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

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΙΛΙΚΩΝ ΠΡΟΣ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΛΛΑ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Ζαφειρία Λεμονή

Επιβλέπουσα
Αναστασία Δέτση, Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγησή της και την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ με την ομάδα της στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ανδρομάχη Τζάνη για την πολύτιμη βοήθειά της, την υποστήριξή της και το χρόνο που αφιέρωσε καθ΄όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αννίτα Κατωπόδη για την βοήθειά της, αλλά και όλη την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής ΗΜΜΥ ΕΜΠ και συγκεκριμένα τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο και την Διδάκτορα Ελένη Αλεξανδράτου, αλλά και το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, ειδικά την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Θάλεια Τσιάκα για την παροχή βοήθειας και οργάνων για τη διεξαγωγή των απαιτούμενων μετρήσεων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς ποικιλίας Καλαμών με χρήση πράσινων διαλυτών, συγκεκριμένα των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών φυσικής προέλευσης (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Η διεργασία βασίζεται στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, που είναι μία τεχνική υψηλής ενέργειας, με στόχο την παραλαβή εκχυλισμάτων υψηλής αξίας και βιοδραστικότητας.

Τα φύλλα ελιάς επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν σημαντικό παραπροϊόν της ελαιουργίας το οποίο, λόγω των σημαντικών ποσοτήτων βιοδραστικών ενώσεων που διαθέτει θα μπορούσε να μετατραπεί από απόβλητο σε σημαντική πρώτη ύλη για περαιτέρω αξιοποίηση. Στην παρούσα εργασία, στόχο αποτελεί η αξιοποίηση του σημαντικού βιοδραστικού περιεχομένου των φύλλων ελιάς για την παραλαβή εκχυλισμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας πράσινους διαλύτες και τεχνικές.

Για τη μελέτη των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, απαιτήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NADES), οι οποίοι προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες, φιλικές προς το περιβάλλον και ασφαλείς, όπως σάκχαρα, αμινοξέα και υδροξυ-οξέα που χρησιμοποιούνται ήδη στη βιομηχανία σε προϊόντα με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο.

Αρχικά προσδιορίστηκε ο καταλληλότερος NADES μεταξύ των επτά που παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Από την αξιολόγηση των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και φαινολικών ενώσεων (TPC) καθώς και του περιεχομένου τους σε υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και ελαιοευρωπεΐνη, ως ο καταλληλότερος κρίθηκε ο NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ (1:5). Στη συνέχεια, με χρήση του επιλεγμένου διαλύτη πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε με χρήση πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους μελέτης, την αναλογία διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης, δηλαδή τα φύλλα ελιάς (olive leaves, OL), την ισχύ των υπερήχων και το χρόνο εκχύλισης και ως μεταβλητές απόκρισης το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC). Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη, αξιολογήθηκαν επιπλέον ως προς την περιεκτικότητά τους σε ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής της ελεύθερης ρίζας του

DPPH. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 του βέλτιστου εκχυλίσματος που προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό, του διαλύτη εκχύλισης D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ και των πρότυπων ενώσεων ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη.

Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς παρουσίασαν διαφορετικές τιμές ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικής δράσης αναλόγως με τις συνθήκες εκχύλισης, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε όλα ποσότητα και των τριών κύριων βιοδραστικών ενώσεων (ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη κα τυροσόλη). Με την βελτιστοποίηση του μοντέλου από τον πειραματικό σχεδιασμό παρατηρήθηκε ότι το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων αυξάνεται με ταυτόχρονη αύξηση της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και της ισχύος των υπερήχων, ενώ ο χρόνος εκχύλισης φαίνεται να μην αποτελεί παράγοντα που επιφέρει τις σημαντικότερες μεταβολές. Από τη μελέτη αυτή, ως βέλτιστες συνθήκες για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του TPC και TFC, κρίθηκαν ότι είναι οι εξής: αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 30 g DES/g OL, ισχύς 133 W και χρόνος εκχύλισης 15 min. Στη συνέχεια, πειράματα επιβεβαίωσης υπέδειξαν την καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

Από τη μελέτη κυτταροτοξικότητας ως προς κύτταρα υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 του εκχυλίσματος, του διαλύτη D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, της ελαιευρωπεΐνης, της τυροσόλης και της υδροξυτυρσόλης προκύπτει ότι η υδροξυτυροσόλη μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε συγκέντρωσεις 250 μg/ml και 150 μg/ml κατά 92% και 20% αντίστοιχα, η ελαιευρωπεΐνη, η τυροσόλη και το εκχύλισμα κατά 5-10% σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 250 μg/ml, ενώ ο διαλύτης δεν παρουσιάζει καθόλου κυτταροτοξική συμπεριφορά. Συμπεραίνεται επομένως ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς με τον NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ είναι μη κυτταροτοξικό και μπορεί με ασφάλεια να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα σε συγκεντρώσεις έως 250 μg/ml.

Λέξεις-Κλειδιά: Φύλλα ελιάς, Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (NADES), Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE), Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken, Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), Αντιοξειδωτική δράση, Ελαιοευρωπεΐνη, Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη, Κυτταροτοξικότητα

ABSTRACT

The purpose of this study is to develop and optimize the extraction process of bioactive compounds from olive leaves of the Kalamon variety using green solvents, namely the Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). The process is based on ultrasound-assisted extraction, which is a high-energy green technique, aiming at obtaining high value and bioactivity of extracts.

Olive leaves were selected as they are an important residue of the olive oil indusrtry. Olive leaves contain significant amounts of bioactive compounds such as oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol and could, therefore, be converted from waste into an important raw material for further utilization. The aim of the present work is to exploit olive leaves as a rich source of bioactive phytochemicals, in order to obtain added-value extracts using green solvents and techniques.

The first step was the design of natural deep eutectic solvents (NADES), which are synthesized from naturally occurring components, safe and environmentally friendly, such as sugars, amino acids and hydroxyl-acids, which are already used for the industrial productions of pharmaceutical, cosmetic and food products. Seven NADES were prepared in the Laboratory of Organic Chemistry and were screened for their ability to efficiently extract bioactive compounds from olive leaves.

