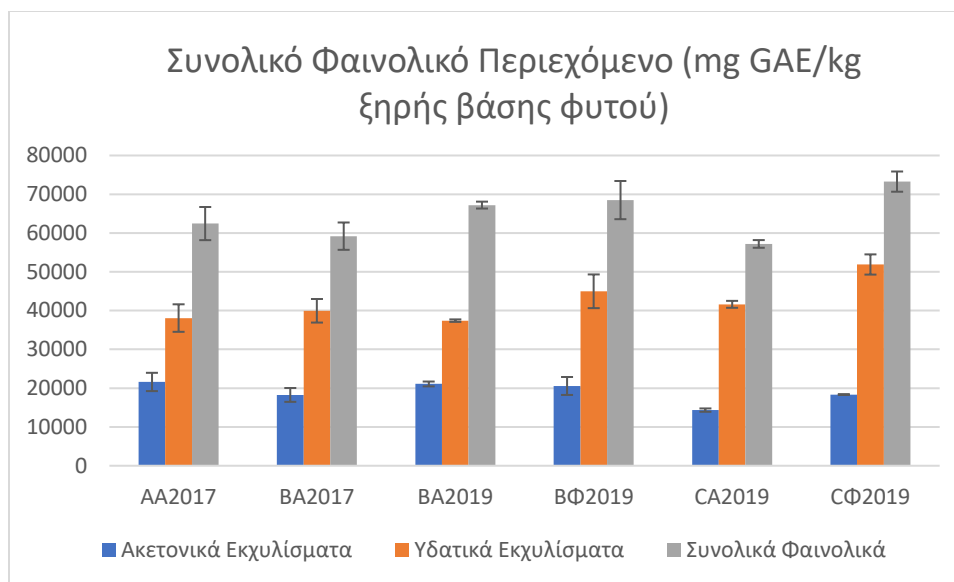


Διάγραμμα 7.5 Καμπύλη αναφοράς Folin-Ciocalteu

### 7.2.1 Σύγκριση φαινολικού περιεχομένου των τριών ποικιλιών

Πίνακας 7.3 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Συνολικό Φαινολικό Περιεχόμενο(mg GAE/kg ξηρής βάσης φυτού)						
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
<b>Αφέψημα</b>	2759±306	983±135	8702±547	2955±34	1231±21	3017±22
<b>Ακετονικό</b>	21602±2360	18257±1785	21087±624	20565±2315	14344±430	18354±19
<b>Υδατικό</b>	38080±3548	39954±3036	37416±320	44980±4345	41616±894	51889±2606
<b>Σύνολο</b>	62440±4272	59194±3524	67205±889	68499±4923	57191±992	73260±2606



**Γράφημα 7.1 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των ποικιλιών**

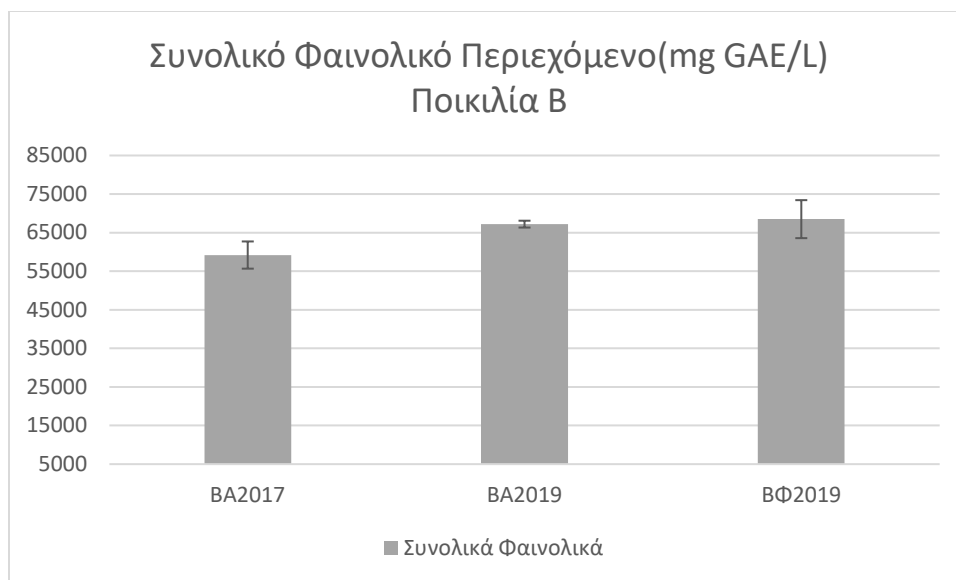
Στη συνέχεια, με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκαν, σε κάθε εκχύλισμα, για κάθε ποικιλία δενδρολίβανου, το φαινολικό περιεχόμενο, εκφρασμένο ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Στον πίνακα 7.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα της ποσοτικοποίησης των συνολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα, με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Στο γράφημα 7.1, γίνεται φανερό ότι, σε όλα τα δείγματα, τα υδατικά εκχυλίσματα ήταν πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά από τα αντίστοιχα ακετονικά. Αυτό, ενδεχομένως, να οφείλεται στο γεγονός ότι στα υδατικά εκχυλίσματά, λόγω πολικότητας, εκχυλίζονται κυρίως το ροσμαρινικό οξύ και άλλα φαινολικά οξέα αλλά και τα φλαβονοειδή, που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία, ενώ στα ακετονικά εκχυλίσματά εκχυλίζονται, κατά κύρια βάση, τα φαινολικά διτερπένια.

Επίσης συγκρίνοντας την ποικιλία Β και C παρατηρείται ότι τη χαμηλότερη συγκέντρωση την άνοιξη την εμφανίζει η ποικιλία C σε σύγκριση, με την ποικιλία Β. Η διαφορά των δυο ποικιλιών σε συνολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι σημαντική την άνοιξη. Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των ποικιλιών C και Β στην φθινοπωρινή συγκομιδή, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις και των δυο ποικιλιών δεν διαφέρουν σημαντικά και είναι οι μεγαλύτερες που μετρήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Αναφορικά με τα ακετονικά εκχυλίσματα η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών εμφανίζεται στην ποικιλία Α και Β τη χρονιά 2017 ενώ η μικρότερη στην ποικιλία C την άνοιξη του 2019. Η ποικιλία Β το 2019 παρουσιάζει υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο στα ακετονικά της εκχυλίσματα από την ποικιλία C και στις δύο εποχές συγκομιδής.

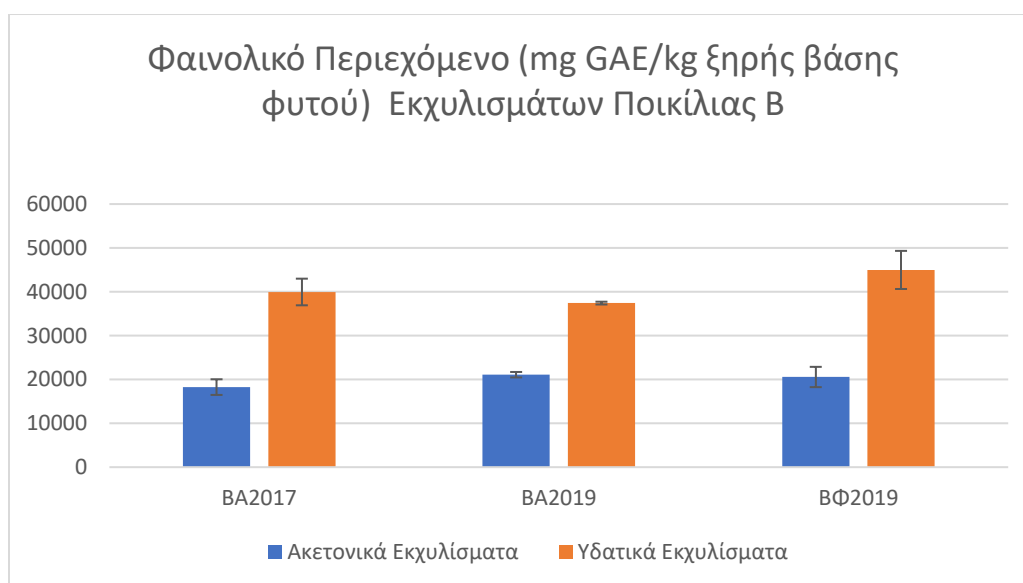
Αντίθετα η ποικιλία C έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά από την ποικιλία Β στα υδατικά της εκχυλίσματα το φθινόπωρο και την άνοιξη του 2019. Η ποικιλία Β το 2017 εμφανίζει παραπλήσια συγκέντρωση με την ποικιλία Α στα συνολικά φαινολικά της, στα υδατικά εκχυλίσματα άλλα και τα ακετονικά.

### 7.2.3 Σύγκριση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Β



**Γράφημα 7.2 Σύγκριση συνολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων ποικιλίας Β**

Στο γράφημα 7.2 φαίνεται ότι η ποικιλία Β παρουσιάζει, μεταξύ των συγκομιδών διαφορετικών ετών, μια αύξηση στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον, στο δενδρολίβανο της ποικιλίας Β η συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών κατά τον Οκτώβριο της χρονιάς 2019 εμφανίζει παραπλήσια αποτελέσματα με την συγκέντρωση του Μαΐου της ίδιας χρονιάς.

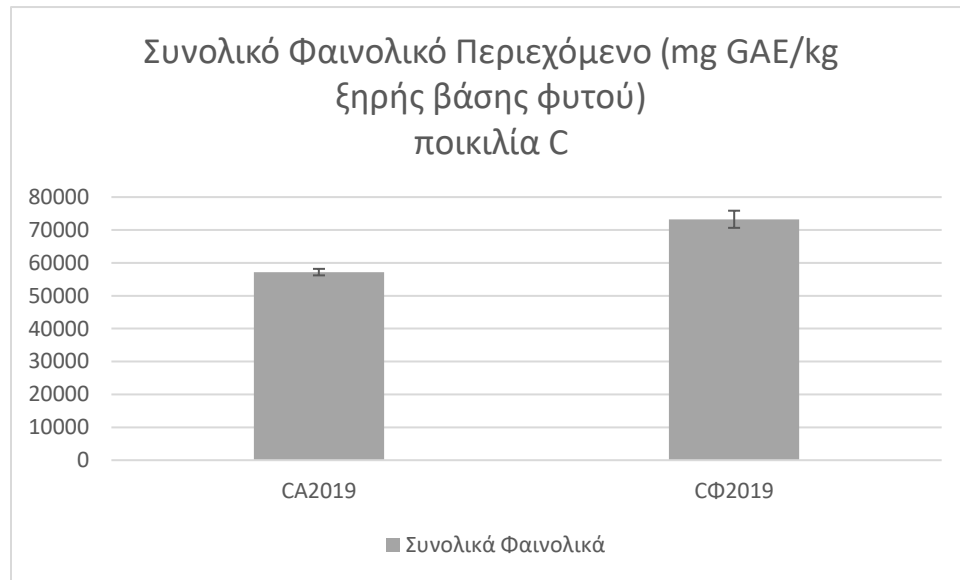


**Γράφημα 7.3 Σύγκριση φαινολικών συστατικών στα υδατικά και ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας Β**

Στο γράφημα 7.3 περιγράφονται τα αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu για τα ακετονικά και τα υδατικά εκχυλίσματα της ποικιλίας Β. Παρατηρείται ότι η συγκομιδή της άνοιξης τη χρονιά 2019 φέρει παρόμοια συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στα ακετονικά εκχυλίσματα της, με τη χρονιά 2017. Επιπροσθέτως, τη χρονιά 2019, δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση των ακετονικών εκχυλισμάτων, σε φαινολικά συστατικά, μεταξύ των συγκομιδών της άνοιξης και του φθινοπώρου.

Επιπλέον η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών εμφανίζεται στο υδατικό εκχύλισμα της συγκομιδής του φθινοπώρου, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση σε υδατικό εκχύλισμα της ποικιλία Β ανήκει στη ανοιξιάτικη συγκομιδή του 2019 . Παρατηρείται, λοιπόν, μια αύξηση στις συγκεντρώσεις των υδατικών εκχυλισμάτων, μεταξύ των συγκομιδών του 2019. Συγκρίνοντας τις συγκομιδές των χρονιών 2017 και 2019, φαίνεται ότι η χρονιά 2017 εμφανίζει συγκέντρωση παρόμοια με αυτή της συγκομιδής Β<sub>Α2019</sub>.

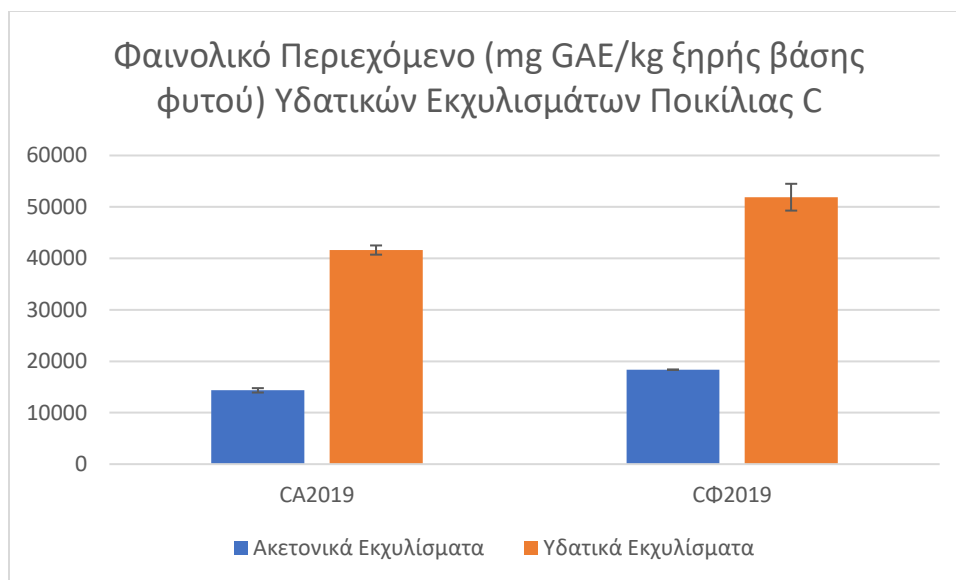
#### 7.2.4 Σύγκριση φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων της Ποικιλία C



Γράφημα 7.4 Σύγκριση συνολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα της ποικιλίας C

Όσον αφορά στην ποικιλία C, εμφανίζεται και σε αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών συστατικών, μεταξύ άνοιξης και φθινοπώρου. Η αύξηση της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών συστατικών στην ποικιλία C, στο διάστημα αυτών των μηνών, είναι αισθητή, αντίθετα με αυτή της ποικιλίας Β. Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με την βιβλιογραφία καθώς διαφορετικές ποικιλίες δενδρολίβανου παρουσιάζουν διαφορετικές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των φαινολικών στοιχείων τους ανάμεσα στην άνοιξη και το φθινόπωρο. (Yeddes et al 2019; Papageorgiou et al 2008; Baydar et al 2009; Hadi et al 2018)





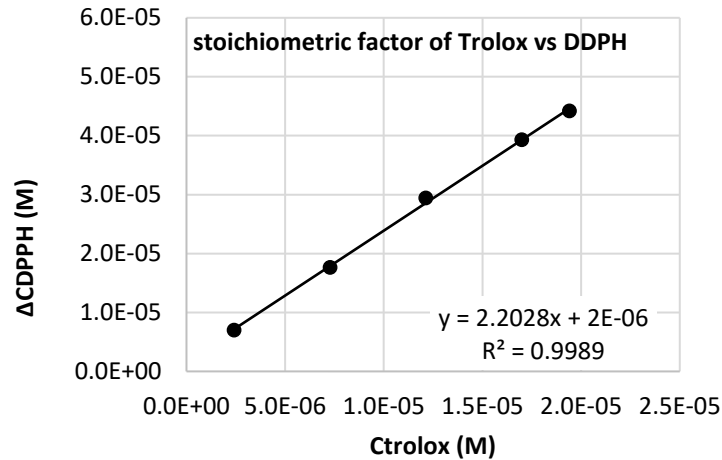
**Γράφημα 7.5 Σύγκριση φαινολικών συστατικών στα υδατικά και ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C**

Στο γράφημα 7.5 φαίνεται ότι στα ακετονικά εκχυλίσματα η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά στην ποικιλία C παρουσιάζεται τον Οκτώβριο και η χαμηλότερη τον Μάιο. Σε αντίθεση, λοιπόν, με την ποικιλία B, τα ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C εμφανίζουν αύξηση στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών τους μεταξύ της ανοιξιάτικης και της φθινοπωρινής συγκομιδής.

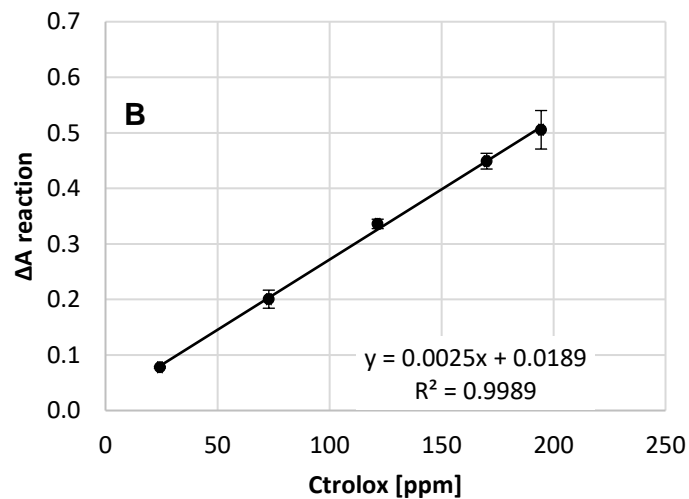
Επίσης στο γράφημα 7.5 περιγράφονται τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu όσον αφορά στα υδατικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών εμφανίζεται τον Οκτώβριο και η χαμηλότερη τον Μάιο. Παρατηρείται, όπως και στα ακετονικά εκχυλίσματα, μια αισθητή αύξηση στα φαινολικά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων, μεταξύ των συγκομιδών της άνοιξης και του φθινοπώρου.

### 7.3. Ανάλυση Αντιοξειδωτικής Δράσης των εκχυλισμάτων των ποικιλιών

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της κάθε ποικιλίας δενδρολίβανου πραγματοποιήθηκε με την χρήση της μεθόδου DPPH, κατά την οποία μελετάται η ικανότητα των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox. Για να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, κατασκευάστηκε με τη χρήση Trolox, μια καμπύλη αναφοράς, όπως περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 6.3.4. Η καμπύλη αναφοράς φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 7.6 Καμπύλη αναφοράς Αντιοξειδωτικής δράσης DPPH



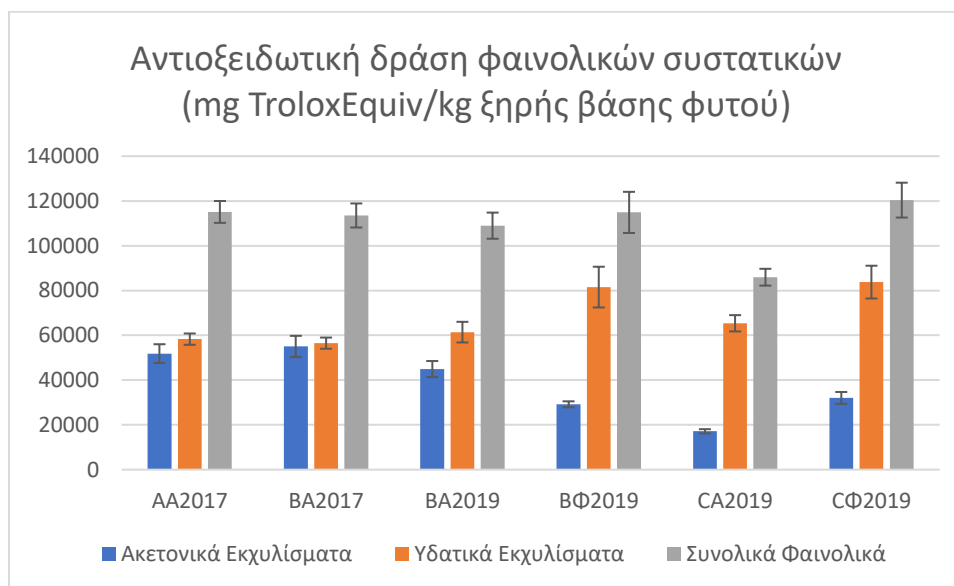
Διάγραμμα 7.7 Καμπύλη αναφοράς Αντιοξειδωτικής δράσης DPPH σε ppm

Κατόπιν, το εκχύλισμα κάθε ποικιλίας εξετάστηκε ως προς την αντιοξειδωτική της ικανότητα και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 7.4. Οι τιμές του πίνακα αντιπροσωπεύουν την ποσότητα αντιοξειδωτικών συστατικών που εκχειρίσθηκαν από το φυτό εκφρασμένα σε ισοδύναμα Trolox (TE).