Based on the total flavonoid content (TFC), total phenolic content (TPC) and the hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein content, the most suitable NADES was found to be D-glucose: D,L-lactic acid (1:5).

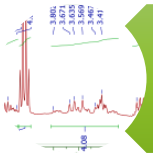
The second step involved the application the selected solvent for the optimization of the extraction process with Box-Behnken experimental design using the solvent to mass of raw material olive leaves (OL) ratio, the power of ultrasound and the extraction time as study parameters and the total flavonoid content (TFC) and phenolic content (TPC) as the response variables. The olive leaves extracts, obtained from this study, were further evaluated for their oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol content by HPLC analysis, and their antioxidant activity by the DPPH free radical scavenging assay. Finally, a cytotoxicity study was performed on fibroblast cells of the optimal extract obtained from the experimental design, the extraction solvent D-glucose: D, L-lactic acid, oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol.

Olive leaves extracts showed different values of total flavonoid and phenolic content, as well as of antioxidant activity depending on the extraction conditions, while not all of their three basic bioactive compounds (oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol) were detected. By optimizing the model from the experimental design, it was observed that the total flavonoid and total phenolic content increase when the solvent mass to mass of olive leaves ratio and ultrasound power increase, whereas the extraction time does not seem to affect the quality of the extract. The optimal conditions, for the simultaneous maximization of TFC and TPC, were found to be the following solvent mass to olive leaf mass ratio 30 g DES / g OL, ultrasound power 133 W and extraction time 15 min. Confirmation experiments were performed and they indicated the good fit of the model to the experimental data.

Regarding the cytotoxicity study against healthy mouse embryonic fibroblast cells 3T3, of the extract, the solvent D-glucose:D,L-lactic acid, oleuropein, tyrosol and hydroxytyrol, hydroxytyrosol showed a significant reduction in cell viability only at concentrations higher than 150 μg/ml, oleuropein, tyrosol and the extract showed a reduction in cell viability of 5-10% only at concentrations higher than 250 μg/ml. The NADES was not toxic even at concentrations as high as 500 μg/ml. The cytotoxicity profile of the NADES extract in combination with its significant antioxidant activity render it safe for incorporation in pharmaceutical and cosmetic formulations in concentrations up to 250 μg/ml.

Keywords: Olive leaves, Natural Deep Eutectic Solvents (NADES), Ultrasound Assisted Extraction (UAE), Box-Behnken experimental design, Total Flavonoid Compound (TFC), Total Phenolic Compound, Antioxidant activity, Oleuropein, Hyrdroxytyrosol, Tyrosol, Cytotoxicity

GRAPHICAL ABSTRACT

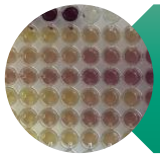


NADES synthesis

- Heating method with stirring
- Combination of HBA & HBD

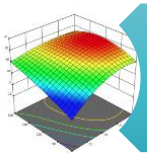
Olive leaves extraction

- NaDES as extraction solvent
- Ultrasound assisted extraction



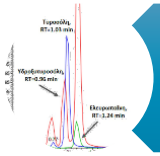
Characterisation

- TFC, TPC & DPPH



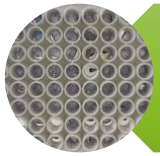
Box-Behnken

- Optimization



HPLC analysis

- Tyrosol, hydroxytyrosol,oleuropein



Cytotoxisity

- MTT analysis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 16
1.1 ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ 16
1.2 Η ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ ΩΣ ΠΛΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ 19
1.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 20
1.3.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ 21
1.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 22
1.3.2.1 ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ 22
1.3.2.2 ΤΥΡΟΣΟΛΗ 23
1.3.3 ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ 23
1.4 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 24
1.4.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 25
1.4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 27
1.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ 27
1.5.1 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 27
1.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ 29
1.5.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ 30
1.5.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ 30
1.5.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 31
1.6 ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Deep Eutectic Solvents, DES) 32
1.6.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ 35
1.6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ 36
1.6.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ 36
1.6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ 37
1.6.5 ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΝ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 37

2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ 38
2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ NADES 38
2.1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (Nuclear Magnetic Resonace, NMR) 38
2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ 38
2.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ-ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV-Vis spectrophotometry) 38
2.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (High Perfomance Liquid Spectrometry-Mass Spectroscopy, HPLC-MS) 39
2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 39
2.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 39
2.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ 40

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 41
3.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ (Response Surface Methodology, RSM) 41
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ BOX-BEHNKEN 42
3.3 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ 43
3.3.1 ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 43
3.3.2 ΙΣΧΥΣ 43
3.3.3 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ 44

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 45
4.1 ΣΚΟΠΟΣ 45
4.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 46
4.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ 48

4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ NADES ΚΑΙ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ 49
4.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ 49
4.4.2 ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 49
4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ 50
4.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ 52
4.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH . 52
4.6.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC) 54
4.6.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC) 55
4.6.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ HPLC 56
4.7 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 64
4.7.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ MTT 64

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 67
5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ 67
5.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ 68
5.1.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ NADES ΩΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 72
5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (Design of Experiments, DoE) 74
5.2.1 ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC) 74
5.2.2 ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ (TPC) 77
5.2.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 80
5.2.4 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΟΝΤΕΛΟΥ 84
5.2.5 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΑΛΛΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ 85
5.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ 86
5.3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC) 86
5.3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC) 91
5.3.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH 95
5.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LC-MS 98
5.4.1 ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ 99
5.4.2 ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗ 100
5.4.3 ΤΥΡΟΣΟΛΗ 102
5.5 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ 102