Πίνακας 7.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των ποικιλιών

Αντιοξειδωτική ικανότητα (mg TE/kg ξηρής βάσης φυτού)						
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
<b>Αφέψημα</b>	4971±503	2004±36	2631±21	4178±36	3451±12	4581±265

<b>Ακετονικό</b>	51839±4178	55008±4755	44919±3597	29177±1340	17128±945	32038±2648
<b>Υδατικό</b>	58294±2524	56501±2496	61410±4606	81535±9091	65371±3640	83758±7326
<b>Συνολο</b>	115103±4881	113513±5370	108960±5844	114890±9189	85949±3761	120377±7790



**Γράφημα 7.6 Ποσοτικοποίηση Αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα των ποικιλιών**

Στο Πίνακα 7.4 και στο διάγραμμα 7.6, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζεται στην ποικιλία C όπως και η χαμηλότερη. Σε όλες τις ποικιλίες με εξαίρεση την ποικιλία A και την ποικιλία B, τη χρονιά 2017, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα την κατέχουν τα υδατικά εκχυλίσματα, με τη μέγιστη στις ποικιλίες C και B, τη χρονιά 2019. Οι ποικιλίες A και B την χρονιά 2017 έχουν όμοιες αντιοξειδωτικές ικανότητες στα ακετονικά και τα υδατικά τους εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα που περιγράφονται βρίσκονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία όπου τα εκχυλίσματα ακετόνης εμφανίζουν ελάχιστα χαμηλότερες αντιοξειδωτικές δράσεις από αυτά του νερού (Moreno et al 2006; Rodríguez-Rojo et al 2012).

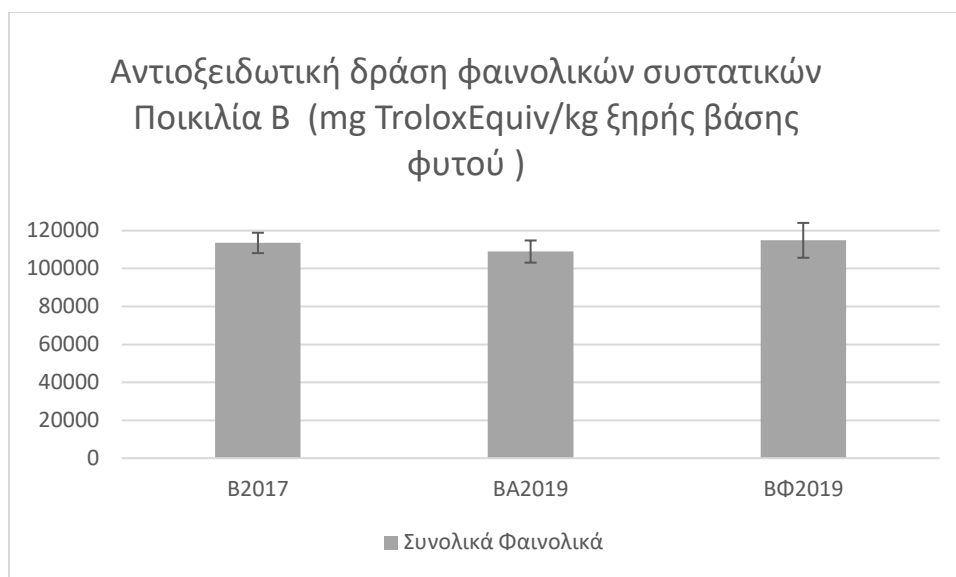
Στο γράφημα 6.6, επίσης παρουσιάζεται η σύγκριση της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των ποικιλιών A και B, τη χρονιά 2017, οι οποίες εμφανίζουν όμοια αποτελέσματα, όσο αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ποικιλιών B και C για την άνοιξη και το φθινόπωρο του 2019. Στο γράφημα 7.6, γίνεται εμφανές ότι η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων της ποικιλίας B την άνοιξη είναι πολύ ισχυρότερη από αυτή της ποικιλίας C. Αντιθέτως το φθινόπωρο του 2019 οι δύο ποικιλίες εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές. Και οι δύο ποικιλίες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυτή την εποχή.

Σε ό,τι αφορά στα ακετονικά εκχυλίσματα, η ποικιλία C παρουσιάζει κοντινές τιμές, στην αντιοξειδωτική ικανότητα της, με την ποικιλία B, το φθινόπωρο και αισθητά χαμηλότερη την άνοιξη. Παράλληλα, στα υδατικά εκχυλίσματα η ποικιλία C παρουσιάζει, επίσης, παραπλήσια αντιοξειδωτική δράση με την

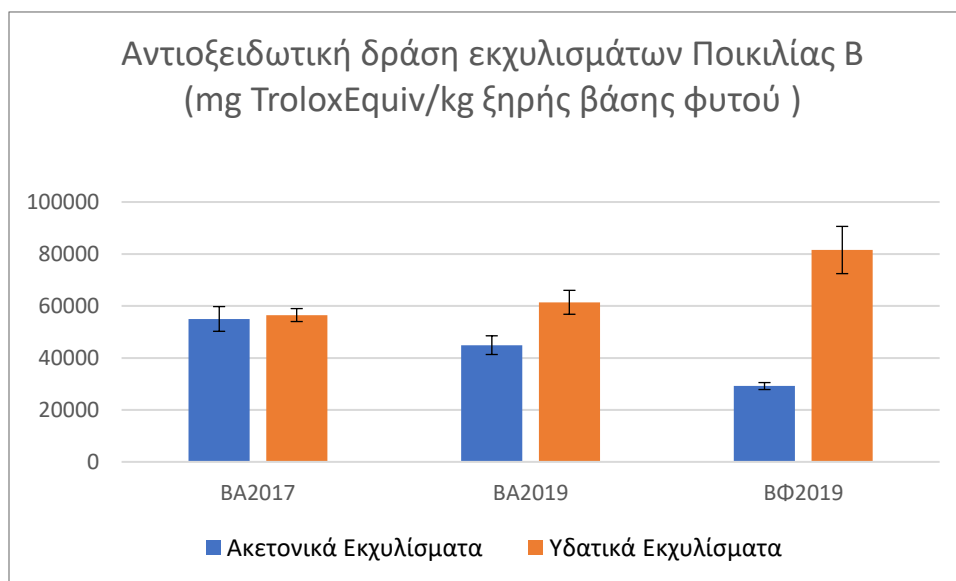
ποικιλία Β το φθινόπωρο, άλλα και την άνοιξη. Τη χρονιά 2017 η ποικιλία Β εμφανίζει μια αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων της, σε σχέση με την χρονιά 2019, ενώ στα υδατικά εκχυλίσματα δεν παρατηρείται κάποια ξεκάθαρη διαφορά.

### 7.3.1 Ανάλυση Αντιοξειδωτική ικανότητα ποικιλίας Β



**Γράφημα 7.7 Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης συνολικών φαινολικών συστατικών ποικιλίας Β**

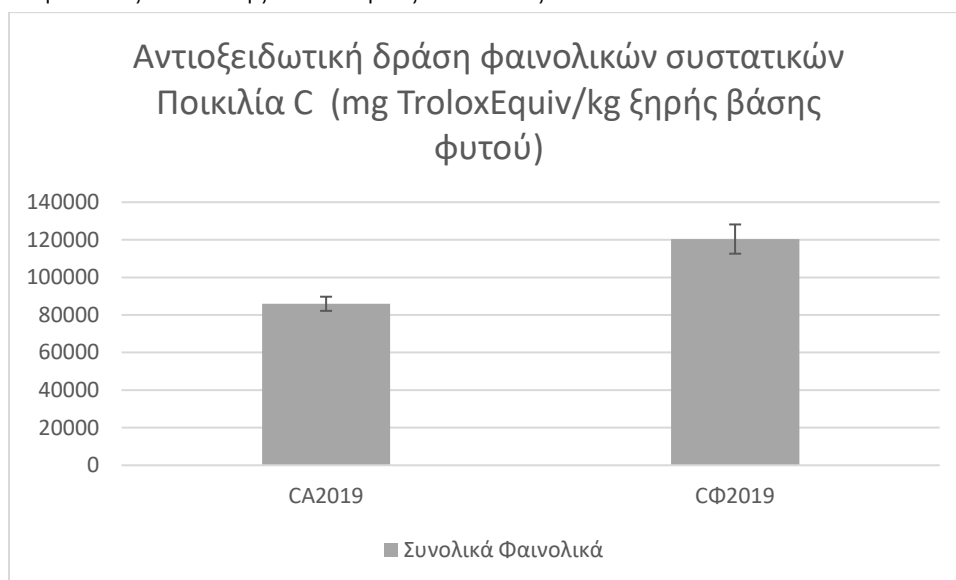
Στο γράφημα 7.7 παρουσιάζεται η σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών της ποικιλίας Β. Η συνολική αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων της ποικιλίας Β εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα και στις τρεις (3) εποχές συγκομιδής.



**Γράφημα 7.8 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών στα υδατικά και ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας Β**

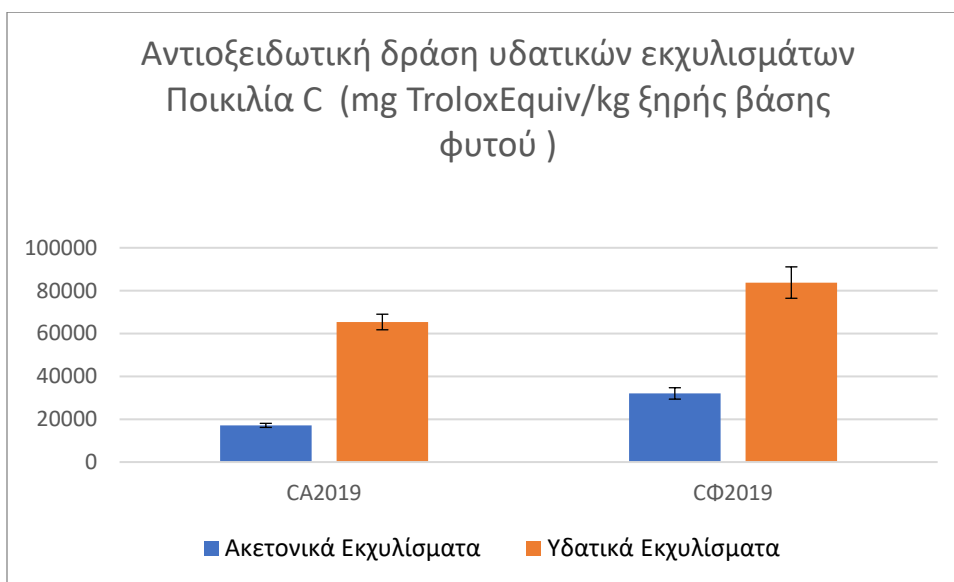
Στο γράφημα 7.8, παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση των υδατικών και των ακετονικών εκχυλισμάτων της ποικιλίας Β. Το ακετονικό εκχύλισμα, τον Μάιο του 2019, εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτή του Οκτώβριου. Επιπλέον την άνοιξη του 2019 στην ποικιλία Β παρατηρείται μια μείωση στην αντιοξειδωτική δράση των ακετονικών εκχυλισμάτων σε σχέση με την άνοιξη του 2017. Η μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα στα υδατικά εκχυλίσματα εμφανίζεται στην συγκομιδή BΦ<sub>2019</sub> και με μεγάλη διαφορά από τις ανοιξιάτικες συγκομιδές του 2019 και του 2017, οι οποίες εμφανίζουν κοντινές αντιοξειδωτικές ικανότητες.

### 7.3.2 Ανάλυση Αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας C



**Γράφημα 7.9 Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης συνολικών φαινολικών συστατικών ποικιλίας C**

Στο γράφημα 7.9, παρουσιάζεται η διαφορά της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων της ποικιλίας C. Η διαφορά των δύο συγκομιδών είναι σημαντική και εμφανίζεται μια μεγάλη αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης από την άνοιξη του 2019 στο φθινόπωρο. Τα αποτελέσματα για την εποχική συγκομιδή της ποικιλίας C φαίνεται να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία καθώς στη βιβλιογραφία καταγράφεται μια μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης την άνοιξη σε σχέση με το φθινόπωρο. (Yeddes et al 2019; Parageorgiyou et al 2008; Baydar et al 2009)



**Γράφημα 7.10 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολικών συστατικών στα υδατικά και ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C**

Όπως γίνεται σαφές στο γράφημα 7.10, η διαφορά της αντιοξειδωτικής δράσης στα ακετονικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C είναι μεγάλη. Ειδικότερα, το ακετονικό εκχύλισμα της συγκομιδής CA2019 έχει πολύ χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτή της συγκομιδής CΦ2019 και όπως παρατηρείται στον πίνακα 7.4 είναι σχεδόν διπλάσια. Στο διάγραμμα 6.10, φαίνεται επιπλέον ότι, στα υδατικά εκχυλίσματα της ποικιλίας C, η αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει μέγιστο στη φθινοπωρινή συγκομιδή. Η συγκομιδή της άνοιξης, στο υδατικό εκχύλισμα, -όπως και στο ακετονικό εκχύλισμα- παρουσιάζει μεγάλη διαφορά στην αντιοξειδωτική της δράση.

#### 7.4 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο HPLC

Με την βοήθεια της HPLC-DAD, έγινε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων του δενδρολίβανου. Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα που συλλέχθηκαν και οι χρόνοι έκλουσης των συστατικών. Τα φάσματα που παρατηρούνται στις ποικιλίες, με παρόμοιο χρόνο έκλουσης των κορυφών, συγκρίθηκαν με αντίστοιχα φάσματα στη βιβλιογραφία, με σκοπό την ταυτοποίηση των ουσιών. Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή αναλύθηκαν μέσω της μεθόδου Flan, και τα φαινολικά διτερπένια, με τη χρήση της μεθόδου Carnosic.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα φάσματα των φαινολικών οξέων, με σύγκριση των φασμάτων UV και των χρωματογραφημάτων με αυτά της βιβλιογραφίας. Το πρώτο συστατικό που μελετήθηκε ήταν το καφεϊκό οξύ. Στη βιβλιογραφία το καφεϊκό οξύ εμφανίζει στο φάσμα του κορυφή στα 324 nm (Chen et al 2011). και στο δενδρολίβανο είναι από τα πρώτα φαινολικά οξέα που εκκλύονται. Στην παρούσα εργασία, σε όλα τα εκχυλίσματα, για όλες τις καλλιέργειες δενδρολίβανου, στη Flav, εμφανιζόταν, με χρόνο έκλυσης περίπου 13.27±0.51 min, ένα φαινολικό οξύ με κορυφή 324 nm. Το συστατικό αυτό ταυτοποιήθηκε ως το καφεϊκό οξύ. Επιπλέον, το πιο χαρακτηριστικό φαινολικό οξύ που εκχυλίζεται από το δενδρολίβανο είναι το ροσμαρινικό οξύ. Στην παρούσα εργασία, το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει χρόνο εκχύλισης στα 35.82±0.68 min, γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία. Στην εικόνα 2, φαίνονται τα φάσματα UV του ροσμαρινικού οξέος και του καφεϊκού οξέος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των φλαβονοειδών αγλυκόνων και γλυκοζιτών που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου. Τα φλαβονοειδή διακρίθηκαν σε δύο κατηγορίες, σε αυτά που εντοπίστηκαν στα ακετονικά εκχυλίσματα και σε αυτά που εντοπίστηκαν στα υδατικά. Για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών αγλυκόνων και γλυκοζιτών, εξετάστηκε η βιβλιογραφία αναφορικά με τους χρόνους έκλυσης των φλαβονοειδών και μελετήθηκαν τα χρωματογραφήματά της. Στη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι το ροσμαρινικό οξύ εκκλύεται περίπου στο μέσο του χρωματογραφήματος και τα φλαβονοειδή εκκλύονται σε όλο το φάσμα του. Δύο ζώνες εκκλυόμενων φλαβονοειδών διαχωρίστηκαν· οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες, οι οποίες εμφανίζουν χρόνο έκλυσης, κατά κύριο λόγο, μεγαλύτερο από αυτό του ροσμαρινικού οξέος και τους γλυκοζίτες φλαβονοειδών οι οποίοι εκκλύονται πρώτοι. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν τέσσερις (4) αγλυκόνες και δύο (2) γλυκοζίτες.

Τα φλαβονοειδή που εκχυλίστηκαν με την ακετόνη είναι οι αγλυκόνες, καθώς έχουν χαμηλή πολικότητα. Για αυτό, εκκλύονται στο τέλος του χρωματογραφήματος. Είναι γνωστό ότι, ανάμεσα στις φλαβόνες του δενδρολίβανου, διάφορα μέλη περιέχουν τρι-υδροξύλο υποκατάσταση στο A δακτύλιο και μονο-υδροξύλο υποκατάσταση στον B δακτύλιο, όπως για παράδειγμα η σκουτελλαρεΐνη (4',5,6,7-υδροξυ-υποκατάσταση). Η σκουτελλαρεΐνη και τα παράγωγά της εμφανίζουν φάσματα UV παρόμοια με αυτά των ενώσεων α, β και δ της εικόνας 1, όπως αναφέρονται από τους Liu et al (2018) και Ávila-Reyes et al (2018). Παρόλα αυτά, οι παραπάνω ενώσεις μπορεί να είναι μόνο μεθυλιωμένα παράγωγα της σκουτελλαρεΐνης, καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους έκλυσης από αυτήν. Για παράδειγμα, ο χρόνος έκλυσης της απιγενίνης (υποκατεστημένης με 3 υδροξύλια) αντιστοιχεί στα 48.6 min, της λουτεολίνης (υποκατεστημένης με 4 υδροξύλια) στα 42.4 min, άρα της σκουτελλαρεΐνης, επίσης με 4 υδροξύλια, δεν γίνεται να εμφανίζεται πριν τα 41-43 min.

Υπάρχουν 3 υποψήφια ουσίες που παρουσιάζουν παρόμοια φάσματα με την ένωση α, η ισπιδουλίνη, η 5,7 διμεθυλ-σκουτελλαρεΐνη και η κισιμαριτίνη. Η ισπιδουλίνη με μονο-μεθύλυ, τρι-υδροξυ υποκατάσταση θα μπορούσε να είναι η δομή της ένωσης α, καθώς το μέγιστο της Ζώνης I της ισπιδουλίνης καταγράφεται στην βιβλιογραφία ανάμεσα στα 334-338 nm και της Ζώνης II στα 276 nm (Lee et al 2015; Lewenhofer et al 2018; Osei-Safo et al 2009; Williams et al 2003). Οι Williams et al. (2003) αναφέρουν ότι το μέγιστο μήκος κύματος για την 5,7 διμεθυλ-σκουτελλαρεΐνη είναι στα 274 και 330 nm, αλλά τα 330 nm είναι αρκετά χαμηλότερα από αυτά που εμφανίζονται στο φάσμα UV των ενώσεων. Μια άλλη πιθανή υποψήφια ένωση είναι η κισιμαριτίνη, ένα γνωστό παράγωγο της διμεθοξυ-σκουτελλαρεΐνης που εμφανίζεται στο δενδρολίβανο. Η κισιμαριτίνη είναι πιθανό να αντιστοιχεί στην ουσία καθώς έχει Ζώνη II στα 274-278 nm και Ζώνη I στα 334-336 nm, που ταυτίζονται με αυτά του φάσματος UV της ουσίας.

Η κορυφή της ουσίας β εκλύεται περίπου 1 λεπτό μετά την κορυφή α, γεγονός που υπονοεί παρόμοια πολικότητα με αυτήν της ουσίας α. Μια τρίτη μεθυσίωση της σκουτελλαρεΐνης είναι πιθανό να καθιστά την ένωση λιγότερο πολική και η έκλουσή της αναμένεται μερικά λεπτά αργότερα. Η ουσία β παρουσιάζει μέγιστα στα 286 και 334 nm, γεγονός που ταυτίζεται με την λαδανεΐνη, η οποία εμφανίζει μέγιστα στα 286 και 335 nm (Martin-Benlloch et al. 2018). Η λαδανεΐνη είναι ένα παράγωγο της διμεθυλ-σκουτελλαρεΐνης, με μεθυσίωση στα 7- και 4'- υδροξύλια. Επιπλέον, τα φάσματα των δύο ουσιών είναι πανομοιότυπα, και η ουσία β μπορεί να ταυτοποιηθεί με ασφάλεια ως η λαδανεΐνη.

Η ένωση δ είναι εμφανώς λιγότερο πολική από την α και την β, καθώς εκλύεται περίπου 3 λεπτά μετά την κορυφή β. Ένα πιθανό υποψήφιο θα μπορούσε να είναι ένα παράγωγο της τριμεθυλ-σκουτελλαρεΐνης. Η ένωση δ εμφανίζει μέγιστα στα 277 και 332 nm και οι Martin-Benlloch et al.(2018) αναφέρουν ότι η ουσία σαλβιγενίνη εμφανίζει μέγιστα στα 276 και 332 nm, παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της ουσίας δ. Η πιθανότητα η κορυφή δ να αντιστοιχεί στην σαλβιγενίνη ενισχύεται από τους Del Pilar Sanchez-Camargo et al.(2014), οι οποίοι παραθέτουν μέγιστα για την σαλβιγενίνη στα 276 και 331 nm.