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 106

7 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ 109

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 1: ΓΡΑΦΙΚΉ ΑΝΑΠΑΡΆΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΏΝ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ (TFC), ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ (TPC), ΤΗΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ, ΠΟΥ ΠΡΟΈΚΥΨΑΝ ΑΠΌ ΤΗΝ ΕΚΧΎΛΙΣΗ ΦΎΛΛΩΝ ΕΛΙΆΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΌ ΦΥΣΙΚΆ ΒΑΘΈΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΌ ΔΙΑΛΎΤΗ. 73
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 2: ΣΥΣΧΈΤΙΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΏΝ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΌΜΕΝΩΝ ΤΙΜΏΝ ΤΗΣ ΑΠΌΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TFC). 76
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 3: ΣΥΣΧΈΤΙΣΗ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΏΝ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΌΜΕΝΩΝ ΤΙΜΏΝ ΤΗΣ ΑΠΌΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC). 79
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 4: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TFC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ C ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 81
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 5: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TFC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ B ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 82
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 6: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TFC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ B ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ A ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 82
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 7: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ C ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 83
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 8: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ B ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 83
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 9: 3D ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΦΆΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ B ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ A ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. 84
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 10: ΟΠΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΆΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΎ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΎ. 87
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 11: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TFC) ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΗ C ΟΠΩΣ ΥΠΟΔΕΙΧΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ. ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΕΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΤΙΜΗ C=15,3 MIN, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=40,8 MIN. 89
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 12: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TFC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ B ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. ΠΑΝΩ ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΕΡΕΤΑΙ ΣΕ ΤΙΜΗ B=160 W, ΠΑΝΩ ΔΕΞΙΑ ΑΝΑΦΕΡΕΤΑΙ ΣΕ ΤΙΜΗ B=80 W ΚΑΙ ΚΆΤΩ ΑΝΑΦΕΡΕΤΑΙ ΣΕ ΤΙΜΗ B=120 W. 90
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 13: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ(TFC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ C ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. ΑΡΙΣΤΕΡΆ ΤΟ ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΈΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=15,3 MIN, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=40,8 MIN. 91
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 14: ΟΠΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΆΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΎ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΎ. 92
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 15: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ C ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. ΑΡΙΣΤΕΡΆ ΤΟ ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΈΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=15 MIN, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=45 MIN. 93

ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 16: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ C ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ B ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. ΑΡΙΣΤΕΡΆ ΤΟ ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΈΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΤΙΜΉ B=160 W, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΣΤΗ ΤΙΜΉ B=80 W. 94
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 17: ΔΙΑΓΡΆΜΜΑΤΑ CONTOUR ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΥΝΑΡΤΉΣΕΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΏΝ A ΚΑΙ B ΓΙΑ ΤΗ ΒΈΛΤΙΣΤΗ ΤΙΜΉ C ΌΠΩΣ ΥΠΟΔΕΊΧΘΗΚΕ ΑΠΌ ΤΗ ΜΕΛΈΤΗ. ΑΡΙΣΤΕΡΆ ΤΟ ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΑΝΑΦΈΡΕΤΑΙ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=15 MIN, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΣΤΗ ΤΙΜΉ C=45 MIN. 95
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 18: ΟΠΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ ΜΕΘΌΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΎ ΤΗΣ ΙΚΑΝΌΤΗΤΑΣ ΔΈΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΊΖΑΣ DPPH ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΊΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΎ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΎ..... 96
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 19: ΟΠΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΆΤΩΝ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ, ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΈΘΟΔΟ HPLC-MS. 99
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 20: ΠΟΣΟΣΤΆ ΒΙΩΣΙΜΌΤΗΤΑΣ ΥΓΙΏΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ 3T3 ΥΠΌ ΤΗΝ ΕΠΊΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ, ΤΗΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ. 104
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 21: ΠΟΣΟΣΤΆ ΒΙΩΣΙΜΌΤΗΤΑΣ ΥΓΙΏΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ 3T3 ΥΠΌ ΤΗΝ ΕΠΊΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΊΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΙΑΛΎΤΗ. 105
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 22: ΚΑΜΠΎΛΗ ΑΝΑΦΟΡΆΣ ΓΑΛΛΙΚΟΎ ΟΞΈΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΈΘΟΔΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΎ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC). 116
ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ 23: ΚΑΜΠΎΛΗ ΑΝΑΦΟΡΆΣ ΚΑΤΕΧΊΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΈΘΟΔΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΎ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TFC). 116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ. 46
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ. 47
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΦΥΣΙΚΑ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΗΚΑΝ. 48
ΠΊΝΑΚΑΣ 4: ΣΥΝΘΉΚΕΣ ΕΚΧΎΛΙΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΆΤΩΝ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΎ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΎ. 52
ΠΊΝΑΚΑΣ 5: ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΘΜΩΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ. 57
ΠΊΝΑΚΑΣ 6: ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΤΙΜΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΗΓΗΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ. 58
ΠΊΝΑΚΑΣ 7: ΒΈΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΉΚΕΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΠΟΊΗΣΗΣ MS/MS ΓΙΑ ΚΆΘΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΉ ΜΕΤΆΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΎΜΕΝΩΝ ΕΝΏΣΕΩΝ. 58
ΠΊΝΑΚΑΣ 8: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΆ ΙΌΝΤΑ ΚΑΙ ΧΡΌΝΟΙ ΈΚΛΟΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΌΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΏΝ. 59
ΠΊΝΑΚΑΣ 9: ΚΑΜΠΎΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΆΣ ΚΑΙ ΚΡΙΤΉΡΙΑ ΓΡΑΜΜΙΚΌΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΤΡΙΏΝ ΠΡΌΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΏΝ. 63
ΠΊΝΑΚΑΣ 10: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΌΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΌΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΌΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΌΔΟΥ LC-MS/MS. 63
ΠΊΝΑΚΑΣ 11: NADES ΠΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΤΗΚΑΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΩΣ ΕΚΧΥΛΙΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ. 67
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΑΞΙΟΛΟΗΓΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ NADES. 72
ΠΊΝΑΚΑΣ 13: ΑΠΟΤΕΛΈΣΜΑΤΑ ANOVA ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ REDUCED CUBIC MODEL ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΆΦΕΙ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC). 75
ΠΊΝΑΚΑΣ 14: ΑΠΟΤΕΛΈΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΆ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΉ ΤΟΥ ΜΟΝΤΈΛΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΆΦΕΙ ΤΗΝ ΑΠΌΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ(TFC). 76
ΠΊΝΑΚΑΣ 15:ΑΠΟΤΕΛΈΣΜΑΤΑ ANOVA ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΝΤΈΛΟ REDUCED CUBIC MODEL ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΆΦΕΙ ΤΗΝ ΑΠΌΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC). 78
ΠΊΝΑΚΑΣ 16:ΑΠΟΤΕΛΈΣΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΚΆ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΉ ΤΟΥ ΜΟΝΤΈΛΟΥ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΆΦΕΙ ΤΗΝ ΑΠΌΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC). 79
ΠΊΝΑΚΑΣ 17: ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΤΙΜΕΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΙΑ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ. 81
ΠΊΝΑΚΑΣ 18: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΈΣ ΤΙΜΈΣ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΕΠΙΠΛΈΟΝ ΠΕΊΡΑΜΑ ΕΛΈΓΧΟΥ ΕΠΙΒΕΒΑΊΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΈΛΟΥ. 85
ΠΊΝΑΚΑΣ 19: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΈΣ ΤΙΜΈΣ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΊΡΑΜΑ ΠΟΙΚΙΛΊΑΣ ΑΜΦΊΣΣΗΣ. 85
ΠΊΝΑΚΑΣ 20: ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ (TFC) ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ. 86
ΠΊΝΑΚΑΣ 21: ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΊΗΣΗ ΟΛΙΚΟΎ ΠΕΡΙΕΧΟΜΈΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΏΝ ΕΝΏΣΕΩΝ (TPC) ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ. 91
ΠΊΝΑΚΑΣ 22: ΑΠΟΤΕΛΈΣΜΑΤΑ ΜΕΘΌΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΎ ΤΗΣ ΙΚΑΝΌΤΗΤΑΣ ΔΈΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΊΖΑΣ DPPH ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ. 95
ΠΊΝΑΚΑΣ 23: ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ, ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΣΟΛΗΣ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ HPLC-MS. 98