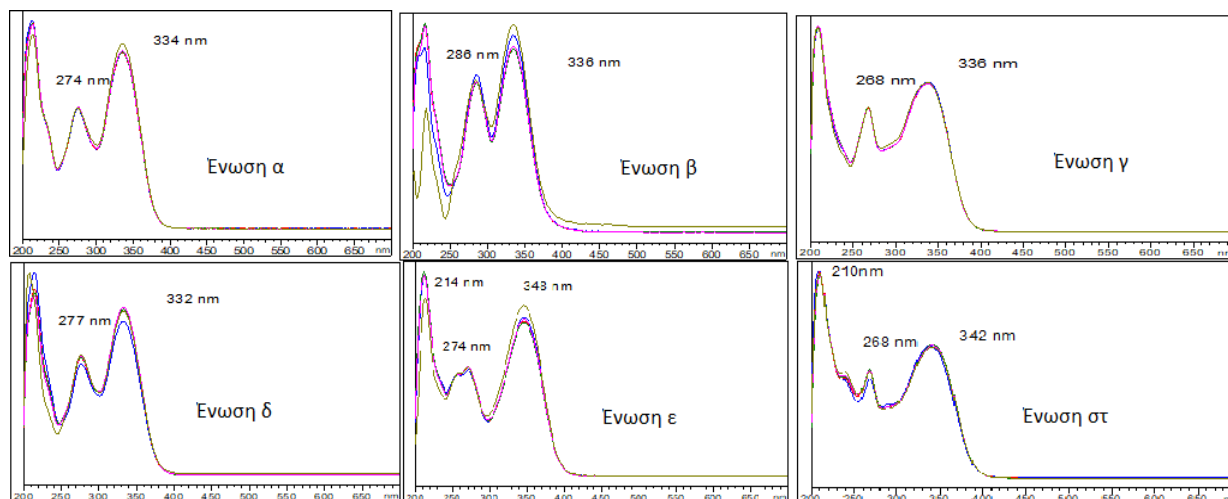
Η ουσία γ εμφανίζει ένα φάσμα που θυμίζει την απιγενίνη και εκλύεται περίπου στα  $49.65 \pm 0.51$  min. Η απιγενίνη εμφανίζει χρόνο έκλουσης στα 48.6 min και μέγιστα φάσματος στα 268 και 338 nm. Η 4'-μεθυλ-απιγενίνη (ακακετίνη) εκλύεται στα 50.5 min, και εμφανίζει φάσμα τύπου απιγενίνης, αλλά τα μέγιστά της είναι στα 268 και 334 nm. Επομένως, η ένωση γ θα μπορούσε να είναι ένα άλλο παράγωγο της μονο-μεθυλωμένης απιγενίνης, όπως η γκενγκουανίνη. Γκενγκουανίνη είναι ένα παράγωγο της μονο-μεθυλωμένης απιγενίνης, γνωστό συστατικό που συναντάται στο δενδρολίβανο (Almela et al, 2006; Del Baño et al, 2004; Cuvelier et al, 1996; Lee et al, 2015; Shu et al, 2014) με μέσο μέγιστο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία στα 268 και 338 nm. Ο ελαφρά υψηλότερος χρόνος έκλουσης της κορυφής γ, επίσης υποδεικνύει την γκενγκουανίνη σε σχέση με την ακακετίνη.

Τα φλαβονοειδή που εκχυλίστηκαν από το δενδρολίβανο με το νερό είναι οι ενώσεις με τη υψηλότερη πολικότητα. Στην εργασία αυτή, ταυτοποιήθηκαν δύο φλαβονοειδή στα υδατικά εκχυλίσματα. Η ένωση ε εμφανίζει φάσμα UV τύπου λουτεολίνης με τιμές  $\lambda_{\max}$  στα 272 και 346 nm. Η ένωση ε ταυτοποιήθηκε ως η νεπιτρίνη (6-μεθοχουλοτεολίνη-7-γλουκοζιτής) λόγω των τιμών του  $\lambda_{\max}$  και της μορφής του φάσματος UV, οι οποίες ταυτίζονται με αυτές τις βιβλιογραφίας (Lee et al, 2018; Lewenhofer et al, 2018; Olennikov et al, 2019; Ren et al, 2014) όπως και η αναμενόμενη έκλυση πριν από το ροσμαρινικό οξύ (Lee et al, 2018; Ren et al, 2014). Η ένωση στ έχει ένα φάσμα UV τύπου φλαβόνης, με αντίστοιχα μέγιστα στα 268 και 340 nm. Η ένωση ταυτοποιήθηκε ως την ισοσκουτελλαρεΐνη (4',5,7,8-τετραυδροξυφλαβόνη). Στην βιβλιογραφία, η ένωση αυτή εκλύεται λίγο αργότερα από το ροσμαρινικό οξύ γύρω στα 40.1 min και έρχεται σε συμφωνία με την ένωση στη παρούσα εργασία, η οποία έχει χρόνο έκλουσης στα 38.82 min.

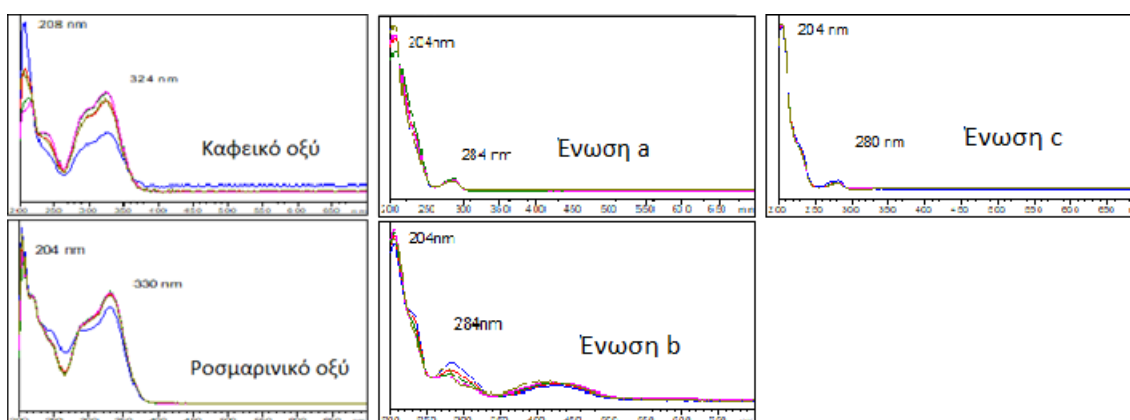
Τέλος, μελετήθηκαν τα φαινολικά διτερπένια και ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος σύγκρισης των φασμάτων UV και των χρωματογράφων. Τρία φαινολικά διτερπένια ταυτοποιήθηκαν με την χρήση της HPLC. Η ένωση α η οποία εκλύεται πρώτη σε χρόνο περίπου  $6.56 \pm 0.27$  min με τη μέθοδο CARNOSIC εμφανίζει μέγιστο στα 284 nm και αντιστοιχεί στην καρνοσόλη. Το καρνοσικό οξύ εμφανίζει χαρακτηριστικό χρόνο έκλουσης περίπου  $9.92 \pm 0.41$  min και σύμφωνα με το χρωματογράφημα και το φάσμα UV αντιστοιχεί στην ένωση β. Στη βιβλιογραφία, εμφανίζεται στο τέλος του χρωματογραφήματος το φαινολικό διτερπένιο καρνοσικός μεθυλεστερας με χαρακτηριστικό μέγιστο στα 280 nm (Naroli et al 2015) και στην παρούσα εργασία η ένωση c παρουσιάζει μέγιστο στα 280 και είναι το τελευταίο



φαινολικό διτερπένιο που εκλύεται. Είναι, λοιπόν, πιθανό η ένωση c να ταυτοποιείται ως καρνοσικός μεθυλεστέρας.



Εικόνα 7.1 Φάσματα UV τακτοποιημένων φλαβονοειδών



Εικόνα 7.1 Φάσματα UV τακτοποιημένων φαινολικών οξέων και φαινολικών διτερπενίων

Οι χρόνοι έκλυσης φαίνονται στον πίνακα 7.5.

Πίνακας 7.5. Χρόνοι έκλυσης ταυτοποιημένων ουσιών με την μέθοδο HPLC

Ουσία	Χρόνος Έκλυσης (min)
<b>Ταυτοποίηση με μέθοδο Flan</b>	
Ροσμαρινικό Οξύ	35.82±0.68
Καφεϊκό οξύ	13.27±0.51
Κιρσιμαριτίνη	46.99±0.41
Λαδανεΐνη	47.95±0.42
Γκενκβανίνη	49.65±0.51
Σαλβιγενίνη	50.91±0.57
Ισοσκοτελλαρεΐνη	38.82±0.74

Νεπιτρίνη	32.66±0.36
<b>Ταυτοποίηση με μέθοδο Carnosic</b>	
Καρνοσικό οξύ	9.92±0.41
Καρνοσόλη	6.56±0.27
Καρνοσικός μεθυλεστέρας	13.30±0.59

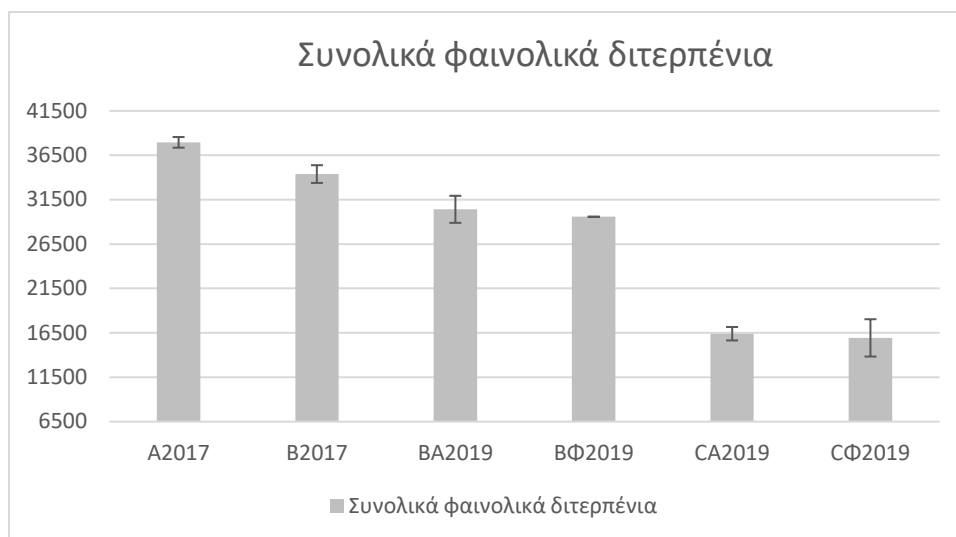
## 7.5 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών με την μέθοδο HPLC

Σε όλα τα εκχυλίσματα έγινε ανάλυση στην HPLC-DAD, ώστε να γίνει ταυτοποίηση της σύστασης τους σε φαινολικά διτερπένια, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Παράλληλα, επειδή τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin- Ciocalteu επηρεάζονται από άλλες ουσίες, πέρα από τα φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος, η χρήση της HPLC ενισχύει τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσον αφορά και στην ποσοτικοποίηση. Σε όλων των ειδών τα εκχυλίσματα και τα αφεψήματα έγινε επεξεργασία με τις μεθόδους FLAV και CARNOSIC που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 6.3.6. Με τη χρήση της FLAV ποσοτικοποιήθηκαν το ροσμαρινικό οξύ και τα φαινολικά οξέα σε mg/kg ξηρής βάσης φυτού και οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες σε mg ισοδύναμων ρουτίνης/kg ξηρής βάσης φυτού και οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες σε mg ισοδύναμων κερκετίνης/kg ξηρής βάσης φυτού, ενώ με την CARNOSIC μελετήθηκαν τα φαινολικά διτερπένια και ειδικά το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη άλλα και τα μικρότερα σε mg /kg ξηρής βάσης φυτού.

### 7.5.1 Ποσοτικοποίηση Φαινολικών διτερπενίων με την μέθοδο HPLC

Πίνακας 7.6 Ποσοτικοποίηση των φαινολικών διτερπενίων των ποικιλιών με την μέθοδο HPLC

Χημική ουσία	Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών(mg/kg ξηρής βάσης φυτού)					
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
Καρνοσικό οξύ	29798±430	28818±859	25862±1359	21871±938	12359±145	9670±1253
Καρνοσόλη	5386±1119	3530±97	3441±310	5064±890	2667±791	3861±345
Καρνοσικός Μεθυλεστέρας	822±215	1253±35	1110±19	1134±8	1377±50	1367±182
Μη ταυτοποιημένα	1949	783	-	1505	-	1035
Συνολικά φαινολικά διτερπένια	37955±600	34384±999	30414±1524	29573±1088	16403±759	15933±2103

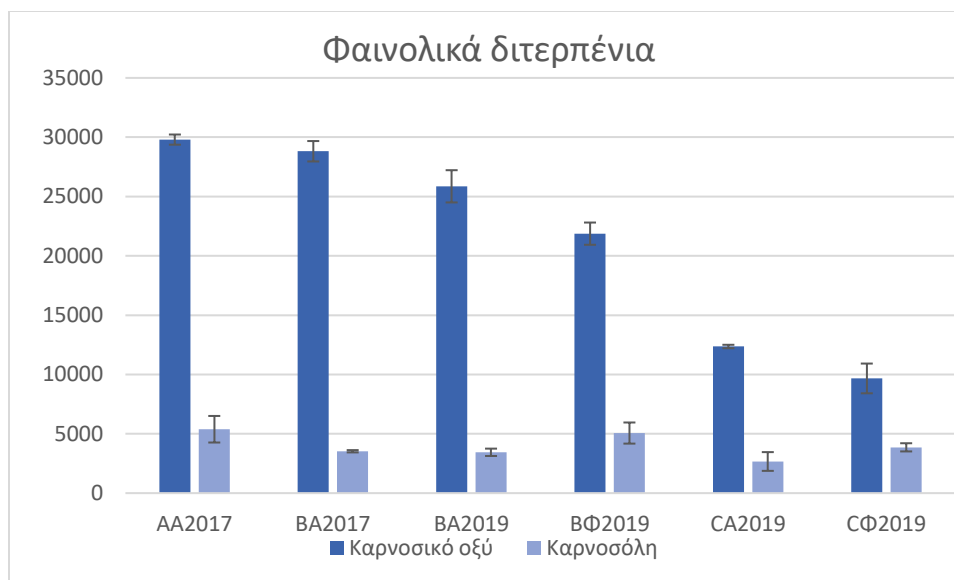


**Γράφημα 7.11 Ανάλυση των συνολικών φαινολικών διτερπενίων των ποικιλιών**

Στο γράφημα 7.11 παρουσιάζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης των φαινολικών διτερπενίων των δειγμάτων. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στο δείγμα A<sub>A2017</sub> και η χαμηλότερη στο δείγμα C. Οι ποικιλίες A και B, τη χρονιά 2017, εμφανίζουν σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις τους όσον αφορά τα συνολικά φαινολικά διτερπένια. Από την άλλη η ποικιλία C έχει μικρότερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών διτερπενίων σε σχέση με τη ποικιλία B και τον Μάιο και τον Οκτώβριο.

Επιπλέον η ποικιλία B εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό της σε φαινολικά διτερπένια τη χρονιά 2017 και η μείωση των φαινολικών διτερπενίων ανάμεσα στην χρονιά 2017 και 2019 είναι αισθητή. Συγκρίνοντας την ποικιλία B και την ποικιλία C δεν παρουσιάζεται μεταβολή της ποσότητας των φαινολικών διτερπενίων τους από την άνοιξη στο φθινόπωρο του 2019.

Ακολούθως, μελετήθηκαν, σε σχέση με την ποσοτικοποίησή τους μέσω της HPLC, τα πιο σημαντικά από τα φαινολικά διτερπένια που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα, δηλαδή το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και ο καρνοσικός μεθυλεστέρας.



**Γράφημα 7.12 Ανάλυση του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης των ποικιλιών**

Από τον πίνακα 7.6 είναι ιδιαίτερα αισθητό ότι το καρνοσικό οξύ αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της συγκέντρωσης των φαινολικών διτερπενίων στα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το καρνοσικό οξύ είναι το πιο χαρακτηριστικό φαινολικό διτερπένιο στο δενδρολίβανο, γεγονός που συνάδει με τα πειραματικά δεδομένα (Zheng 2001). Στο γράφημα 7.12 φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα καρνοσικού οξέος αντιστοιχεί στο δείγμα A<sub>A2017</sub> και στο δείγμα B<sub>A2017</sub> και η χαμηλότερη στο δείγμα C<sub>Φ2019</sub>. Η ποικιλία B παρουσιάζει παρεμφερή τιμή συγκέντρωσης σε σχέση με την ποικιλία A το 2017, ενώ το 2019 εμφανίζει μείωση. Η ποικιλία B τον Οκτώβριο του 2019 έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση της.

Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζει η ποικιλία C, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση καρνοσικού οξέος να εμφανίζεται την άνοιξη του 2019 και τη χαμηλότερη το Φθινόπωρο. Επίσης η ποικιλία C έχει πολύ χαμηλότερη ποσότητα καρνοσικού οξέος από την ποικιλία B και τις δύο εποχές συγκομιδής. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συνάδουν με τα αποτελέσματα τις βιβλιογραφίας, όπου το καρνοσικό οξύ εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση την άνοιξη από το φθινόπωρο (Yeddes et al 2019) Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι τα δείγματα των πειραμάτων και της βιβλιογραφίας προέρχονται από διαφορετικές χώρες και ποικιλίες.

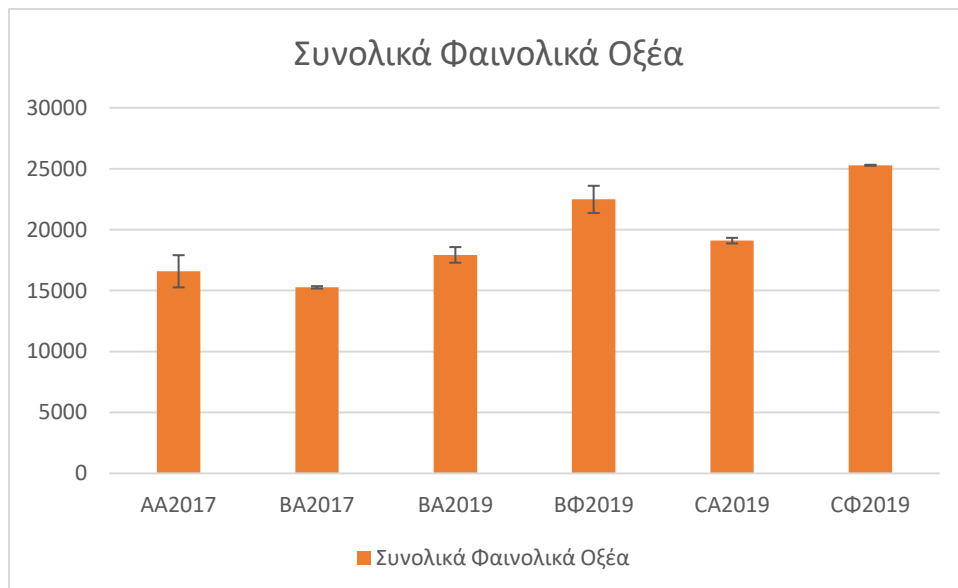
Το επόμενο φαινολικό διτερπένιο που μελετήθηκε είναι η καρνοσόλη, η οποία εμφανίζει της υψηλότερες συγκεντρώσεις μετά το καρνοσικό οξύ. Όσον αφορά την καρνοσόλη, η μεγαλύτερη ποσότητα της αντιστοιχεί στα δείγματα A<sub>A2017</sub> και B<sub>Φ2019</sub> και η χαμηλότερη στο δείγμα C<sub>A2019</sub>. Η ποικιλία B παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση καρνοσόλης το φθινόπωρο του 2019 παρόμοια με αυτή της ποικιλίας A. Την άνοιξη του 2019 και του 2017 η ποικιλία B εμφανίζει παρόμοια ποσά καρνοσόλης. Παράλληλα η ποικιλία C έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση της το φθινόπωρο του 2019 και την χαμηλότερη την άνοιξη.

Συγκρίνοντας τις ποικιλίες φαίνεται στο γράφημα 6.12 ότι όπως και με το καρνοσικό οξύ η ποικιλία B έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση καρνοσόλης από την C κατά την ανοιξιάτικη και την φθινοπωρινή συγκομιδή. Όμως σε αντίθεση με το καρνοσικό οξύ η ποικιλία A έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση από την ποικιλία B τη χρονιά 2017.

### 7.5.2 Ποσοτικοποίηση Φαινολικών οξέων με την μέθοδο HPLC

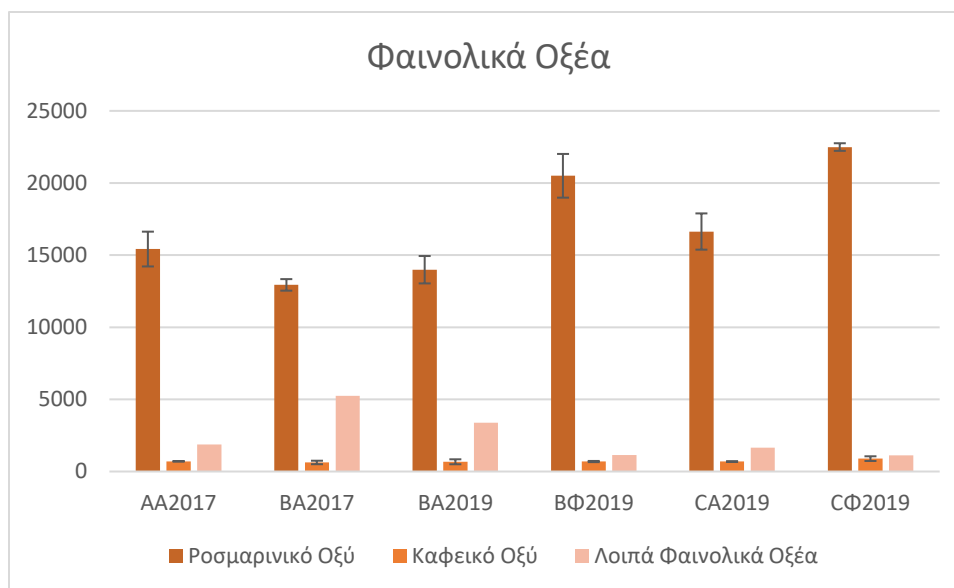
Πίνακας 7.7 Ποσοτικοποίηση των φαινολικών οξέων των ποικιλιών με την μέθοδο HPLC

Χημική ουσία	Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών(mg/kg ξηρής βάσης φυτού)					
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
Καφεϊκό οξύ	706±17	627±121	674±172	691±41	689±17	893±163
Ροσμαρινικό οξύ	15421±1206	12937±400	13989±950	20499±1515	16637±1256	22493±263
Μη ταυτοποιημένα	459	1702	3266	1295	1774	1900
<b>Συνολικά φαινολικά οξέα</b>	<b>16586±1322</b>	<b>15265±100</b>	<b>17928±642</b>	<b>22485±1118</b>	<b>19100±230</b>	<b>25286±41</b>



Γράφημα 7.13 Ανάλυση των φαινολικών οξέων των ποικιλιών

Στον πίνακα 7.7 και το γράφημα 7.13 παρουσιάζονται η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Όπως παρατηρείται στο γράφημα 7.13 στην περίπτωση των φαινολικών οξέων η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στο δείγμα C<sub>Φ2019</sub> και η χαμηλότερη στα δείγματα B<sub>A2017</sub> και A<sub>A2017</sub>. Οι ποικιλίες A και B την χρονιά 2017 εμφανίζουν ομοιότητα στην τιμή των συνολικών φαινολικών οξέων τους. Η ποικιλία B την άνοιξη του 2019 έχει μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με την άνοιξη του 2017 και εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση της το φθινόπωρο του 2019. Αντιστοίχως η ποικιλία C εμφανίζει μια αύξηση των φαινολικών οξέων κατά την φθινοπωρινή συγκομιδή σε σχέση με την ανοιξιάτικη. Επιπλέον η ποικιλία C και τον Μάιο και τον Οκτώβριο του 2019 παρουσιάζει μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών οξέων από την ποικιλία B και την ποικιλία A.



**Γράφημα 7.14** Ανάλυση του ροσμαρινικού οξέος και των λοιπών φαινολικών οξέων των ποικιλιών

Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν δύο φαινολικά οξέα. Αυτά είναι το ροσμαρινικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Όπως φαίνεται στο γράφημα 7.14, τα δείγματα του δενδρολίβανου που μελετήθηκαν είναι πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ. Τα πειραματικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία όσον αφορά το γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα φαινολικά οξέα (Zheng 2001). Μελετώντας το γράφημα 7.14 είναι φανερό ότι το δείγμα C<sub>Φ2019</sub> παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος, ενώ το δείγμα B<sub>A2017</sub> και το δείγμα B<sub>A2019</sub> τη χαμηλότερη. Την χρονιά 2017, η ποικιλία A εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος από την ποικιλία B. Η ποικιλία B όμως, εμφανίζει υψηλά ποσά ροσμαρινικού οξέος τον Οκτώβριο του 2019 σε αντίθεση με τον Μάιο ο οποίος έχει παραπλήσια συγκέντρωση με αυτή του 2017. Ανάλογη διακύμανση παρουσιάζει η ποικιλία C, με την ανοιξιάτικη συγκομιδή να φέρει αισθητά χαμηλότερη συγκέντρωση από αυτή της φθινοπωρινής. Στη βιβλιογραφία το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει τη χαμηλότερη ποσότητα του σε δείγματά από την Ελλάδα και την Τουρκία το Μάιο (Parageorgiou et al 2008; Baydar et al 2009), γεγονός σύμφωνο με τα πειράματά της παρούσας εργασίας.

Συγκρίνοντας τις δύο ποικιλίες ως προς την συγκέντρωσή τους σε ροσμαρινικό οξύ, γίνεται αντιληπτό ότι η ποικιλία C έχει μεγαλύτερη απόδοση σε ροσμαρινικό οξύ, σε σχέση με τη B, κατά την ανοιξιάτικη και την φθινοπωρινή συγκομιδή.

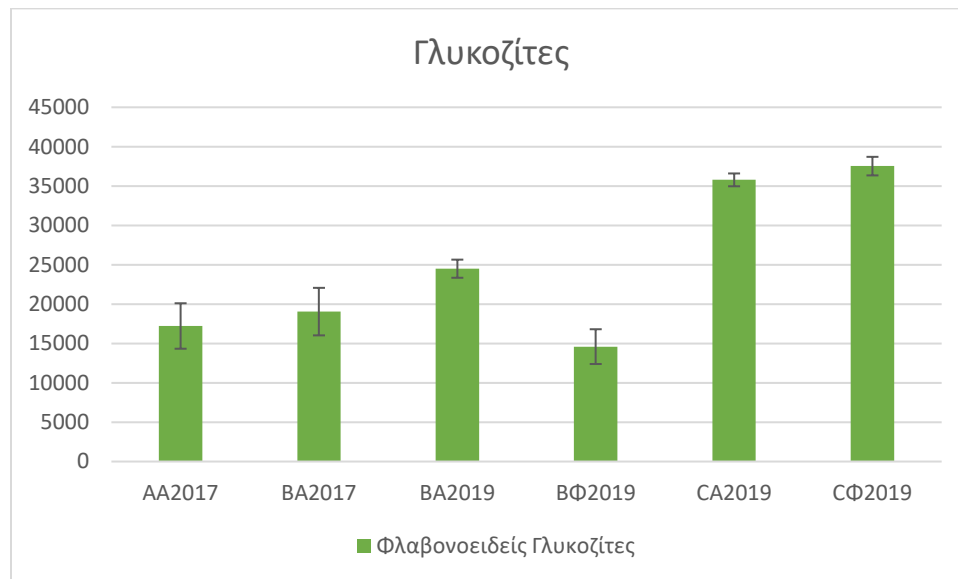
Το επόμενο φαινολικό οξύ που ταυτοποιήθηκε είναι το καφεϊκό οξύ. Στο πίνακα 7.7 φαίνεται ότι το καφεϊκό οξύ δεν εμφανίζει μεγάλη διαφοροποίηση στις ποικιλίες και τις εποχές. Συγκεκριμένα εμφανίζει κατά ελάχιστα την μεγαλύτερη συγκέντρωσή του στην ποικιλία C το φθινόπωρο του 2019. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην βιβλιογραφία (Baydar et al 2009)

### 7.5.3 Ποσοτικοποίηση Φλαβονοειδών με την μέθοδο HPLC

Τα φλαβονοειδή όπως αναφέρθηκε και στην ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών, διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: τις αγλυκόνες και τους γλυκοζίτες. Οι αγλυκόνες ανιχνεύτηκαν κατά κύριο λόγο στα ακετονικά εκχυλίσματα και μετρήθηκαν σε mg ισοδύναμων κερκετίνης/kg σε βάση ξηρού φυτού. Οι γλυκοζίτες εντοπίστηκαν στα υδατικά εκχυλίσματα και ποσοτικοποιήθηκαν σε mg ισοδύναμων ρουτίνης/kg σε βάση ξηρού φυτού.

Πίνακας 7.8 Ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών των ποικιλιών με την μέθοδο HPLC

Χημική ουσία	Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών					
	Α <sub>A2017</sub>	Β <sub>A2017</sub>	Β <sub>A2019</sub>	Β <sub>Φ2019</sub>	Σ <sub>A2019</sub>	Σ <sub>Φ2019</sub>
Κιρσιμαριτίνη	1798±126	2172±330	1884±326	1974±773	1757±126	1564±140
Λαδανεινή	1021±36	1251±196	949±111	854±224	1021±35	859±46
Γκενκουανίνη	1488±17	1093±180	498±12	1215±355	305±46	1061±169
Σαλβιγενίνη	1097±34	1165±211	885±16	2186±620	1097±34	2783±317
Νεπιτρίνη	2244±334	4405±506	5613±829	3780±128	10641±1874	8022±642
Ισοσκουτελλαρεΐνη	8972±1090	4922±693	8526±522	4358±413	10083±2611	11927±2806
Αγλυκόνες	5404±137	5591±545	4090±510	4696±65	5568±564	5930±39
Γλυκοζίτες	17216±2887	19043±3019	24493±1152	14596±2209	35779±815	37527±1178
Μη ταυτοποιημένα	6001	9716	10353	4934	15054	17579

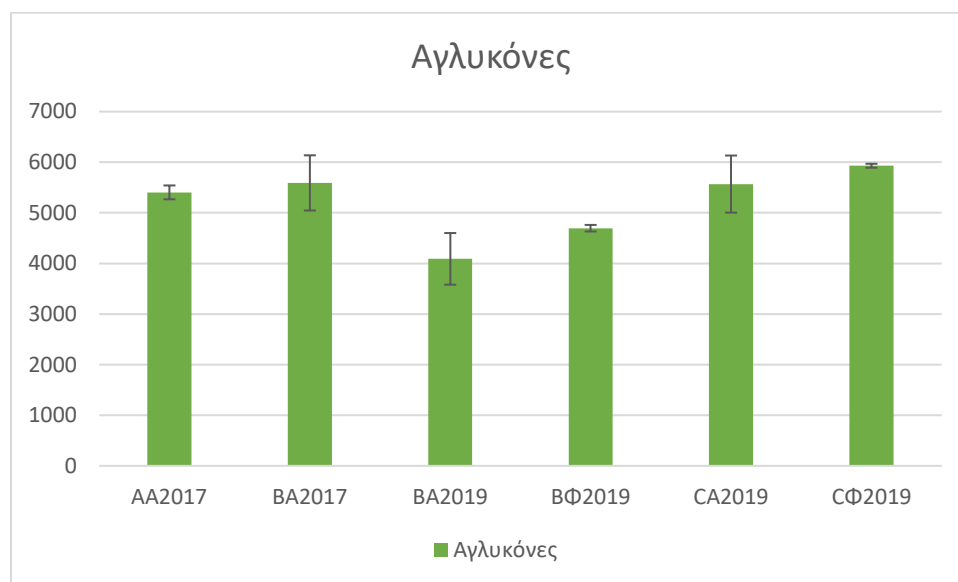


Γράφημα 7.15 Ανάλυση των φλαβονοειδών γλυκοζιτών των ποικιλιών

Στο γράφημα 7.15 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των γλυκοζιτών των ποικιλιών και η διακύμανση τους με βάση τα δείγματα. Η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκοζιτών συναντάται στην ποικιλία C και η χαμηλότερη στην ποικιλία B στην ανοιξιάτικη συγκομιδή. Η ποικιλία A το 2017 εμφανίζει παρόμοια συγκέντρωση με την ποικιλία B και η ποικιλία B παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση της την

άνοιξη του 2019. Η ποικιλία C παρουσιάζει μια πολύ μεγάλη ποσότητα γλυκοζιτών σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες και στις δύο εποχές. Μεταξύ τους οι δύο συγκομιδές στην ποικιλία C εμφανίζουν ομοιότητες στη συγκέντρωση των γλυκοζιτών κατά το φθινόπωρο και την άνοιξη.

Ο γλυκοζίτης που εμφανίζει την μεγαλύτερη ποσότητα ταυτοποιήθηκε ως η ισοσκουτελλαρεΐνη και ο επόμενος η νεπιτρίνη (Πίνακας 7.8). Η ποικιλία A όσο αφορά την ισοσκουτελλαρεΐνη παρουσιάζει πολύ υψηλή ποσότητα, ειδικά σε σχέση με την ποσότητα της νεπιτρίνης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ισοσκουτελλαρεΐνης εμφανίζεται κατά την ανοιξιάτικη συγκομιδή στην ποικιλία B ενώ στην ποικιλία C δεν συναντάται μεγάλη διαφοροποίηση στις δύο εποχές. Επιπλέον η ποικιλία C έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ισοσκουτελλαρεΐνης από την ποικιλία B και τον Μάιο αλλά και τον Οκτώβριο του 2019. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζει και η νεπιτρίνη όσο αφορά την συγκέντρωση της με τα δείγματα B<sub>A2017</sub> και C<sub>A2019</sub> να εμφανίζουν συγκεντρώσεις παραπλήσιες αυτών της ισοσκουτελλαρεΐνης.



**Γράφημα 7.16 Ανάλυση των φλαβονοειδών αγλυκόνων των ποικιλιών**

Στο γράφημα 7.16 παρουσιάζεται η διακύμανση της συγκέντρωσης των αγλυκόνων με βάση τα δείγματα που μελετήθηκαν. Με εξαίρεση τα δείγματα της ποικιλίας B το 2019 η συγκέντρωση των αγλυκόνων δεν διαφοροποιείται πολύ στα δείγματα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση το 2019 εμφανίζεται στην ποικιλία C και η χαμηλότερη στην ποικιλία B την ίδια χρονιά. Γενικά και στην ποικιλία B και στην ποικιλία C δεν παρουσιάζεται κάποια έντονη μεταβολή της συγκέντρωσης των αγλυκόνων από την ανοιξιάτικη στην φθινοπωρινή συγκομιδή. Η ποικιλία A το 2017 παρουσιάζει μια παρόμοια συγκέντρωση με την ποικιλία B την ίδια χρονιά, όπου και η ποικιλία B εμφανίζει την μεγαλύτερη της ποσότητα αγλυκόνων.

Η αγλύκωνη με την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλες της ποικιλίες ήταν αυτή που ταυτοποιήθηκε ως η κισιμαριτίνη (Πίνακας 7.8). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της εμφανίζεται το 2017 στην ποικιλία B και η χαμηλότερη της στην ποικιλία C κατά την φθινοπωρινή συγκομιδή του 2019. Όσο αφορά τις εποχές συγκομιδής η ποικιλία B εμφανίζει μια μικρή αύξηση κατά το φθινόπωρο, ενώ η ποικιλία C μια μείωση. Στις υπόλοιπες αγλυκόνες που ταυτοποιήθηκαν η διακύμανση της συγκέντρωσης κατά τις εποχές συγκομιδής είναι πιο σταθερή. Όλες οι άλλες αγλυκόνες, εκτός από την λαδανείνη, η οποία εμφανίζει

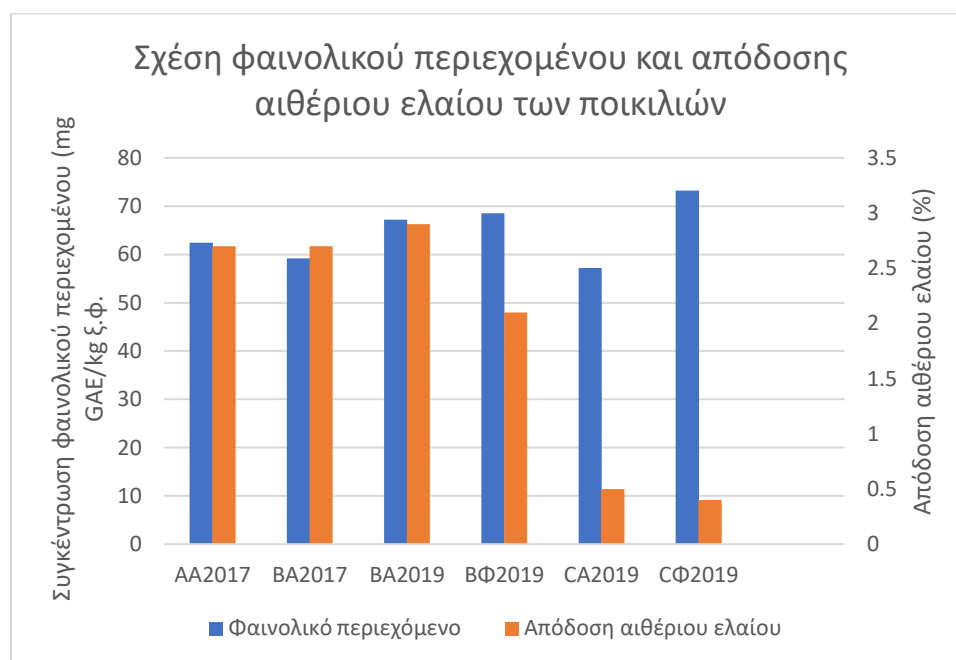


μείωση, παρουσιάζουν μια αύξηση της συγκέντρωσης τους το φθινόπωρο. Η γκεκουανίνη επιπλέον εμφανίζει μια ιδιομορφία καθώς είναι η μόνη αγλυκόνη η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στην ποικιλία Α. Επίσης η γκεκουανίνη παρουσιάζει μια μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης της στις ποικιλίες Β και C τον Μάιο του 2019 καθώς βρίσκεται σχεδόν σε ίχνη σε αυτά τα δείγματα.

## 7.6 Συσχέτιση των συστατικών του δενδρολίβανου

Πίνακας 7.9 Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών με τον όγκο του αιθέριου ελαίου του φυτού

	Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg GAE/kg σε ξηρή βάση φυτού)	Απόδοση Αιθέριου Ελαίου(%)
<b>A</b> <sub>A2017</sub>	62440±4272	2.7
<b>B</b> <sub>A2017</sub>	59194±3524	2.7
<b>B</b> <sub>A2019</sub>	67205±889	2.9
<b>B</b> <sub>Φ2019</sub>	68499±4923	2.1
<b>C</b> <sub>A2019</sub>	57191±992	0.5
<b>C</b> <sub>Φ2019</sub>	73260±2606	0.4



Γράφημα 7.18 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης του φαινολικού περιεχομένου και της απόδοσης του αιθέριου ελαίου

Μετά την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των κύριων συστατικών του δενδρολίβανου μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στο αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7.9 τον Μάιο που η ποικιλία C και B έχουν λιγότερα φαινολικά συστατικά, η απόδοση του αιθέριου ελαίου είναι μεγαλύτερη από αυτή του Οκτωβρίου. Φαίνεται λοιπόν ότι τα φυτά έχουν μεγαλύτερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο την άνοιξη, έναντι του φθινοπώρου όπου η αύξηση των φαινολικών συστατικών συνοδεύεται από μείωση της απόδοσης του αιθέριου ελαίου του

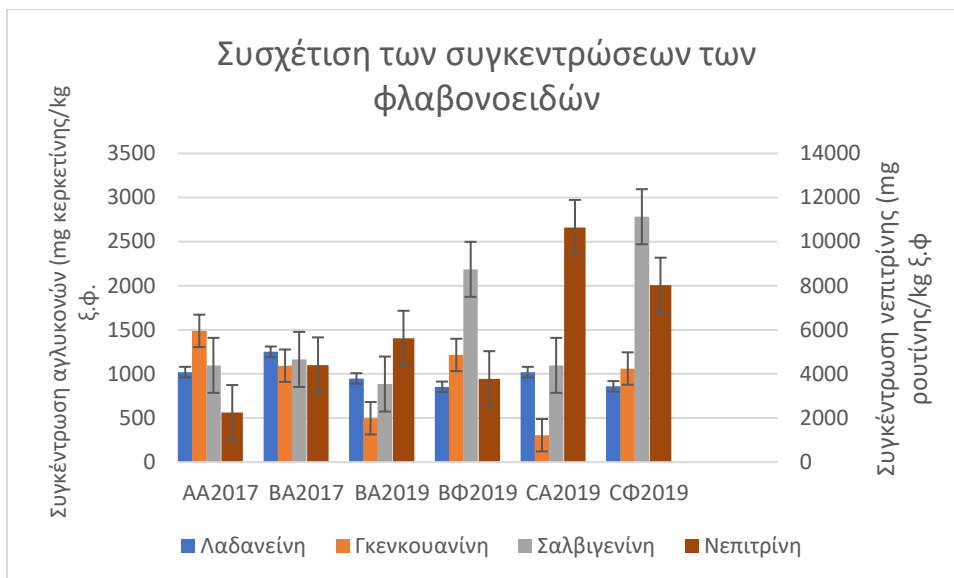
δενδρολίβανου. Όμως την άνοιξη του 2017 η ποικιλία Β έχει αισθητά μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών από το 2019, και η απόδοση του αιθέριου ελαίου είναι μικρότερη επίσης. Άρα δεν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ διαφορετικών ετών συγκομιδής. Επιπλέον η ποικιλία Α το 2017 παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικών συστατικών από την ποικιλία Β άλλα η απόδοση σε αιθέριο έλαιο των ποικιλιών είναι παρόμοια. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι η συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου και του αιθέριου ελαίου που εμφανίζεται στην ποικιλία Β και C, κατά τις συγκομιδές άνοιξης και φθινόπωρου, δεν αντιπροσωπεύει μια γενικευμένη συσχέτιση.