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΌΝΑ 1: ΤΟ "ΠΡΆΣΙΝΟ ΔΈΝΤΡΟ" ΤΗΣ ΠΡΆΣΙΝΗΣ ΧΗΜΕΊΑΣ.[68] 18
ΕΙΚΌΝΑ 2: ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΊΗΣΗ ΜΕΤΑΞΎ (Α) ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΎ ΔΙΑΛΎΤΗ ΚΑΙ (Β) ΒΑΘΈΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΎ ΔΙΑΛΎΤΗ ΣΕ ΔΙΆΓΡΑΜΜΑ ΔΎΟ ΦΆΣΕΩΝ. MP: ΣΗΜΕΊΟ ΤΉΞΗΣ, ΔTF: ΠΤΏΣΗ ΣΗΜΕΊΟΥ ΤΉΞΗΣ, EC: ΕΥΤΗΚΤΙΚΉ ΣΎΣΤΑΣΗ, EP: ΕΥΤΗΚΤΙΚΌ ΣΗΜΕΊΟ.[59] 33
ΕΙΚΌΝΑ 3: ΑΝΑΠΑΡΆΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΥΤΕΚΤΟΓΈΝΕΣΗΣ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΌ ΕΠΊΠΕΔΟ.[65] 34
ΕΙΚΌΝΑ 4: ΣΥΝΗΘΈΣΤΕΡΟΙ ΔΌΤΕΣ ΚΑΙ ΔΈΚΤΕΣ ΔΕΣΜΟΎ ΥΔΡΟΓΌΝΟΥ. 34
ΕΙΚΌΝΑ 5: ΣΥΣΚΕΎΗ ΕΚΧΎΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΉΧΟΥΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΊΟΥ. 50
ΕΙΚΌΝΑ 6: ΑΡΙΣΤΕΡΆ ΦΑΊΝΕΤΑΙ Η ΡΊΖΑ ΤΟΥ DPPH ΠΟΥ ΈΧΕΙ ΧΡΏΜΑ ΒΑΘΎ ΜΩΒ, ΕΝΏ ΔΕΞΙΆ ΤΟ ΆΧΡΩΜΟ ΠΡΟΪΌΝ ΜΕΤΆ ΑΠΌ ΑΝΤΊΔΡΑΣΗ.[88] 53
ΕΙΚΌΝΑ 7: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΆΦΗΜΑ ΜΊΓΜΑΤΟΣ ΠΡΌΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΆΤΩΝ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ, ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ ΣΥΓΚΈΝΤΡΩΣΗΣ 10 MG/ML. 60
ΕΙΚΌΝΑ 8: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΈΣ ΚΟΡΥΦΈΣ ΚΑΙ ΦΆΣΜΑΤΑ ΜΆΖΑΣ ΜΊΓΜΑΤΟΣ ΠΡΌΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΆΤΩΝ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ 10 MG/ML. 61
ΕΙΚΌΝΑ 9: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΈΣ ΚΟΡΥΦΈΣ ΚΑΙ ΦΆΣΜΑΤΑ ΜΆΖΑΣ ΜΊΓΜΑΤΟΣ ΠΡΌΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΆΤΩΝ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ 10 MG/ML. 61
ΕΙΚΌΝΑ 10: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΈΣ ΚΟΡΥΦΈΣ ΚΑΙ ΦΆΣΜΑΤΑ ΜΆΖΑΣ ΜΊΓΜΑΤΟΣ ΠΡΌΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΆΤΩΝ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ 10 MG/ML. 62
ΕΙΚΌΝΑ 11: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ MTT. 65
ΕΙΚΌΝΑ 12: ΦΑΣΜΑ ^{1}H NMR ΤΟΥ NADES D-ΓΛΥΚΟΖΗ: D,L-ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ. 69
ΕΙΚΌΝΑ 13: : ΠΛΑΚΊΔΙΟ 96-ΘΈΣΕΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΉΚΗ DMSO. 103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΉΜΑ 1: ΟΙ 12 ΑΡΧΈΣ ΤΗΣ ΠΡΆΣΙΝΗΣ ΧΗΜΕΊΑΣ. 17
ΣΧΉΜΑ 2: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ. 20
ΣΧΉΜΑ 3: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΏΝ. 21
ΣΧΉΜΑ 4: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ. 22
ΣΧΉΜΑ 5: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ. 23
ΣΧΉΜΑ 6: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ. 24
ΣΧΉΜΑ 7: ΒΑΣΙΚΆ ΠΛΕΟΝΕΚΤΉΜΑΤΑ ΒΑΘΈΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΏΝ ΔΙΑΛΥΤΏΝ. 36
ΣΧΉΜΑ 8: ΣΧΗΜΑΤΙΚΉ ΑΝΑΠΑΡΆΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΎ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΎ BOX-BEHNKEN. 43
ΣΧΉΜΑ 9: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΌΛΗΣ. 99
ΣΧΉΜΑ 10: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗΣ. 100
ΣΧΉΜΑ 11: ΧΗΜΙΚΌΣ ΤΎΠΟΣ ΤΥΡΟΣΌΛΗΣ. 102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