Πίνακας 7.10 Συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών του δενδρολίβανου

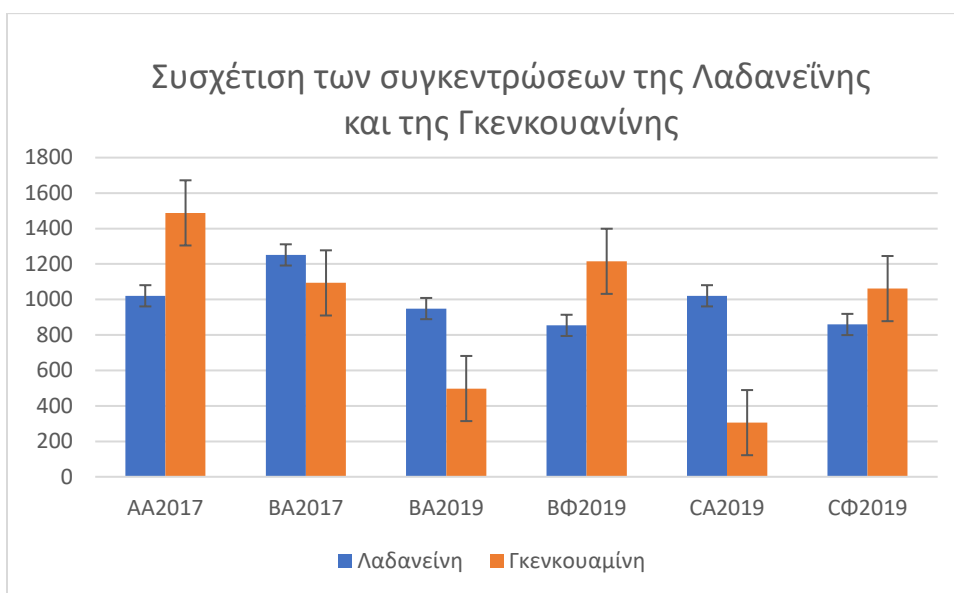
Ουσία	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
Καρνοσικό οξύ <sup>c</sup>	29798±430	28818±859	25862±1359	21871±938	12359±145	9670±1253
Λαδανεΐνη <sup>b</sup>	1021±36	1251±196	949±111	854±224	1021±35	859±46
Γκεκουανίνη <sup>b</sup>	1488±17	1093±180	498±12	1215±355	305±46	1061±169
Σαλβιγενίνη <sup>b</sup>	1097±34	1165±211	885±16	2186±620	1097±34	2783±317
Φλαβονοειδείς Αγλυκόνες <sup>b</sup>	5404±137	5591±545	4090±510	4696±65	5568±564	5930±39
Νεπιτρίνη <sup>a</sup>	2244±334	4405±506	5613±829	3780±128	10641±1874	8022±642
Ροσμαρινικό οξύ <sup>c</sup>	15421±1206	12937±400	13989±950	20499±1515	16637±1256	22493±263
Συνολικά Φαινολικά διτερπένια <sup>c</sup>	37955±600	34384±999	30414±1524	29573±1088	16403±759	15933±2103
Συνολικά Φαινολικά οξέα <sup>c</sup>	16586±1322	15265±100	17928±642	22485±1118	19100±230	25286±41

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>ισοδύναμα ρουτίνης/kg ξηρού φυτού <sup>b</sup>ισοδύναμα κερκετίνη/kg ξηρού φυτού <sup>c</sup>mg/kg ξηρού φυτού

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης και η συσχέτιση των συγκεντρώσεων των διάφορων φαινολικών συστατικών μεταξύ τους. Ιδιαίτερη εστίαση δόθηκε στο καρνοσικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και τα πιο σημαντικά από τα φλαβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν. Στον πίνακα 7.10 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των κύριων φαινολικών συστατικών που συναντιούνται στο δενδρολίβανο.



**Γράφημα 7.19** Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των ταυτοποιημένων φλαβονοειδών



**Γράφημα 7.20** Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων της γκεκουανίνης και της λαδανείνης

Δύο από τα φλαβονοειδή που συγκρίθηκαν είναι η λαδανείνη και η γκεκουανίνη. Συγκεκριμένα η λαδανείνη εμφανίζει το φθινόπωρο μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης της και η γκεκουανίνη μια μεγάλη αύξηση. Όσο αφορά τα δείγματα άνοιξης και φθινοπώρου, οι δύο αυτές ουσίες παρουσιάζουν μια ισχυρή αντίστροφη συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους, δεν παρατηρείται όμως η αντίστοιχη σχέση στο δείγμα Β της άνοιξης προηγούμενου έτους (BA<sub>2017</sub>). Το 2017 συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις της ποικιλίας Α σε λαδανείνη και γκεκουανίνη με αυτές της ποικιλίας Β παρατηρείται ότι η ποικιλία Α που έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση γκεκουανίνης, εμφανίζει και χαμηλότερη συγκέντρωση λαδανείνης. Σε

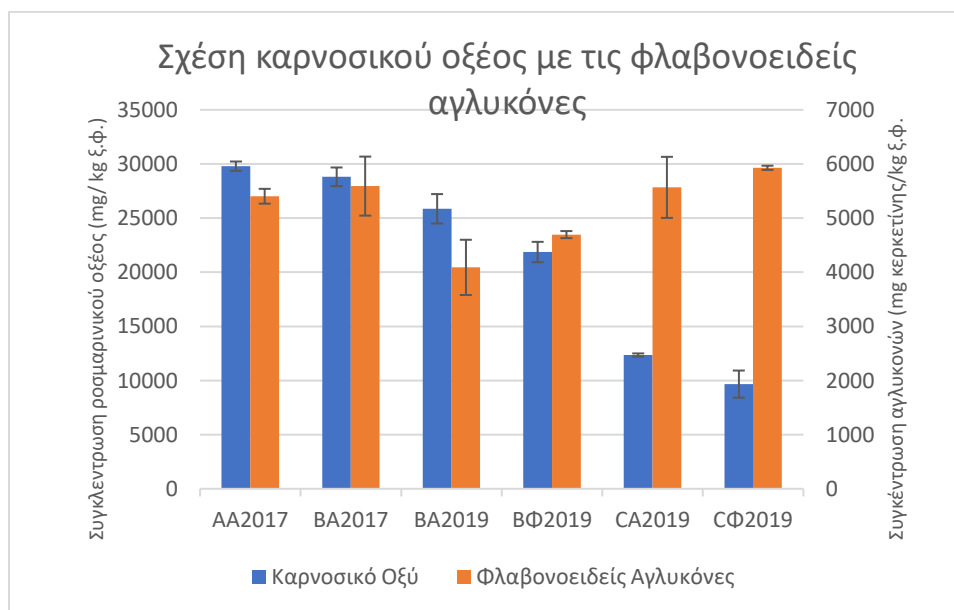
αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα η ποικιλία Β ενώ το 2017 εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά λαδανειίνης από το 2019, έχει ταυτόχρονα και μεγαλύτερη συγκέντρωση γκενκουανίνης.

Αντίστροφη συσχέτιση με τη λαδανειίνη παρουσιάζει και η σαλβιγενίνη, η οποία έχει παρόμοια διακύμανση με την γκενκουανίνη σε όλα τα δείγματα εκτός από το 2017. Συγκεκριμένα το 2017 ενώ η γκενκουανίνη έχει τη μεγαλύτερη της συγκέντρωση στην ποικιλία Α, η σαλβιγενίνη εμφανίζει μέγιστο στην ποικιλία Β.

Ένα άλλο φλαβονοειδές που μελετήθηκε η νεπιτρίνη, εμφανίζει μια διακύμανση της συγκέντρωσης της παρόμοια με αυτή της λαδανειίνης. Το 2019 στις ποικιλίες Β και C η νεπιτρίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την άνοιξη και χαμηλότερη κατά το φθινόπωρο. Όσο αφορά όμως το 2017 η νεπιτρίνη διαφοροποιείται σημαντικά από την λαδανειίνη καθώς η ποικιλία Α εμφανίζει χαμηλότερη συγκέντρωση από την ποικιλία Β, και η ποικιλία Β εμφανίζει μικρότερη συγκέντρωση εκείνη τη χρονιά σε σχέση με το 2019.

Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση της σαλβιγενίνης, της γκενκουανίνης, της λαδανειίνης και της νεπιτρίνης μεταξύ άνοιξης και φθινοπώρου αλλά δεν είναι γενικευμένη μεταξύ διαφορετικών ετών ή ποικιλιών.

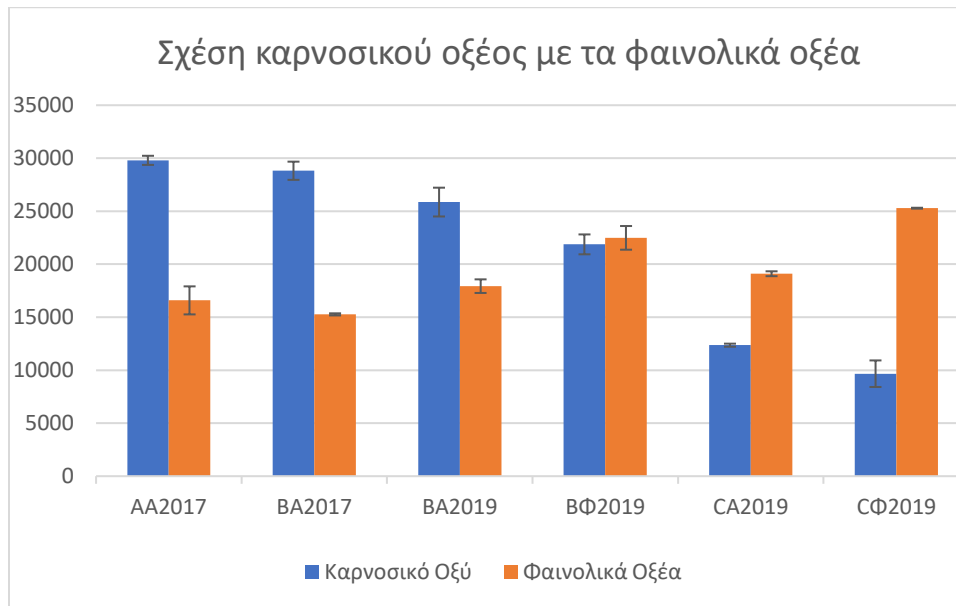
Το καρνοσικό οξύ είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά που συναντιούνται στο δενδρολίβανο. Γι' αυτό τον λόγο η συγκέντρωση του καρνοσικού οξέος συγκρίθηκε με τις συγκεντρώσεις των άλλων συστατικών που εκχυλίζονται με την ακετόνη, δηλαδή της φλαβονοειδείς αγλυκόνες άλλα και με συστατικά που εκχυλίζονται με το νερό, το ροσμαρινικό οξύ και τα φαινολικά οξέα.



**Γράφημα 7.21 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του καρνοσικού οξέος και των συνολικών φαινολικών αγλυκόνων**

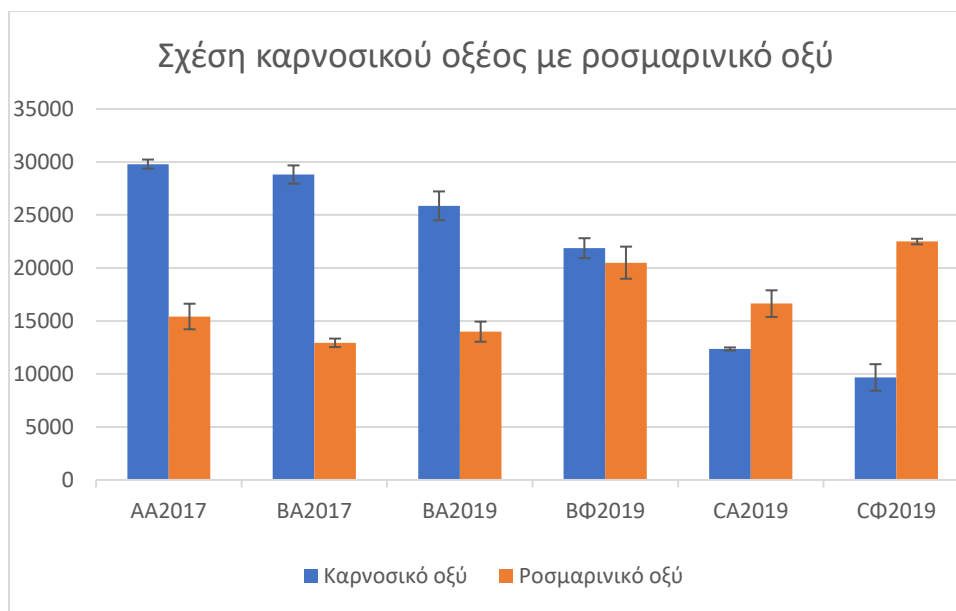
Στο γράφημα 7.21 παρουσιάζεται η διακύμανση του καρνοσικού οξέος με τη συγκέντρωση των συνολικών αγλυκονών. Οι αγλυκόνες εμφανίζουν μια σταθερότητα ή μικρή αύξηση της συγκέντρωσης του από την άνοιξη στο φθινόπωρο, αντίθετα με το καρνοσικό οξύ, το οποίο εμφανίζει μείωση. Επιπροσθέτως η ποικιλία Α έχει παρόμοια συγκέντρωση καρνοσικού οξέος με την ποικιλία Β και

παραπλήσια συγκέντρωση φαινολικών αγλυκονών. Η συσχέτιση μεταξύ του καρνοσικού οξέος και των φλαβονοειδών αγλυκονών που παρουσιάζεται δεν είναι γενικευμένη καθώς η ποικιλία Β το 2019 εμφανίζει χαμηλή συγκέντρωση και καρνοσικού οξέος και αγλυκονών σε σχέση με το 2017.



**Γράφημα 7.22 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του καρνοσικού οξέος και των συνολικών φαινολικών οξέων**

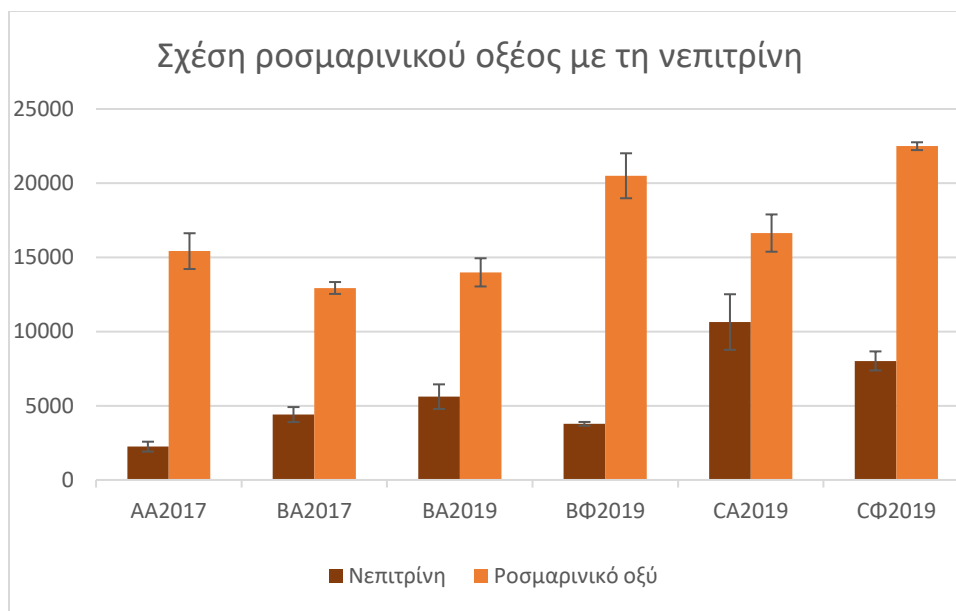
Όσο αφορά τα φαινολικά οξέα από το γράφημα φαίνεται ότι εποχικά έχουν μια αντίστροφη συσχέτιση με το καρνοσικό οξύ καθώς το φθινόπωρο οι ποικιλίες Β και C εμφανίζουν χαμηλότερη συγκέντρωση καρνοσικού οξέος και μεγαλύτερη φαινολικών οξέων σε σχέση με την άνοιξη. Επιπλέον η ποικιλία Β το 2017 έχει υψηλότερη συγκέντρωση καρνοσικού οξέος από το 2019 και χαμηλότερη συγκέντρωση φαινολικών οξέων.



**Γράφημα 7.23 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του καρνοσικού οξέος και του ροσμαρινικού οξέος**

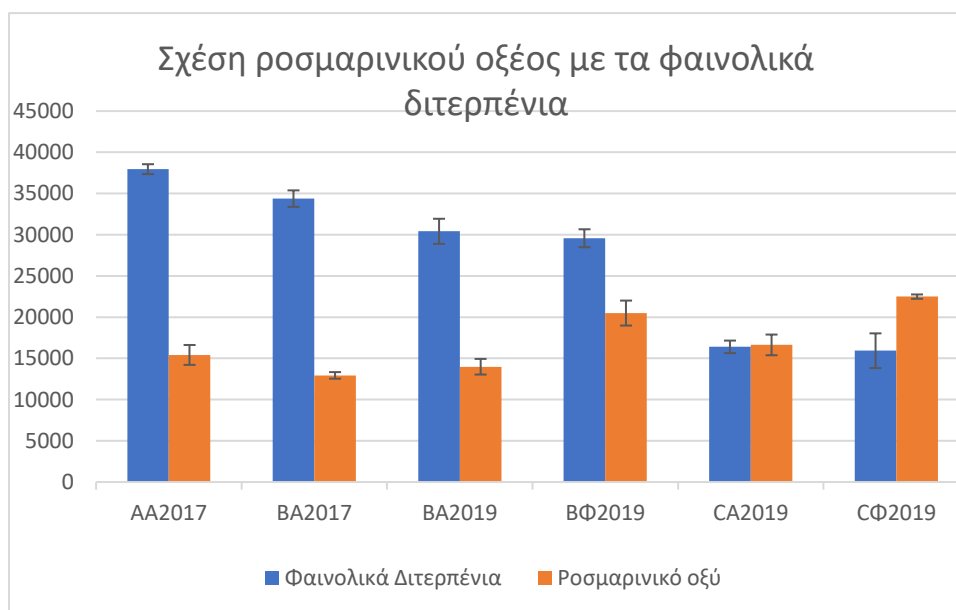
Η διακύμανση του καρνοσικού οξέος συγκρίθηκε με την εποχική διακύμανση του άλλου κύριου συστατικού του δενδrolίβανου, του ροσμαρινικού οξέος. Το ροσμαρινικό οξύ τον Μάιο, που το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποσότητα του, έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση και τον Οκτώβριο σε αντίθεση με το καρνοσικό οξύ εμφανίζει αύξηση στη συγκέντρωση του. Παρόμοια συσχέτιση εμφανίζεται και στην ποικιλία Β μεταξύ της χρονιάς 2017 και 2019 καθώς το ροσμαρινικό οξύ είναι σταθερό ή αυξάνεται ελάχιστα το 2019 και το καρνοσικό μειώνεται. Από αυτά τα δείγματα φαίνεται ότι υπάρχει μια καλή αντιστροφή συσχέτιση μεταξύ του καρνοσικού και του ροσμαρινικού οξέος αλλά δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην ποικιλία Α. Αυτή η συσχέτιση φαίνεται να συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Yeddes et al 2019)

Η ποικιλία Α παρά το γεγονός ότι έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση καρνοσικού οξέος, δεν έχει την χαμηλότερη συγκέντρωση ροσμαρινικού και ενώ έχει παρόμοια συγκέντρωση καρνοσικού οξέος με την ποικιλία Β το 2017, η ποικιλία Β έχει λιγότερο ροσμαρινικό οξύ από αυτή.



Γράφημα 7.24 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του ροσμαρινικού οξέος και της νεπιτρίνης

Το ροσμαρινικό οξύ συγκρίθηκε επιπλέον με το φλαβονοειδή γλυκοζίτη νεπιτρίνη. Στο γράφημα 7.24 φαίνεται ότι το φθινόπωρο το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ποικιλίες B και C από ότι την άνοιξη και η νεπιτρίνη χαμηλότερη συγκριτικά με την άνοιξη. Επίσης η ποικιλία B το 2019 παρουσιάζει μια σταθερότητα ή μικρή αύξηση στις συγκεντρώσεις αυτών των συστατικών σε σχέση με το 2017. Όμως το 2017 η ποικιλία A έχει χαμηλότερη συγκέντρωση νεπιτρίνης σε σχέση με την ποικιλία B αλλά μεγαλύτερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος. Φαίνεται λοιπόν ότι το 2019 υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση της ποσότητας της νεπιτρίνης και του ροσμαρινικού οξέος αλλά δεν είναι γενικευμένη σε όλες τις ποικιλίες και χρονιές.



Γράφημα 7.25 Σύγκριση εποχικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του ροσμαρινικού οξέος και των συνολικών φαινολικών διτερπενίων

Τέλος στο γράφημα 7.24 περιγράφεται η σχέση των διακυμάνσεων του ροσμαρινικού οξέος και των συνολικών φαινολικών διτερπενίων, συμπεριλαμβανόμενου και του καρνοσικού οξέος. Όπως προαναφέρθηκε το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει μια αύξηση της συγκέντρωσης του το φθινόπωρο ενώ τα συνολικά διτερπένια εμφανίζουν σταθερότητα ή μια μικρή μείωση. Επίσης η ποικιλία Β το 2017 έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων από το 2019 και παρόμοια ή ελαφρώς μικρότερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος, γεγονός που ενισχύει αυτή την αντίστροφη συσχέτιση. Όμως το 2017 η ποικιλία Α έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος και την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων σε σύγκρισή με την ποικιλία Β, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι η συσχέτιση αυτή δεν είναι γενικευμένη στο φυτό.

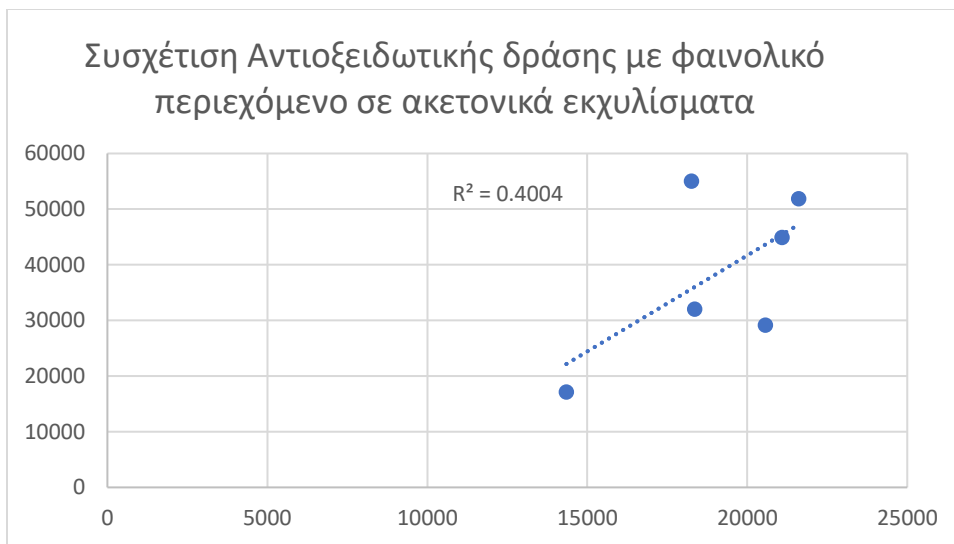
### 7.7. Συσχέτιση αντιοξειδωτικής δράσης με φαινολικο περιεχόμενο

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών του δενδρολίβανου καθώς και η ποσότητα τους. Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων επηρεάζεται από την ποσότητα των φαινολικών συστατικών ή από το είδος των φαινολικών συστατικών.

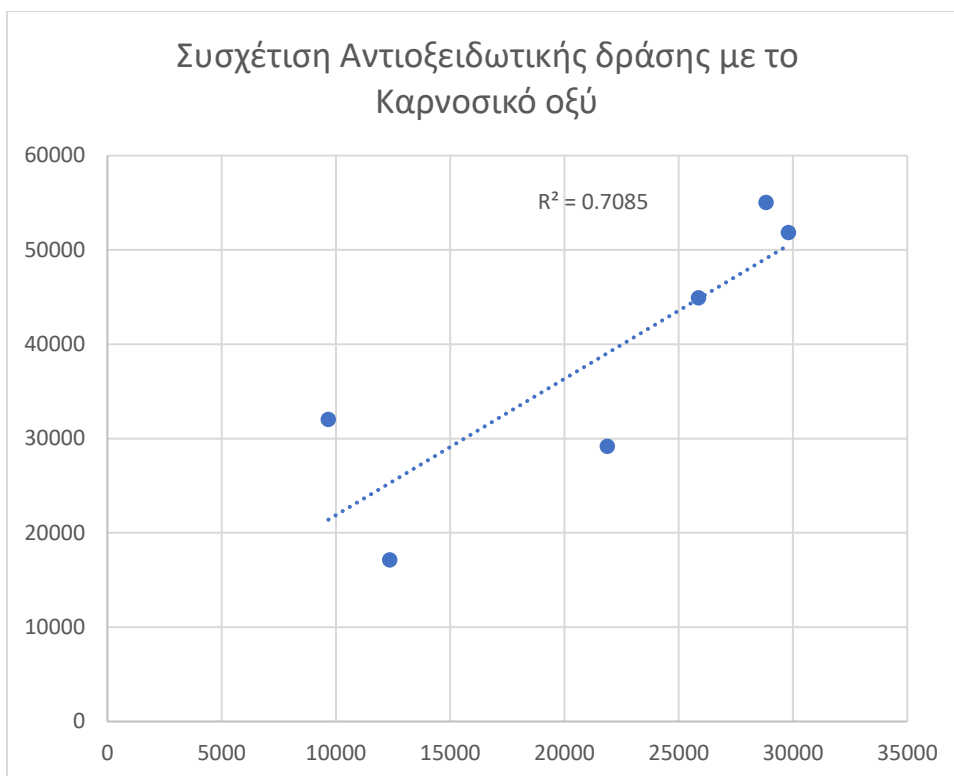
Πίνακας 7.11 Αντιοξειδωτική δράση των ακετονικών εκχυλισμάτων σε σχέση με το φαινολικο περιεχόμενό τους

	Αντιοξειδωτική ικανότητα(mg TE/kg σε ξηρή βάση φυτού)	Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg GAE/kg σε ξηρή βάση φυτού)	Συγκέντρωση Καρνοσικού οξέος (mg /kg σε ξηρή βάση φυτού)
<b>A</b> <sub>A2017</sub>	51839±4178	22287±2360	29798±430
<b>B</b> <sub>A2017</sub>	55008±4755	18257±1785	28818±859
<b>B</b> <sub>A2019</sub>	44919±3597	21087±624	25862±1359
<b>B</b> <sub>Φ2019</sub>	29177±1340	20565±2315	21871±938
<b>C</b> <sub>A2019</sub>	17128±945	14344±430	12359±145
<b>C</b> <sub>Φ2019</sub>	32038±2648	18354±19	9670±1253





**Διάγραμμα 7.8** Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής δράσης με φαινολικό περιεχόμενο στα ακετονικά εκχυλίσματα



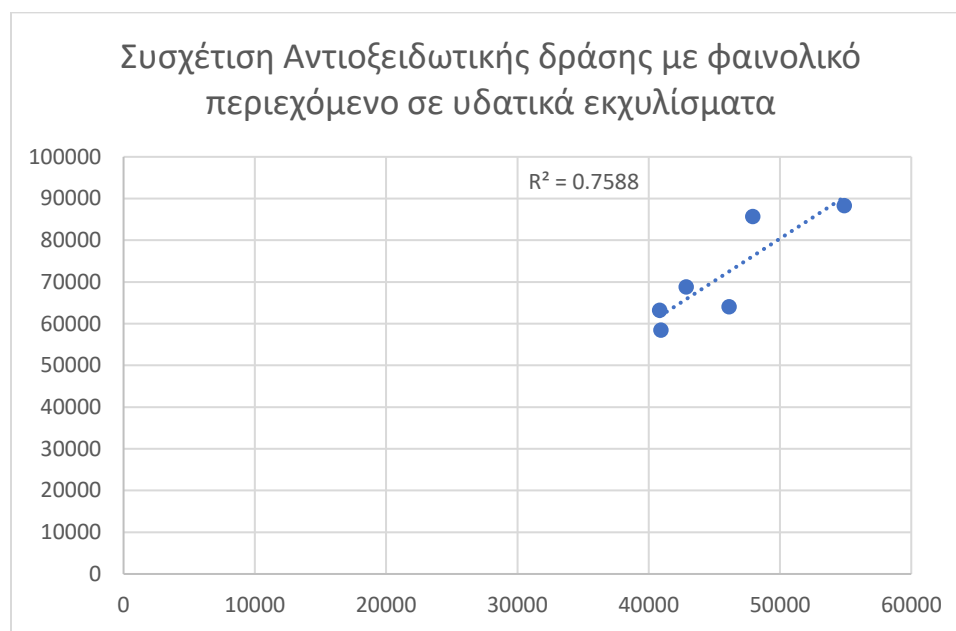
**Διάγραμμα 7.9** Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής δράσης με καρνοσικό οξύ στα ακετονικά εκχυλίσματα

Στο διάγραμμα 7.8 φαίνεται ότι το φαινολικό περιεχόμενο των ακετονικών εκχυλισμάτων, που αποτελείται κυρίως από τα φαινολικά διτερπένια, εμφανίζει μια πολύ αδύναμη συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση τους. Όμως το καρνοσικό οξύ το οποίο είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη

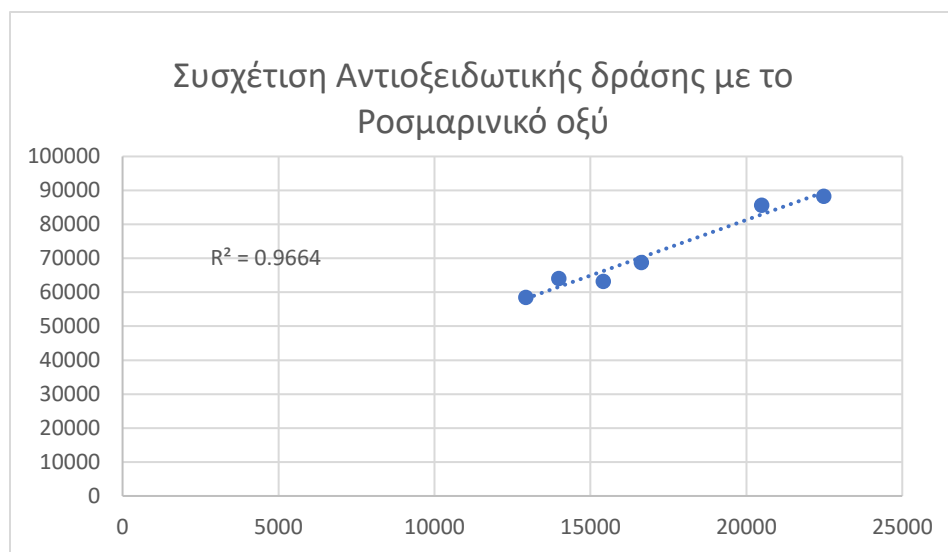
συγκέντρωση στα φαινολικά διτερπένια στο διάγραμμα 7.9 δείχνει να έχει μια καλύτερη συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αλλά όχι πολύ υψηλή. ( $R^2=0.71$ )

Πίνακας 7.12 Αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων σε σχέση με το περιεχόμενό τους σε φαινολικά συστατικά

	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mg TE/kg σε ξηρή βάση φυτού)	Συγκέντρωση Ροσμαρινικού οξέος (mg /kg σε ξηρή βάση φυτού)	Συγκέντρωση συνολικών φαινολικών συστατικών (mg GAE/kg σε ξηρή βάση φυτού)
<b>A</b> <sub>A2017</sub>	63265±2574	15421±1206	39726±3561
<b>B</b> <sub>A2017</sub>	58505±2496	12937±400	40937±3039
<b>B</b> <sub>A2019</sub>	64041±4606	13989±950	39296±634
<b>B</b> <sub>Φ2019</sub>	85713±9091	20499±1515	47935±4345
<b>C</b> <sub>A2019</sub>	68822±3640	16637±1256	42847±8943
<b>C</b> <sub>Φ2019</sub>	88339±7331	22493±263	54906±2606



Διάγραμμα 7.10 Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής δράσης με φαινολικό περιεχόμενο στα υδατικά εκχυλίσματα



**Διάγραμμα 7.11** Συσχέτιση Αντιοξειδωτικής δράσης με ροσμαρινικό οξύ στα υδατικά εκχυλίσματα

Στο διάγραμμα 7.10 παρουσιάζεται η συσχέτιση του φαινολικού περιεχομένου των υδατικών εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου. Τα υδατικά εκχυλίσματα φαίνεται λοιπόν ότι εμφανίζουν μια μέτρια συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης τους και του φαινολικού τους περιεχομένου. Το κύριο συστατικό τους, το ροσμαρινικό οξύ, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 7.11 παρουσιάζει μια γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

**Πίνακας 7.13** Συσχέτιση φαινολικών συστατικών με την αντιοξειδωτική δράση

Είδος συστατικού	Correlation Coefficient ( $r$ )	$R^2$
<b>Ακετονικά εκχυλίσματα</b>	0.63	0.39
<b>Καρνοσικό οξύ</b>	0.84	0.71
<b>Υδατικά εκχυλίσματα</b>	0.87	0.76
<b>Ροσμαρινικό οξύ</b>	0.98	0.96

Με την χρήση των παραπάνω δεδομένων προέκυψε ο συντελεστής συσχετισμού του φαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και ο πίνακας 7.13. Στον πίνακα 7.13 φαίνεται ότι η μεγαλύτερη συσχέτιση φαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική δράση συναντάται στα φαινολικά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα στο ροσμαρινικό οξύ.

Τα φαινολικά συστατικά των ακετονικών εκχυλισμάτων από τη άλλη εμφανίζουν μια κακή συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση παρόλο που το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει μια μέτρια συσχέτιση της συγκέντρωσής του με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

## 7.8 Εκλεκτικότητα εκχύλισης

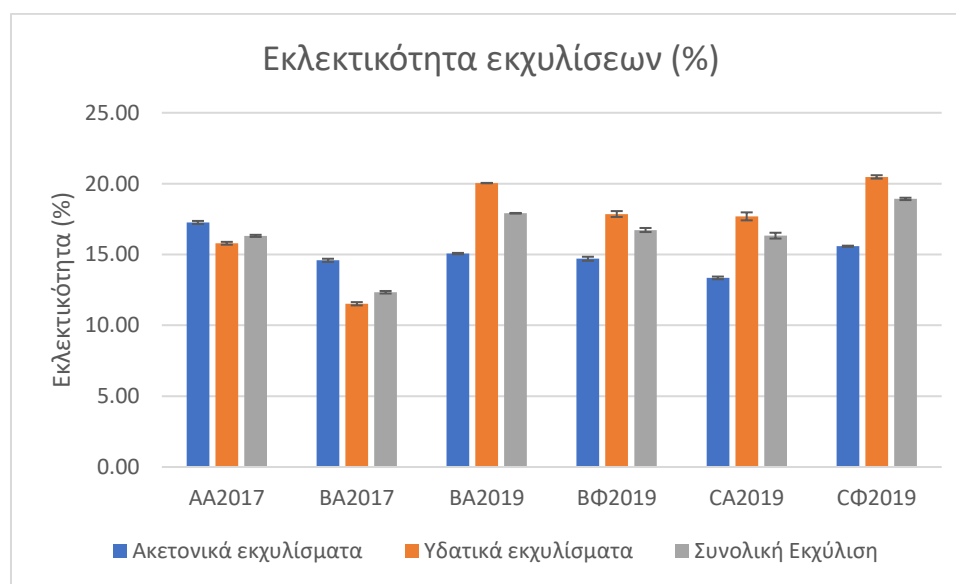
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η εκλεκτικότητα των εκχυλίσεων των δειγμάτων. Στον πίνακα 7.14 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των συνολικών στερεών σε βάση ξηρού εκχυλίσματος και στον πίνακα 7.15 το ποσοστό των φαινολικών συστατικών σε σχέση με το ξηρό εκχύλισμα. Η εκλεκτικότητα της εκχύλισης εκφράζεται από αυτό το ποσοστό.

Πίνακας 7.14 Ανάλυση συνολικού περιεχόμενου σε στερεά των εκχυλισμάτων

Συνολικό Περιεχόμενο σε Στερεά (mg/g ξηρής βάσης εκχυλίσματος)						
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
<b>Ακετονικό</b>	129±2	125±7	140±5	140±12	107±10	118±5
<b>Υδατικό</b>	234±7	347±30	187±2	252±46	235±43	253±27
<b>Σύνολο</b>	363±7	472±31	328±5	392±48	343±44	371±27

Πίνακας 7.15 Ανάλυση εκλεκτικότητας των εκχυλίσεων

Εκλεκτικότητα (%)						
	A <sub>A2017</sub>	B <sub>A2017</sub>	B <sub>A2019</sub>	B <sub>Φ2019</sub>	C <sub>A2019</sub>	C <sub>Φ2019</sub>
<b>Ακετονικό</b>	17.3±0.11	14.59±0.11	15.07±0.05	14.70±0.14	13.35±0.10	15.58±0.04
<b>Υδατικό</b>	15.8±0.10	11.52±0.12	20.04±0.01	17.85±0.21	17.69±0.28	20.48±0.12
<b>Σύνολο</b>	16.3±0.07	12.33±0.09	17.91±0.02	16.73±0.14	16.33±0.21	18.92±0.08



Γράφημα 7.26 Σύγκριση εκλεκτικότητας των εκχυλίσεων των δειγμάτων

Στον πίνακα 7.15 φαίνεται ότι η εκχύλιση με ακετόνη κατά μέσο όρο εμφανίζει χαμηλότερη εκλεκτικότητα από αυτήν με το νερό. Κατά μέσο όρο οι εκχυλίσεις με νερό εμφανίζουν εκλεκτικότητα της τάξεως του 17.23±3.28 % και οι εκχυλίσεις με ακετόνη 15.09±1.30 %. Η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα συναντάται στην εκχύλιση με νερό του δείγματος C<sub>Φ2019</sub>, ενώ η χαμηλότερη αντιστοιχεί και πάλι σε εκχύλιση με νερό στο δείγμα B<sub>A2017</sub>. Παρατηρείται επίσης ότι οι εκχυλίσεις με νερό εμφανίζουν μεγάλη

διακύμανση στις τιμές της εκλεκτικότητας τους. Αντίθετα οι εκχυλίσσεις με ακετόνη παρουσιάζουν κοντινές τιμές εκλεκτικότητας με την μεγαλύτερη να αντιστοιχεί στο δείγμα A<sub>A2017</sub> και η χαμηλότερη στο δείγμα C<sub>A2019</sub>.

Σε σύνολο η εκχύλιση με την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα είναι αυτή του δείγματος C<sub>Φ2019</sub> και η χαμηλότερη αυτή του δείγματος B<sub>A2017</sub>.

## 7.9 Ξήρανση με ψεκάσμο

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μορφοποίηση των βιοδραστικών συστατικών σε μικροκάψουλες, προκειμένου να παρασκευασθούν έτοιμα προς χρήση προϊόντα για τρόφιμα ή καλλυντικά. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένα δείγμα από το υδατικό εκχύλισμα της ποικιλίας A και ως φορέας εγκλεισμού επιλέχθηκε η μαλτοδεξτρίνη (MD) και το αραβικό κόμμι. Συγκεκριμένα προέκυψε ένα μίγμα, στο οποίο πραγματοποιήθηκε ανάλυση με τη χρήση HPLC-DAD ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών. Στην συνέχεια το μίγμα μεταφέρθηκε για ξήρανση με ψεκάσμο και η θερμοκρασία εισόδου του αέρα ξήρανσης ορίστηκε στους 140 °C, για την αποφυγή της καταστροφής των συστατικών. Το τελικό δείγμα που προέκυψε από τον ψεκάσμο ήταν σε μορφή λευκής σκόνης μάζας 6.5 g. Η περιεκτικότητα του σε φαινολικά συστατικά αναλύθηκε στην HPLC-DAD και στον πίνακα 7.16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου HPLC.

Πίνακας 7.16 Απόδοση μικροεγκλεισμού των φαινολικών συστατικών υδατικού εκχυλίσματος δενδρολίβανου ποικιλίας A.

Ουσία	Συγκέντρωση μίγματος προ ξήρανσης ( mg/kg στερεών)	Συγκέντρωση μετά το Spray Drying ( mg/kg στερεών σκόνης)	Απόδοση ξήρανσης με ψεκάσμο (%)
Ροσμαρινικό οξύ	14880	14279	95.96
Συνολικά Φαινολικά Οξέα	15751	14813	94.05
Φλαβονοειδείς Γλυκουζίτες <sup>a</sup>	17306	16370	94.59
Φλαβονοειδείς Αγλυκόνες <sup>b</sup>	1152	778	67.53

Ποσοτικοποιήθηκαν σε <sup>a</sup>ισοδύναμα ρουτίνης <sup>b</sup>ισοδύναμα κερκετίνης

Στον πίνακα 6.17 παρατηρείται ότι οι ποσότητες των κύριων φαινολικών ομάδων που συναντιούνται στα υδατικά εκχυλίσματα διατηρούνται κατά την διεργασία, και εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά ανάκτησης, με εξαίρεση τις φλαβονοειδείς αγλυκόνες. Μάλιστα το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζει πολύ μικρές απώλειες, με αποτέλεσμα η μέθοδος να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Δεδομένου ότι το ροσμαρινικό οξύ έχει πολύ υψηλή συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση του δενδρολίβανου, το γεγονός ότι η διεργασία αυτή είναι τόσο αποτελεσματική δείχνει ότι είναι δυνατό να παρασκευαστούν μικροκάψουλες με αντίστοιχη αντιοξειδωτική δράση με αυτή του φυτού.

## 8. Συμπεράσματα

Το δενδρολίβανο είναι ένα από τα πλουσιότερα σε αντιοξειδωτικά συστατικά αρωματικά φυτά, ενώ το αιθέριο έλαιό του έχει σημαντικές φαρμακευτικές και καλλυντικές ιδιότητες. Στην Ελλάδα, συναντιούνται διάφορες ποικιλίες δενδρολίβανου, αυτοφυείς και καλλιεργούμενες. Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα βιοδραστικά συστατικά τριών διαφορετικών ποικιλιών, ώστε να προσδιορισθούν οι καταλληλότερες για καλλιέργεια και αξιοποίηση.

Αρχικά, για τη μελέτη της επίδρασης της ποικιλίας και της εποχικής συγκομιδής στην απόδοση του αιθέριου ελαίου, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από υδροατμο-αποστάξεις σε δείγματα δενδρολίβανου από διαφορετικές ποικιλίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, όσον αφορά στον όγκο του αιθέριου ελαίου, η πιο αποτελεσματική ποικιλία είναι η ποικιλία Β και η καταλληλότερη εποχή συγκομιδής είναι η άνοιξη. Αν, όμως, το αιθέριο έλαιο εξετάζεται ως προς τα συστατικά του, η ποικιλία Α είναι η καταλληλότερη για χρήση στη βιομηχανία, καθώς το αιθέριο έλαιό της είναι πλούσιο σε 1,8-κινεόλη, η οποία του προσδίδει μια πικάντικη, δροσερή οσμή μέντας και τα ποσοστά του σε α-πινένιο και καμφορά είναι χαμηλά. Το γεγονός αυτό το καθιστά κατάλληλο για βιομηχανική χρήση καθώς το α-πινένιο σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση στο δέρμα, και η καμφορά έχει δυσάρεστη, χαρακτηριστική οσμή και εμφανίζει αλλεργιογόνο δράση. Η ποικιλία Β αν υποστεί επεξεργασία με μια διαδικασία αποτερπενίωσης, ώστε να μειωθεί το α-πινένιο της, μπορεί επίσης να έχει βιομηχανική χρήση. Η εποχή συγκομιδής, δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό της 1,8-κινεόλης, σε αντίθεση με το α-πινένιο, το οποίο εμφανίζει μεταβολές αλλά όχι με τον ίδιο τρόπο σε όλες τις ποικιλίες. Συγκεκριμένα, την άνοιξη αυξάνεται στην ποικιλία C και παραμένει σταθερό στην ποικιλία Β. Από την άλλη, η καμφορά, το φθινόπωρο, στην ποικιλία C, αυξάνεται και στην ποικιλία Β, όπως και το α-πινένιο, δεν εμφανίζει σημαντική μεταβολή. Όσον αφορά στη χρονιά συγκομιδής, η σύσταση του αιθέριου ελαίου της ίδιας ποικιλίας μεταβάλλεται, αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση με περισσότερες ποικιλίες και χρονιές συγκομιδής.