DES	Βαθέως ευτηκτικός διαλύτης	Deep Eutectic Solvent
NADES	Βαθέως ευτηκτικός διαλύτης φυσικής προέλευσης	Natural Deep Eutectic Solvent
TFC	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων	Total Flavonoid Content
TPC	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων	Total Phenolic Content
OL	Φύλλα Ελιάς	Olive Leaves
Ole	Ελαιοευρωπεΐνη	Oleuropein
Tyr	Τυροσόλη	Tyrosol
HTyr	Υδροξυτυροσόλη	Hydroxytyrosol

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ

Η Πράσινη Χημεία είναι μία νέα προσέγγιση στη χημική έρευνα και την ανάπτυξη χημικών διεργασιών, ένα πολυ-επιστημονικό πεδίο που συνδυάζει διάφορους τομείς, όπως χημική μηχανική, βιολογία, φυσική, οικονομικά και νομική. Πιο συγκεκριμένα, η πράσινη χημεία ορίζεται από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διαδικασιών για τη μείωση ή εξάλειψη της χρήσης και δημιουργίας επικίνδυνων ουσιών καθώς και για τη βέλτιστη αξιοποίηση ενεργειακών πόρων.[67] Η πράσινη χημεία βρίσκει εφαρμογή στην αεροδιαστημική, στην αυτοκινητοβιομηχανία, στα καλλυντικά, στην ηλεκτρονική, στην ενέργεια, στα οικιακά προϊόντα, στη φαρμακευτική, στη γεωργία κ.ά., ιδιαίτερα λόγω της προσέγγισής της γύρω από τη βιωσιμότητα σε μοριακό επίπεδο, ενώ έχει καταφέρει να έχει μεγάλο αντίκτυπο λόγω του ότι βρίσκει εφαρμογή και στη βιομηχανία πέρα από το ερευνητικό εργαστήριο.

Για την καλύτερη διεξαγωγή του σχεδιασμού και επικύρωση του στόχου που είναι η βιωσιμότητα έχουν οριστεί 12 αρχές της πράσινης χημείας, οι οποίες είναι “κανόνες σχεδιασμού” και εισήχθησαν το 1998 από τους Paul Anastas και John Warner.[68]Αναφορικά οι αρχές είναι οι εξής: πρόληψη παραγωγής αποβλήτων, οικονομία ατόμων, σχεδιασμός λιγότερο επικίνδυνων συνθετικών μεθοδολογιών, σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων, χρήση ασφαλέστερων διαλυτών και αντιδραστηρίων, σχεδιασμός ενεργειακά αποδοτικών χημικών διεργασιών, χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, ελαχιστοποίηση χημικών τροποποιήσεων, χρήση εκλεκτικών καταλυτών, σχεδιασμός για αποικοδόμηση, έλεγχος ρύπων σε πραγματικό χρόνο και σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών διεργασιών για την πρόληψη ατυχημάτων. Στο παρακάτω Σχήμα 1 παρουσιάζονται ευδιάκριτα οι αρχές της πράσινης χημείας.

Σχήμα 1: Οι 12 αρχές της πράσινης χημείας.

Στην παρακάτω Εικόνα 1 παρουσιάζεται το "Πράσινο Δέντρο", το οποίο είναι η οπτικοποίηση του εύρους της έρευνας και των επιτευγμάτων που προκύπτουν από τις πρακτικές της Πράσινης Χημείας, συγκεκριμένα τα κλαδιά είναι οι 12 αρχές, ενώ τα φύλλα είναι τα πεδία έρευνας και ανάπτυξης που σχετίζονται με την αντίστοιχη αρχή κλειδί.[68]

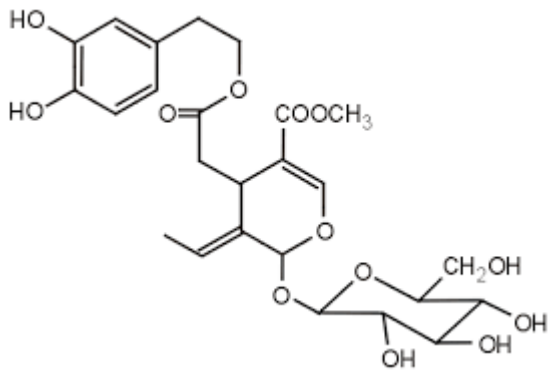
Εικόνα 1: Το "Πράσινο Δέντρο" της Πράσινης Χημείας.[68]

1.2 Η ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ ΩΣ ΠΛΟΥΣΙΕΣ ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

Η ελιά (*Olea europaea*) έχει καλλιεργηθεί για χιλιάδες χρόνια σε όλη την Ευρώπη και τη Βόρεια Αφρική και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για θεραπευτικό σκοπό στην αρχαία Αίγυπτο, ενώ στην Ελλάδα είναι συνυφασμένη με την ιστορία της. Κατά τη δεκαετία του 1800 χρησιμοποιήθηκε τσάι από ελιές για να θεραπεύσει ασθενείς από ελονοσία, ενώ κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, η καλλιέργεια της ελιάς έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο λόγω των οφελών για την υγεία που αποδίδονται στα βιοδραστικά της συστατικά.[36] Οι ελιές καλλιεργούνται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου που χαρακτηρίζονται από τις εκτεταμένες περιόδους ηλιοφάνειας, αλλά και του υψηλού ρυθμού προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς και έντομα. Για την καταπολέμηση αυτών των στρεσογόνων καταστάσεων, τα ελαιόδεντρα συνθέτουν μεγάλους όγκους βιοδραστικών συστατικών, συγκεκριμένα, μεταξύ άλλων, πολυφαινολών, οι οποίες αποθηκεύονται σε μεγάλο βαθμό στα παχιά φύλλα τους.[33] Να σημειωθεί ότι υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες ελιάς, η άγρια και η ήμερη, με την πρώτη να παρουσιάζει χαρακτηριστικά άμυνας, όπως αντοχή σε ασθένειες και προσαρμογή σε δυσμενείς συνθήκες.