Ακολούθως, εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών των ποικιλιών, σε διαφορετικές συγκομιδές. Από τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι τα υδατικά εκχυλίσματα, που περιέχουν ροσμαρινικό οξύ, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδείς γλυκοζίτες, είναι πιο πλούσια σε φαινολικά συστατικά, ανεξαρτήτως της ποικιλίας, από τα ακετονικά τα οποία περιέχουν καρνοσικό οξύ, φαινολικά διτερπένια και φλαβονοειδείς αγλυκόνες. Επιπλέον, η καταλληλότερη εποχή συγκομιδής για δείγμα πλούσιο σε φαινολικά συστατικά είναι το φθινόπωρο όσον αφορά στην ποικιλία C, ενώ η ποικιλία Β παρουσιάζει παραπλήσιες συγκεντρώσεις στις δύο εποχές (άνοιξη και φθινόπωρο). Το φθινόπωρο, επίσης, οι ποικιλίες Β και C εμφανίζουν παρόμοιες συγκεντρώσεις. Όμως κατά μέσο όρο η ποικιλία Β εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών από την ποικιλία C και η ποικιλία Α παρόμοιες με την ποικιλία Β. Όσον αφορά στη χρονιά συγκομιδής παρατηρήθηκε ότι, το 2019, η ποσότητα των φαινολικών συστατικών ήταν μεγαλύτερη από αυτή του 2017.

Τα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου μελετήθηκαν επίσης ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στα αποτελέσματα, φαίνεται ότι τα υδατικά εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα ακετονικά, στις ποικιλίες Β και C, κατά τη χρονιά 2019. Από την άλλη, στην ποικιλία Β και στην ποικιλία Α, τη χρονιά 2017, τα ακετονικά και τα υδατικά εκχυλίσματα εμφανίζουν κοντινές τιμές αντιοξειδωτικής δράσης. Μελετώντας τις ποικιλίες, παρατηρείται ότι η ποικιλία Α εμφανίζει παρόμοια αντιοξειδωτική δράση με την ποικιλία Β και αυτή παρουσιάζει, κατά μέσο όρο, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την ποικιλία C. Όμως, τα δείγματα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση αντιστοιχούν στην

ποικιλία C και την ποικιλία B, κατά τη συγκομιδή του Οκτωβρίου. Η καταλληλότερη εποχή συγκομιδής συμπεραίνεται ότι είναι το φθινόπωρο, καθώς η αντιοξειδωτική δράση της ποικιλίας C αυξάνεται εκείνη την εποχή, ενώ η ποικιλία B εμφανίζει παραπλήσια αντιοξειδωτική δράση ανεξάρτητα από τη περίοδο συγκομιδής.

Στην παρούσα εργασία, ανιχνεύθηκαν επτά (7) φαινολικά οξέα, έντεκα (11) флаβονοειδή και τέσσερα (4) φαινολικά διτερπένια και ταυτοποιήθηκαν τέσσερις (4) флаβονοειδείς αγλυκόνες, η κίρσιμαριτίνη, η λαδανεΐνη, η γκεκουανίνη και η σαλβιγενίνη, δύο (2) флаβονοειδείς γλυκοζίτες, η ισοσκουτελλαρεΐνη και η νεπιτρίνη, τρία (3) φαινολικά διτερπένια, το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και ο καρνοσικός μεθυλεστέρας, και δυο (2) φαινολικά οξέα, το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ. Όλα τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν συναντιούνται σε όλες τις ποικιλίες και σε όλες τις συγκομιδές.

Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκαν τα επιμέρους φαινολικά συστατικά που συναντιούνται στο δενδρολίβανο, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της ποικιλίας, του έτους και της εποχικής συγκομιδής στη συγκέντρωσή τους στο φυτό. Η ποικιλία A παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών διτερπενίων και σε σχέση με την περίοδο συγκομιδής τα φαινολικά διτερπένια δεν εμφανίζουν κάποια διαφοροποίηση στην συγκέντρωσή τους. Το κυριότερο φαινολικό διτερπένιο που ανιχνεύτηκε στα εκχυλίσματα του δενδρολίβανου είναι το καρνοσικό οξύ. Το καρνοσικό οξύ εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του στην ποικιλία A και B, τη χρονιά 2017 και η καταλληλότερη περίοδος για την συγκομιδή του είναι η άνοιξη. Όσον αφορά στο έτος συγκομιδής, τα φαινολικά διτερπένια και το καρνοσικό οξύ εμφανίζουν μείωση κατά την χρονιά 2019.

Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ροσμαρινικό οξύ και φαινολικά οξέα ανήκει στην ποικιλία C, η καλύτερη περίοδος συγκομιδής είναι το φθινόπωρο, ενώ η χρονιά 2017 εμφανίζει παρόμοιες συγκεντρώσεις με το 2017. Παράλληλα, όσον αφορά στα флаβονοειδή, και οι τρεις ποικιλίες δενδρολίβανου που μελετήθηκαν περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά флаβονοειδών γλυκοζιτών από αυτά των флаβονοειδών αγλυκόνων, με την ισοσκουτελλαρεΐνη να ξεχωρίζει. Η πιο κατάλληλη ποικιλία, για την εκχύλιση флаβονοειδών γλυκοζιτών, είναι η ποικιλία C. Όμως, δεν είναι ξεκάθαρο ποια περίοδος συγκομιδής είναι προτιμότερη, καθώς η ποικιλία B εμφανίζει μέγιστο την άνοιξη και η ποικιλία C δεν παρουσιάζει μεταβολές στη συγκέντρωση των γλυκοζιτών, στις δύο εποχές (άνοιξη και φθινόπωρο). Στην περίπτωση που το ενδιαφέρον βρίσκεται στις αγλυκόνες, η ποικιλία C είναι και πάλι η πιο αποδοτική ποικιλία. Η προτιμότερη περίοδος συγκομιδής είναι το φθινόπωρο.

Συμπληρωματικά, τα φαινολικά συστατικά συγκρίθηκαν μεταξύ τους, ώστε να βρεθεί αν υπάρχει συσχέτιση των επιμέρους συστατικών μεταξύ τους αλλά και των συνολικών συστατικών με το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ποσότητα του αιθέριου ελαίου μεταβάλλεται με τις εποχές αντιστρόφως ανάλογα από το φαινολικό περιεχόμενο στο φυτό. Ειδικότερα, το φθινόπωρο που το φαινολικό περιεχόμενο αυξάνεται, το ποσοστό του αιθέριου ελαίου μειώνεται. Αντίστοιχα, μελετήθηκε και το καρνοσικό οξύ με τα φαινολικά οξέα, τις флаβονοειδείς αγλυκόνες και το ροσμαρινικό οξύ. Το καρνοσικό οξύ μειώνεται το φθινόπωρο, ενώ οι флаβονοειδείς αγλυκόνες δεν εμφανίζουν μεταβολές στην συγκέντρωσή τους και τα φαινολικά οξέα και το ροσμαρινικό οξύ αυξάνονται. Αντίστοιχα, το φθινόπωρο, που το ροσμαρινικό οξύ αυξάνεται, τα φαινολικά διτερπένια παρουσιάζουν σταθερότητα και ίσως μια μικρή μείωση και η νεπιτρίνη μειώνεται. Επιπλέον, την άνοιξη αυξάνεται η ποσότητα του флаβονοειδούς λαδανεΐνη και μειώνονται οι συγκεντρώσεις των флаβονοειδών, σαλβιγενίνη και γκεκουανίνη. Εκτός των εποχικών συσχετίσεων δεν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των συστατικών με βάση την ποικιλία και το έτος.

Έπειτα, μελετήθηκε η συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων (μέσω της δέσμευσης ελευθέρων ριζών) με το φαινολικό περιεχόμενο του δενδρολίβανου. Στα αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι η αντιοξειδωτική δράση του δενδρολίβανου έχει πολύ υψηλή συσχέτιση με την ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος και μέτρια με τη συγκέντρωση ολικών φαινολικών των υδατικών εκχυλισμάτων. Όσον αφορά στο καρνοσικό οξύ και στα ακετονικά εκχυλίσματα, η αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει μία θετική συσχέτιση, αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο με το ροσμαρινικό οξύ και τα υδατικά εκχυλίσματα. Οπότε, όσο περισσότερο ροσμαρινικό οξύ υπάρχει στο φυτό τόσο πιο αποτελεσματική είναι η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Τα υδατικά εκχυλίσματα, λοιπόν, έχουν την πιο αποτελεσματική ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

Τέλος, δοκιμάσθηκε η ενθυλάκωση των βιοδραστικών συστατικών σε μαλτοδεξτρίνη, μέσω ξήρανσης με ψεκασμό, για να παρασκευασθούν έτοιμα προς χρήση προϊόντα, για τρόφιμα ή καλλυντικά. Από τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι, με την μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό, τα φαινολικά συστατικά των υδατικών εκχυλισμάτων του δενδρολίβανου, μπορούν να μορφοποιηθούν σε σκόνη, χωρίς να υπάρχει σημαντική απώλεια της ποσότητάς τους. Συγκεκριμένα, το ροσμαρινικό οξύ, που συνδέεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του φυτού, εγκλείεται σε πολύ υψηλά ποσοστά. Συμπεραίνεται λοιπόν πως είναι δυνατή η μορφοποίηση των πολικών φαινολικών συστατικών σε μικροκάψουλες για τη χρήση σε προϊόντα τροφίμων, αλλά είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη των παραμέτρων της ξήρανσης με ψεκασμό.



## 9.Βιβλιογραφία

al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P: Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 1999,37:124–130.7.

Amin T, Naik H. R, Hussain S. Z. Chemotyping the Essential Oil Indifferent Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Plants Grown in Kashmir Valley. *Biosci Biotech Res Asia* 2017;14(3).

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

Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Pauletti, G. F., Rota, L. D., Rech, J. C., Pansera, M. R., Moyna, P. (2005). Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 1035–1039.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

Baydar, H., Özkan, G., Erbaş, S., & Altındal, D. (2009). Yield, Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts and Essential oils of Sage and Rosemary Depending on Seasonal Variations. *Acta Horticulturae*, (826), 383–390.

Behr, A.; Johnen, L. (2009). "Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review". *ChemSusChem*. 2 (12): 1072–1095.

Bicchi, C., Binello, A., & Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis*, 11(4), 236–242.

Birtić, S., Dussort, P., Pierre, F.-X., Bily, A. C., & Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9–19.

Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). LIGNIN BIOSYNTHESIS. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.

Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus Officinalis* Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20585–20606.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E: Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J Agric Food Chem* 2007,55:7879–7885.12.

Brennan J.G, Butters J.R., Cowell N.D. and Lilly A.E.V. (1976) *Food Engineering Operations*, 2nded., Applied Science Publishers Ltd., London, pp.154-169

Capecka, E., Mareczek, A. and Leja, M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem*. 93: 223-226.

- Chen, H.-J., Inbaraj, B. S.; Chen, B.-H. (2011). Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1),
- De la Guardia, M., & Armenta, S. (2011). Greening Sample Treatments. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 87–120.
- De Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & de Oliveira, L. D. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, 26(1).
- Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Moyna, P.; Frizzo, C. D.; Serafini, L. A.; Dugo, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. *J. Essent. Oil Res.* 1999, 27–30
- Frankel, E. N.; Huang, S.; Aeschbach, R.; Prior, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 131-135
- Hadi Mojtaba; Bagherieh-Najjar M.; Mianabadi M. (2018). Seasonal Variations in Carnosic Acid Content of Rosemary Correlates with Anthocyanins and Soluble Sugars. *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 7. 163-171.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & 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.
- Hirondart, M.; Rombaut, N.; Fabiano-Tixier, A.S.; Bily, A.; Chemat, F. Comparison between Pressurized Liquid Extraction and Conventional Soxhlet Extraction for Rosemary Antioxidants, Yield, Composition, and Environmental Footprint. *Foods* 2020, 9, 584.)
- Hopia, A. I.; Huang, S. W.; Schwarz, K.; German, J. B.; Frankel, E. N. Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without R-tocopherol. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2030-2036.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., & Sasner, J. J. (2003). Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1811–1815.
- Islamčević Razboršek M, Brodnjak-Vončina D, Doleček V, Vončina E. Determination of major phenolic acids, phenolic diterpenes and triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) by gas chromatography and mass spectrometry. *Acta Chimica Slovenica*. 2007;54(1):60-67.
- Kadri A, Zarai Z, Ben Chobba I, Bekir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R: Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. *J MedPlants Res* 2011,5:5999–6004
- Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla A, Bettio LE, Oliveira A, Pazini FL, Dalmarco JB, Simionatto EL, Pizzolatti MG, Rodrigues AL: Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem* 2013,136:999–1005
- Mann, J (1992). *Secondary Metabolism* (2<sup>nd</sup> ed.). Oxford, UK: Oxford University Press. pp. 279-280

McCabe, W.L., Smith, J.C. and Harriot, P. (2001) Βασικές Διεργασίες Χημικής Μηχανικής, 6η Έκδοση, Εκδ. ΤΖΙΟΛΑ, pp.1168-1183.

Melito, S., Petretto, G. L., Chahine, S., Pintore, G., & Chessa, M. (2019). Seasonal Variation of Essential Oil in *Rosmarinus officinalis* Leaves in Sardinia. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X1986400.

Mena, P., Cirlini, M., Tassotti, M., Herrlinger, K., Dall'Asta, C., & 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.

Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. *Phenolic Compounds - Biological Activity*.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223–231.

Moss M, Cook J, Wesnes K, Duckett P: Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *Int J Neurosci* 2003, 113:15–38

Napoli, E. M., Siracusa, L., Saija, A., Speciale, A., Trombetta, D., Tuttolomondo, T. Ruberto, G. (2015). Wild Sicilian Rosemary: Phytochemical and Morphological Screening and Antioxidant Activity Evaluation of Extracts and Essential Oils. *Chemistry & Biodiversity*, 12(7), 10(3), 411–433.

Neves, J. A., Neves, J. A., & Oliveira, R. de C. M. (2018). Pharmacological and biotechnological advances with *Rosmarinus officinalis* L. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(5), 399–413.

Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juarez MA, Moreno S: New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 2013, 31:189–1950

Olthof, M. R.; Hollman, P. C.; Katan, M. B. (January 2001). "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans". *J. Nutr.* 131 (1): 66–71

Pacheco-Fernández, I., & Pino, V. (2020). Extraction with Ionic Liquids-Organic Compounds. *Liquid-Phase Extraction*, 499–537.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* (2016), vol. 5, e47, page 1 of 15

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.

Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., & Komaitis, M. (2008). Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. And *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7254–7264.

Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S: In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med* 2006, 6:39

- Ridgway, K., Smith, R. M., & Lalljie, S. P. D. (2012). Sample Preparation for Food Contaminant Analysis. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 819–833.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98–103.
- Russo, E. B. (2011). "Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects". *British Journal of Pharmacology*. 163 (7): 1344–1364.
- Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1305. Published 2019 Mar 15.
- Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Saánchez, A., & Luque, P. (2003). Chemical Composition and Seasonal Variations of Rosemary Oil from Southern Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 15(1), 10–14.
- Sánchez-Camargo, A. P., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2014). Supercritical Fluid Extraction. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering
- Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics*, 5(1), 11.
- Satyal, P., Jones, T., Lopez, E., McFeeters, R., Ali, N., Mansi, I., Setzer, W. (2017). Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*, 6(3), 20.
- Seo DY, Lee SR, Heo JW, et al. Ursolic acid in health and disease. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018;22(3):235-248.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 152–178.
- Sköld, M., Karlberg, A.-T., Matura, M., & Börje, A. (2006). The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 538–545.
- Slameňová D, Horváthová E, Kováčiková Z, Kozics K, Hunáková L: Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DMNQ. *Food Chem* 2011,129:64–70
- Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, Sartoretto SM, Diniz SP, Bersani-Amado CA, Cuman RK: Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J Med Food* 2008,11:741–746'
- Tzia C. and Liadakis G. (2003) *Extraction Optimization in Food Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T: *Antibacterial activity and anticancer activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to that of its main components*. *Molecules* 2012,17:2704–2713.
- Wellwood, C. R. L., & Cole, R. A. (2004). *Relevance of Carnosic Acid Concentrations to the Selection of Rosemary, Rosmarinus officinalis (L.), Accessions for Optimization of Antioxidant Yield*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6101–6107.

Yeddes, W., Chalghoum, A., Aidi-Wannes, W., Ksouri, R., & Saidani Tounsi, M. (2019). *Effect of bioclimatic area and season on phenolics and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) leaves*. Journal of Essential Oil Research.

Yu MH, Choi JH, Chae IG, Im HG, Yang SA, More K, Lee IS, Lee J: *Suppression of LPS-induced inflammatory activities by Rosmarinus officinalis L.* Food Chem 2013, 136:1047–1054

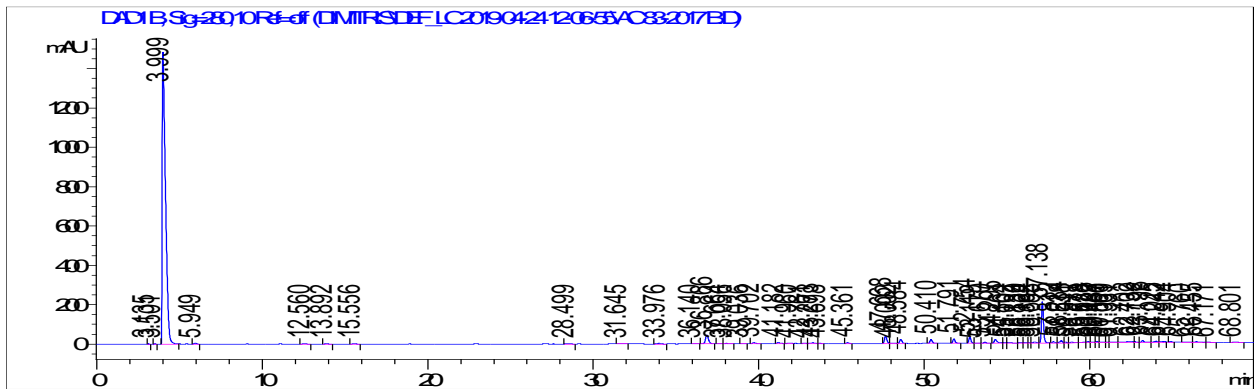
Zelic, B., Hadolin, M., Bauman, D. and Vasic-Racki, D. *Recovery and Purification of Rosmarinic Acid from Rosemary Using Electrodialysis*. Acta Chim. Slov. 2005: 52, pp. 126 – 130.

Zheng W., Wang S., 2001. *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. J Agric Food Chem 49, 5165-5170.

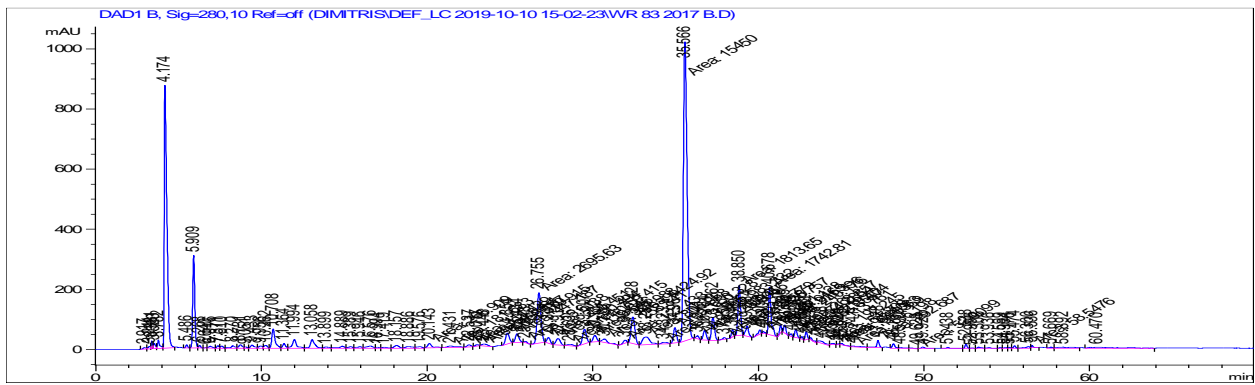
Ψαρρού, Ε., 2019 “Βελτιστοποίηση Συνθηκών Εκχύλισης Βιοδραστικών Συστατικών Από Δεντρολίβανο.  
” [Unpublished bachelor’s thesis] *Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*

# Παράρτημα

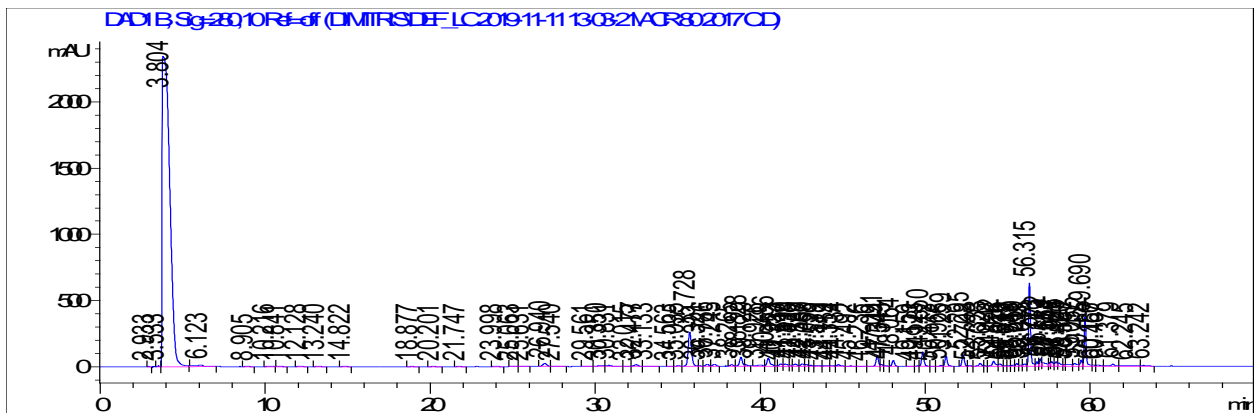
## Χρωματογράφημα μεθόδου FLAV



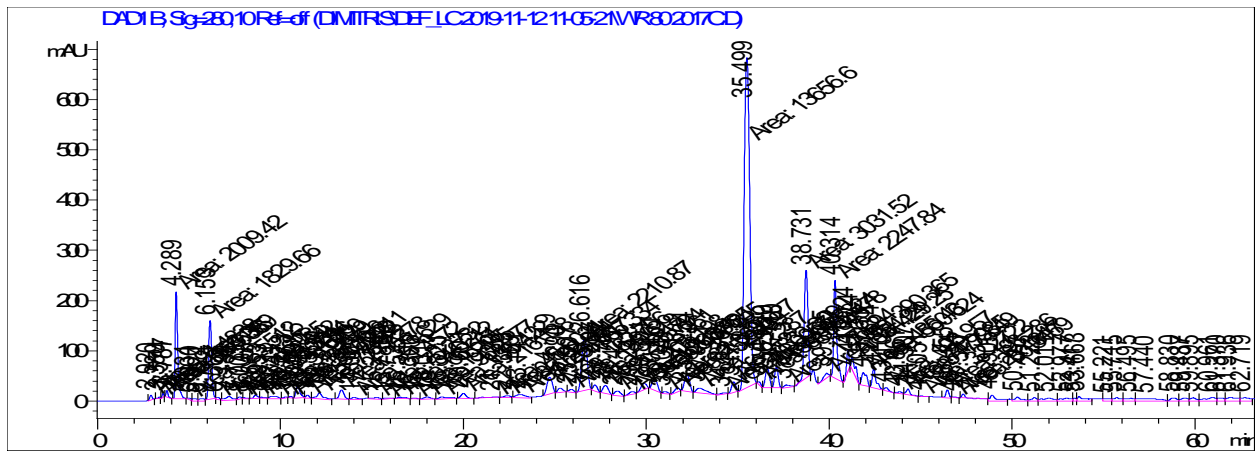
Εικόνα 1 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος Β<sub>A2017</sub>



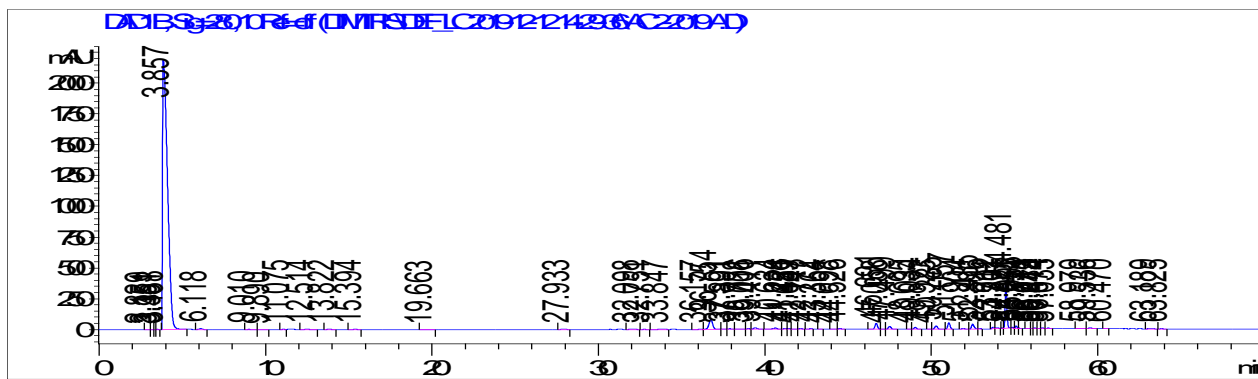
Εικόνα 2 Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δείγματος Β<sub>A2017</sub>



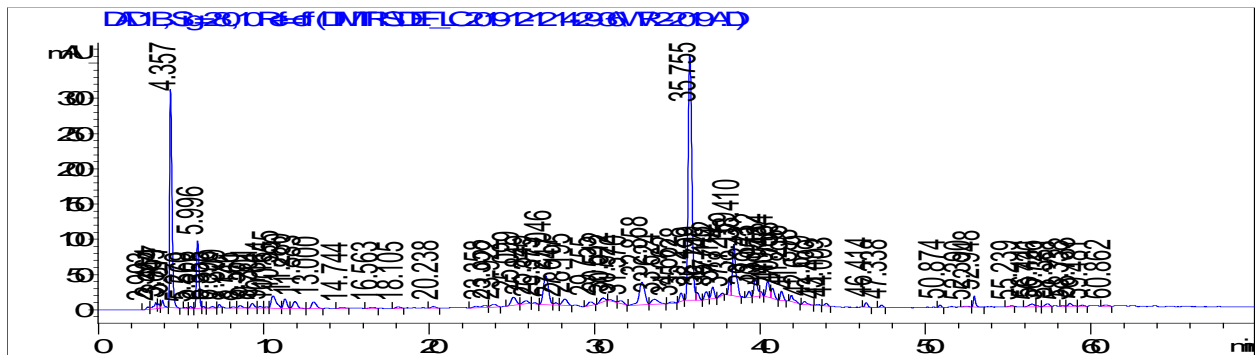
Εικόνα 3 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος Α<sub>A2017</sub>



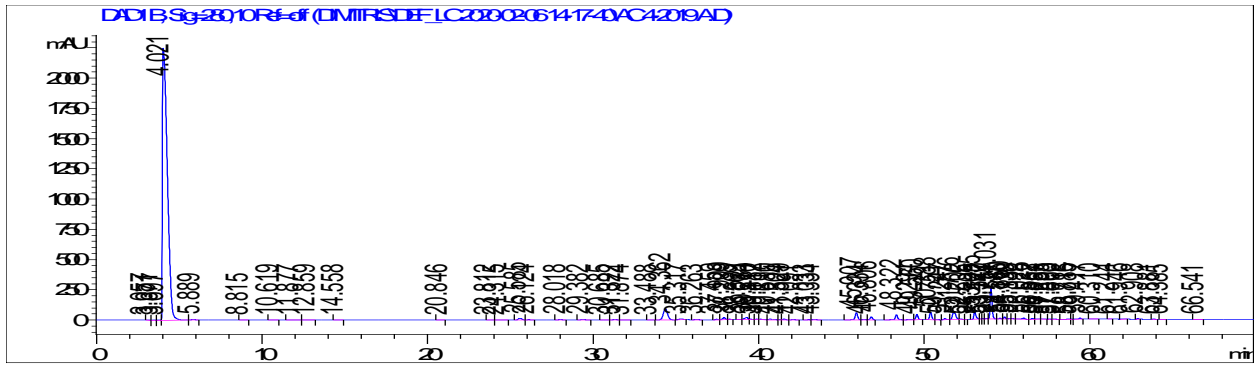
Εικόνα 4 Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δείγματος A<sub>2017</sub>



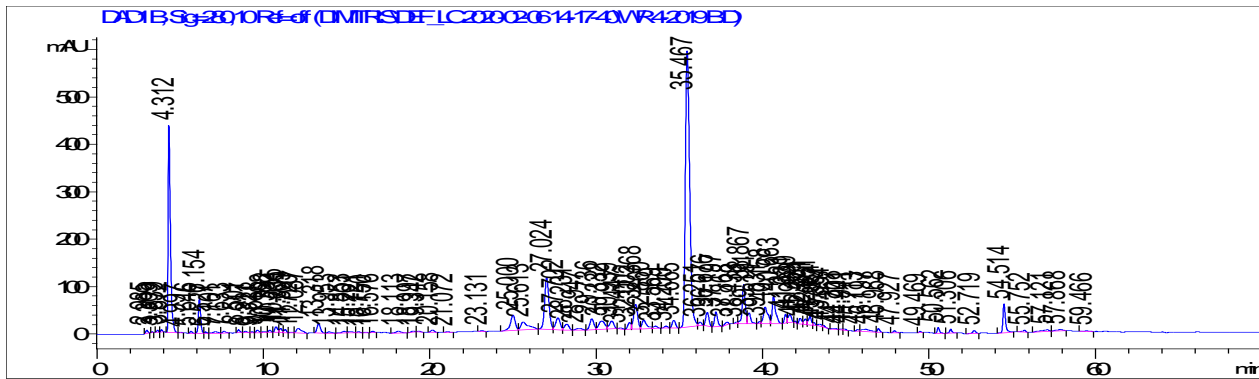
Εικόνα 5 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος B<sub>2019</sub>



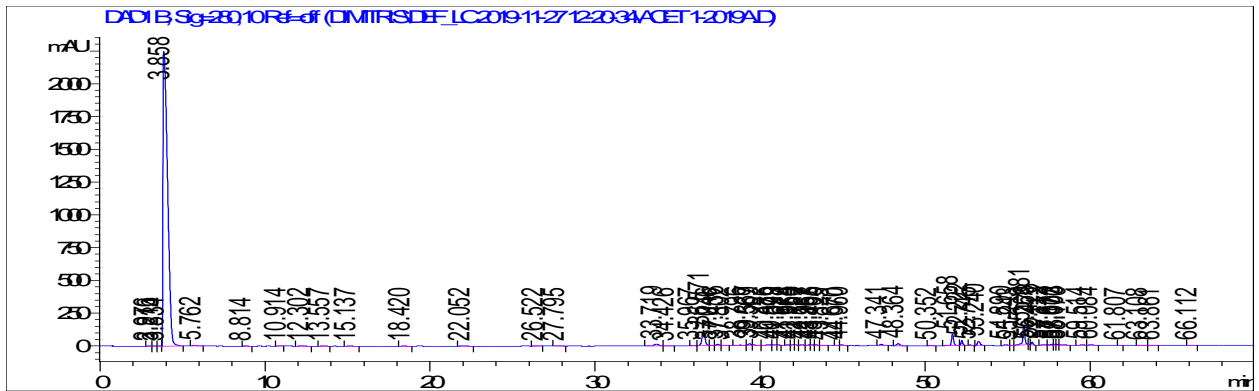
Εικόνα 6 Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δείγματος B<sub>2019</sub>



Εικόνα 7 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος Β<sub>Φ2019</sub>



Εικόνα 8 Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δείγματος Β<sub>Φ2019</sub>

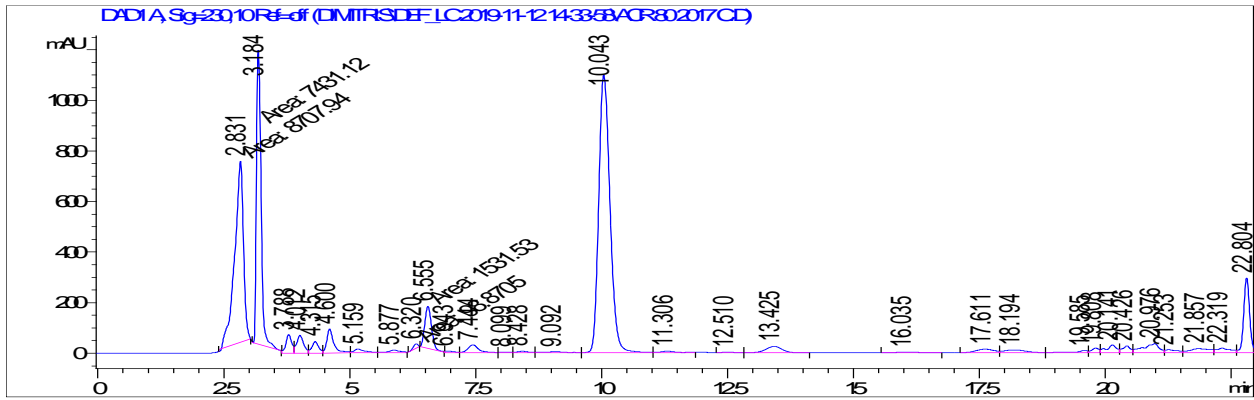


Εικόνα 9 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος C<sub>A2019</sub>

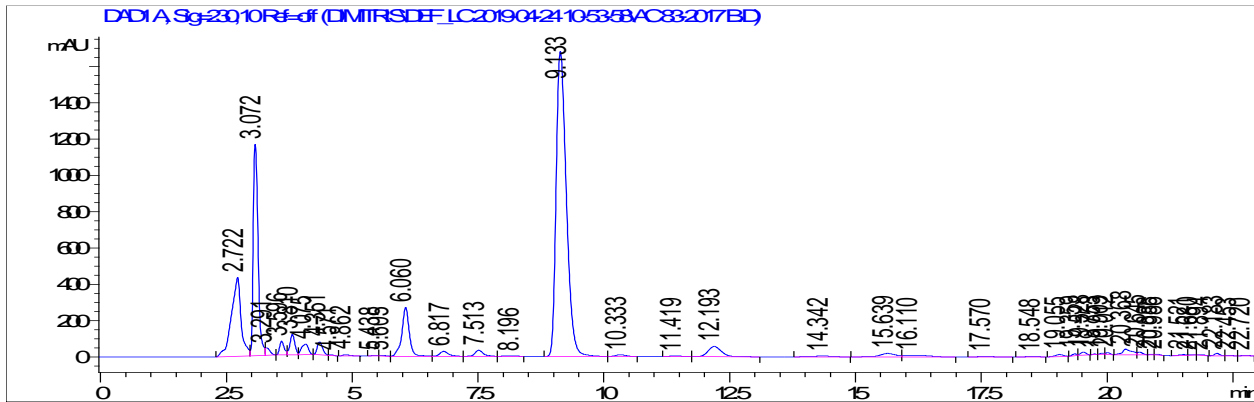




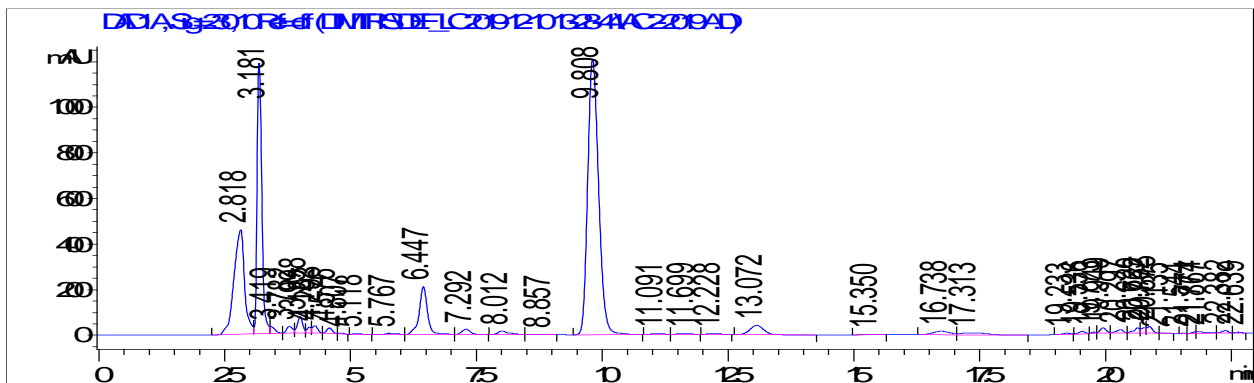
## Χρωματογράφημα μεθόδου CARNOSIC



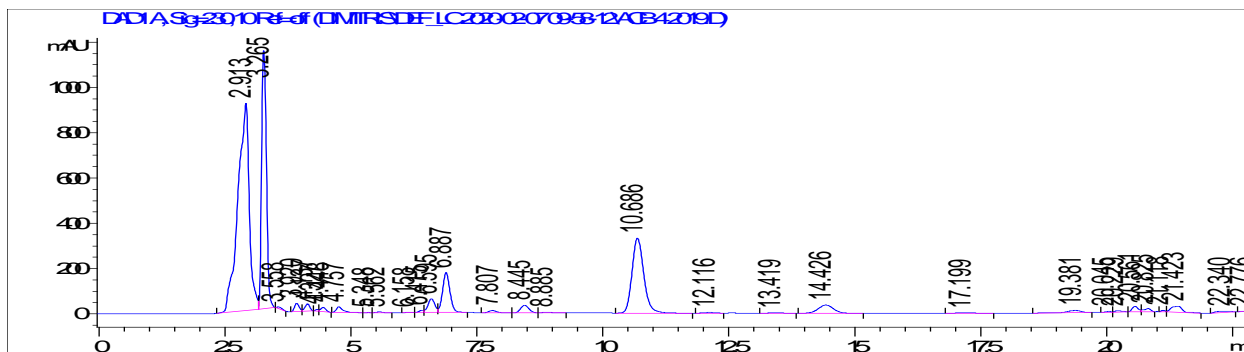
Εικόνα 13 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος A<sub>A2017</sub>



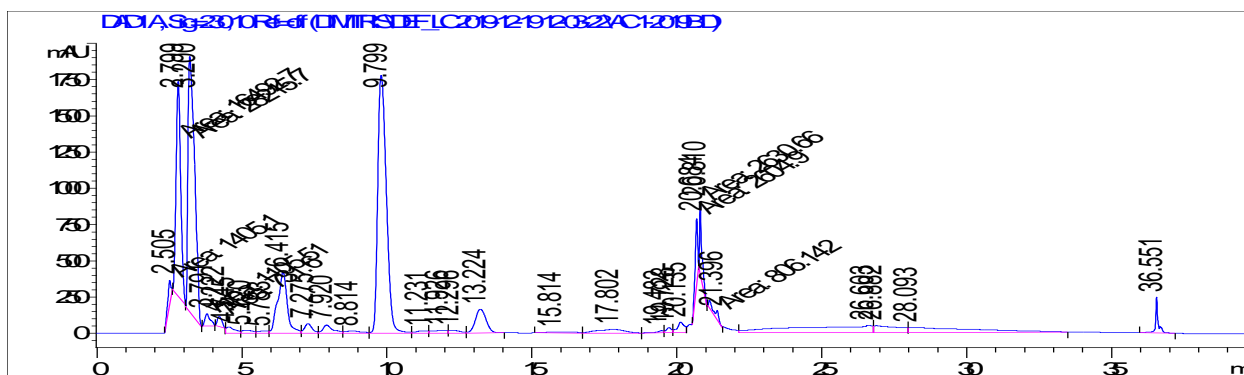
Εικόνα 14 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος B<sub>A2017</sub>



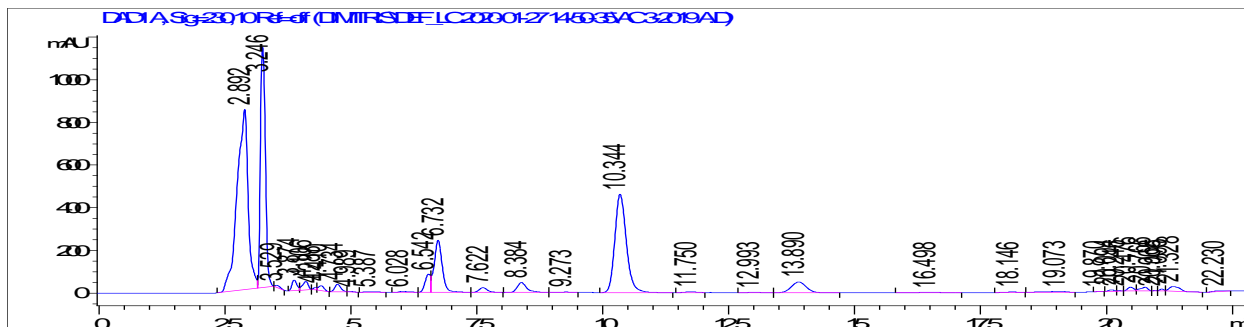
Εικόνα 15 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος B<sub>A2019</sub>



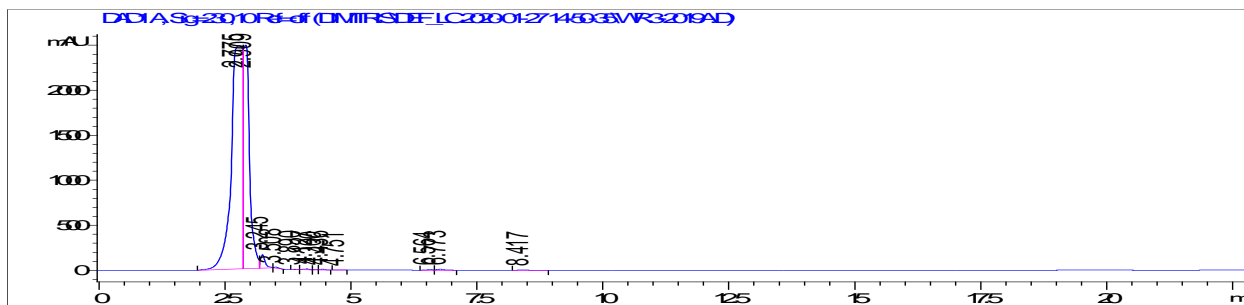
Εικόνα 16 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος B<sub>Φ2019</sub>



Εικόνα 2 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος C<sub>A2019</sub>



Εικόνα 18 Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος δείγματος C<sub>Φ2019</sub>



Εικόνα 19 Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος δείγματος C<sub>Φ2019</sub>