Ο καρπός της ελιάς καθώς και τα φύλλα της θεωρούνται ευεργετικά και με σημαντικά οφέλη για την υγεία, καθώς αποτελεί άφθονο φυτικό υλικό που παρουσιάζει μια πιθανή πηγή ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας γι’ αυτό και διάφοροι πολιτισμοί χρησιμοποίησαν τα φύλλα σε παραδοσιακά φάρμακα.

Σήμερα, τα φύλλα ελιάς έχουν συνδεθεί με ισχυρά αντιμικροβιακά, καρδιαγγειακά, αντιφλεγμονώδη, αναλγητικά, αντιυπερτασιακά, αντι-HIV, αντικαρκινικά και αντιοξειδωτικά οφέλη.[49,45] Τα φύλλα ελιάς εμποδίζουν την ανάπτυξη ιών, βακτηριδίων, ζυμών και παρασίτων, όπως επίσης έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν την πίεση αίματος και τη χοληστερίνη στα ζώα.[66]Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φύλλα ελιάς βοηθούν στην πρόληψη της δημιουργίας ιών, αλλοιώνοντας την κυτταρική μεμβράνη του ιού. Διαταράσσουν, επίσης, την παραγωγή αναγκαίων πρωτεϊνών και αμινοξέων, τα οποία ο ιός χρειάζεται για να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί. Η ελιά περιέχει μεταξύ άλλων φαινόλες, πολυφαινόλες, στερόλες, καροτένια, τοκοφερόλες, φλαβονοειδή. Το κύριο συστατικό της ελιάς, μεταξύ άλλων, αποτελεί η ελαιοευρωπεΐνη, μία πολυφαινόλη υπεύθυνη για πολλές από τις ιδιότητες της ελιάς. Η ελαιοευρωπεΐνη βρίσκεται κυρίως στα φύλλα, αλλά και στους καρπούς της ελιάς. Περισσότερα συστατικά της ελιάς αναλύονται στη συνέχεια στην παράγραφο 1.3.



Σχήμα 2: Χημικός τύπος ελαιοευρωπεΐνης.

Η πληθώρα ευεργετικών συστατικών, που βρίσκονται στα φύλλα ελιάς οδήγησε την ερευνητική κοινότητα στην εύρεση τρόπων απομόνωσής τους μέσω διεργασιών, όπως η εκχύλιση. Η χημική σύνθεση των φύλλων διαφοροποιείται αναλόγως την προέλευση, την ποικιλία, τις συνθήκες αποθήκευσης, την ποσότητα κλαδιών του δέντρου, τις κλιματικές αλλαγές, το επίπεδο υγρασίας και το βαθμό επιμόλυνσης με χώμα κι έλαια. Επιπλέον, η σύσταση των φύλλων διαφοροποιείται βάσει της ξήρανσης που έχουν υποστεί, καθώς αλλοιώνει σε σημαντικό βαθμό τη σύσταση και τα θρεπτικά συστατικά των φύλλων. Ενδείκνυται η ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπως και η χρήση ξηρού αέρα σε σκιερό μέρος, διεργασίες που δεν επιφέρουν επιζήμια αποτελέσματα στο υλικό. Τέλος, η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης πρέπει να γίνεται προσεκτικά, καθώς επηρεάζει τη σύσταση του εκχυλίσματος.

1.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

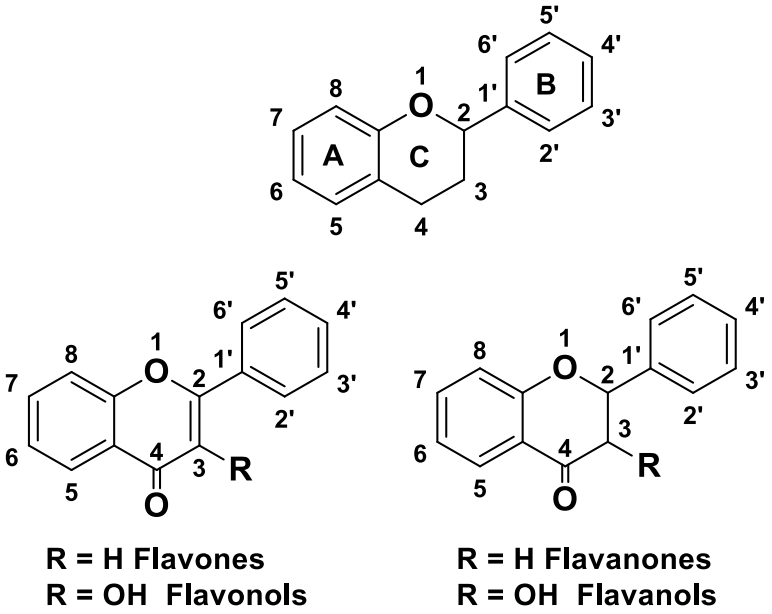
Τα κύρια συστατικά των φύλλων ελιάς είναι τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένων φλαβονών (λουτεολίνη-7-γλυκοζίτη, απιγενίνη-7-γλυκοσίδη, διομετιν-7-γλυκοσίδη, λουτεολίνη και διομετίνη) και των φλαβονολών (ρητίνη, κατεχίνη), οι πολυφαινόλες (υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, βανιλίνη, βανιλικό οξύ, καφεϊκό οξύ), τα σεκοϊριδοειδή (ελαιοευρωπεΐνη), οι λιγνάνες καθώς και οι απλές φαινόλες και οξέα σε μικρότερο ποσοστό.[49] Μεταξύ αυτών σε μεγάλο ποσοστό παρουσιάζονται τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή, συγκεκριμένα η ελαιοευρωπεΐνη και εκ των πολυφαινολών η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη.

Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί παράγοντες ικανοί να διαφοροποιήσουν την ποιοτική και ποσοτική φαινολική σύνθεση των φύλλων ελιάς όπως η περιοχή, η ημερομηνία συλλογής, η περιεκτικότητα σε υγρασία, οι συνθήκες αποθήκευσης, ο τρόπος ξήρανσης και

εκχύλισης.[49,45,64] Αυτά τα συστατικά είναι υπεύθυνα για τις βιολογικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς, όπως είναι μεταξύ άλλων η αντιοξειδωτική και η αντικαρκινική δράση.[55]

1.3.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία ομάδα φυσικών φαινολικών. Ο όρος φλαβονοειδή προέρχεται από τη λατινικής προέλευσης λέξης Flavus που σημαίνει κίτρινο και αναφερόταν αρχικά στις ενώσεις κίτρινου χρώματος, οι οποίες εμπεριείχαν φλαβόνες. Με την παρέλευση των χρόνων, ο όρος διευρύνθηκε και σε άλλες φυτικές πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των έντονα χρωματισμένων φλαβονών, των άχρωμων φλαβονο-3-ολών καθώς και των κόκκινων και μπλε ανθοκυανίδων. Τα φύλλα ελιάς αποτελούν ισχυρή πηγή φλαβονοειδών ανεξαρτήτως παραμέτρων δειγματοληψίας (καλλιέργεια ελιάς, ηλικία φύλλων ή ημερομηνία δειγματοληψίας). Τα φύλλα και τα άνθη της ελιάς περιέχουν φλαβονοειδή όπως η κουερσετίνη, η καμπεφερόλη και η εσπεριτίνη.[61] Μερικά φλαβονοειδή που παρουσιάζονται συχνά στη βιβλιογραφία είναι η λουτεολίνη-7-γλυκοζίτη, η ρητίνη, η λουτεολίνη και η απιγενίνη-7-γλυκοζίτη.[11] Τα φλαβονοειδή σχηματίζονται αποκλειστικά σε φυτά, κι όχι ζώα, από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη σε συνδυασμό με μονάδες οξικού. Τα φλαβονοειδή είναι παράγωγα βενζο-γ-πυρόνης αποτελούμενα από έναν δακτύλιο βενζολίου (δακτύλιος A) συνδεδεμένο σε έναν εξαμελή ετερόκυκλο (δακτύλιος C), ο οποίος φέρει στη θέση C2 μια ομάδα φαινυλίου (δακτύλιος B) ως υποκαταστάτη. Ο δακτύλιος C είναι είτε γ-πυρόνη (φλαβόνες και φλαβονολόλες), είτε 2,3-διυδροπαραγωγός του (φλαβανόνες και φλαβονόλες). Στο Σχήμα 3 φαίνονται οι χημικοί τύποι των φλαβονοειδών και ο σχηματισμός φλαβανονών και φλαβονολών.



Σχήμα 3: Χημικός τύπος φλαβονοειδών.

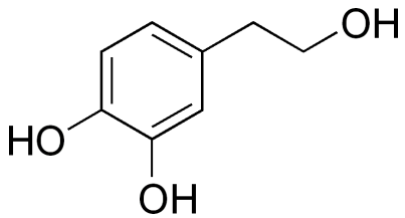
Τα φλαβονοειδή διαθέτουν ιδιαίτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, στις οποίες και οφείλονται οι βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών, δηλαδή οι αντιαλλεργικές, οι αντιικές, οι αντιφλεγμονώδεις και οι αγγειοδιασταλτικές. Αυτές οι ιδιότητες εκφράζονται με επιτυχία με καταστολή του σχηματισμού αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, αναστέλλοντας ιχνοστοιχεία χηλίωσης ή ένζυμα εμπλεκόμενα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, με σάρωση ειδών ριζών και με ρύθμιση αντιοξειδωτικής άμυνας.[19] Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η συμβολή των φλαβονοειδών στην καταπολέμηση του κινδύνου χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου.[51]

1.3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μόρια που παρουσιάζονται σε αφθονία στο βιοδραστικό προφίλ των φύλλων ελιάς. Στις πολυφαινόλες οφείλεται η αντιοξειδωτική και η αντιμικροβιακή δράση των φύλλων ελιάς.[33]

1.3.2.1 ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ

Η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη) (Σχήμα 4) είναι φαινυλαιθανοειδές, τύπος φαινολικού φυτοχημικού, κύριο παράγωγο της ελαιοευρωπεΐνης. Η ίδια σε καθαρή μορφή είναι άχρωμο και άοσμο υγρό, ενώ μπορεί να βρεθεί και σε μορφή μπεζ σκόνης ως παραπροϊόν της βιομηχανίας ελαιόλαδου.



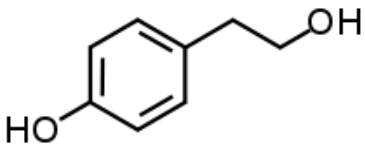
Σχήμα 4: Χημικός τύπος υδροξυτυροσόλης.

Έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση λόγω της παρουσίας κατεχόλης στο μόριό της.[35] Πιο συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται στη δωρεά υδρογόνου και στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ελεύθερου υδρογόνου της υδροξυλομάδας του και των φαινοξυλοριζών. Έτσι δημιουργείται μια νέα ρίζα, η οποία σταθεροποιείται λόγω του συντονισμού της αρωματικής δομής, επομένως η φάση πολλαπλασιασμού εμποδίζεται και η ανάπτυξη της οξείδωσης καθυστερεί.[61] Επίσης, η υδροξυτυροσόλη διαθέτει ιδιαίτερες φαρμακολογικές ικανότητες, συγκεκριμένα προστατεύει τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα από την οξειδωτική βλάβη, μειώνει την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίων στα ανθρώπινα κύτταρα προμονοκυττάρων, αναστέλλει

τη βλάβη που εξαρτάται από το υπεροξυνιτρίτη, προκαλεί την απόπτωση του εξαρτώμενου από το κυτοχρώμιο C, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τα λευκοκύτταρα λευκοτριένιο.[8]

1.3.2.2 ΤΥΡΟΣΟΛΗ

Η τυροσόλη (4- (2-υδροξυαιθυλο) φαινόλη) (Σχήμα 5) είναι φαινυλαιθανοειδές, αποτελεί παράγωγο της φαιναιθυλικής αλκοόλης κι είναι ένα φυσικό φαινολικό αντιοξειδωτικό που υπάρχει σε μια ποικιλία φυσικών πηγών.



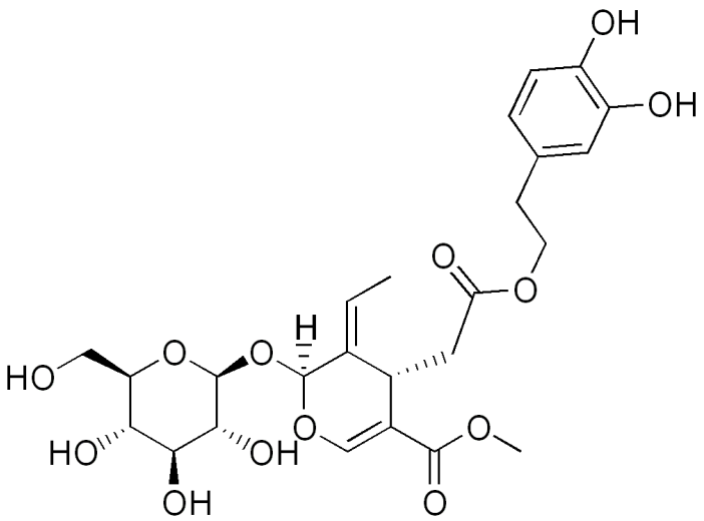
Σχήμα 5: Χημικός τύπος τυροσόλης.

Η τυροσόλη, συνήθως συναντάται στο ελαιόλαδο και σε μικρές ποσότητες στα φύλλα ελιάς. Η ίδια έχει αντιοξειδωτική δράση, αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο άλλων φαινολικών ενώσεων, αλλά λόγω της χημικής της σταθερότητας είναι λιγότερο επιρρεπής στο να υποβαθμιστεί με αυτοοξείδωση.[29]

Μελέτες έχουν δείξει ότι η τυροσόλη έχει ιδιαίτερα αποτελεσματική δράση έναντι ορισμένων ασθενειών. Για παράδειγμα, η τυροσόλη μπορεί να ασκήσει την ευεργετική της δράση κατά της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, της στεφανιαίας νόσου, της χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας. Μπορεί να προστατεύσει το μυοκάρδιο από το στρες, σχετιζόμενο με την ισχαιμία, θεωρώντας το ως θεραπεία αντιγήρανσης. Επιπλέον, η τυροσόλη είναι δυνατόν να βελτιώσει την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου και να εξαλείψει τη μικροαγγειακή σπανιότητα στον εγκεφαλικό φλοιό. Τέλος, η τυροσόλη καταστέλλει την οστεοπενία, αυξάνοντας το σχηματισμό οστού, πιθανώς λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης.[10]

1.3.3 ΣΕΚΟΪΡΙΔΟΕΙΔΗ

Στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών συγκαταλέγεται η ελαιοευρωπεΐνη (Σχήμα 6), η οποία είναι το κύριο συστατικό των φύλλων ελιάς. Η ελαιοευρωπεΐνη είναι ένας ετεροσιδικός εστέρας του β-γλυκοζυλιωμένου ελενολικού οξέος και της υδροξυτυροσόλης που μπορεί να μετασχηματιστεί με ενδογενές ή εξωγενές ένζυμο β-γλυκοσιδάση σε γλυκόζη και αγλυκόνη ελαιοευρωπεΐνης.



Σχήμα 6: Χημικός τύπος ελαιοευρωπεΐνης.

Εάν ακολουθήσει εστερόλυση της αγλυκόνης ελαιοευρωπεΐνης προκύπτει η υδροξυτυροσόλη που αναφέρθηκε προηγουμένως.[8] Έχει διαπιστωθεί ότι η ίδια παρουσιάζει σημαντικές αντιιικές ιδιότητες, προστατεύει τα ένζυμα και τον υπερτασικό κυτταρικό θάνατο στους καρκινοπαθείς, εμποδίζει τις καρδιακές παθήσεις αναστέλλοντας την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, βελτιώνει τον μεταβολισμό των λιπιδίων περιορίζοντας τα προβλήματα παχυσαρκίας. Επίσης, είναι υπεύθυνη για θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες της ελιάς, ειδικά της πικρίας, ενώ βοηθά στην άμυνα των φυτών έναντι των παθογόνων και των φυτοφάγων μικροοργανισμών.[14] Εκτός των άλλων, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η ελαιοευρωπεΐνη είναι γνωστή για την υπογλυκαιμική, αντιυπερτασιακή και αντιφλεγμονώδη δράση της.[7] Τέλος, μία πρόσφατη μελέτη ενθαρρύνει τη χρήση της ελαιοευρωπεΐνης ως φυσικό παράγοντα θεραπείας της στεφανιαίας νόσου.[37]

1.4 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς καθώς και τα συστατικά που περιέχονται σε αυτά χαρακτηρίζονται από ποικίλες δράσεις. Στη συνέχεια γίνεται εκτενέστερη αναφορά στην αντιοξειδωτική δράση και στην κυτταροτοξικότητα των φύλλων ελιάς, διότι αυτές μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Οι δράσεις των φύλλων ελιάς οφείλονται κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε ελαιοευρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη.

Πιο συγκεκριμένα, η ελαιοευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζουν αντιθρομβωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, επιδρούν ευεργετικά σε πτυχές καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της

αγγειοδιασταλτικής, αντιαιμοπεταλιακής συσσώρευσης και αντιισχαιμικής δράσης της. Επίσης, μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης αναστέλλουν την οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες.[15] Τα φύλλα ελιάς είναι συνδεδεμένα, εκτός των άλλων, με αντιδιαβητική και αντιυπερτασική δράση, χαρακτηριστικά που προέρχονται κυρίως από την ελαιοευρωπεΐνη και την υδροξυτυροσόλη, εξ' ου και η χρήση τους ως ιατρικό βότανο για θεραπεία διαβητικής υπεργλυκαιμίας και μολυσματικών ασθενειών.[45,34,24] Η υδροξυτυροσόλη έχει συνδεθεί με τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και την αποτροπή της διαβητικής νευροπάθειας.[10]

1.4.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την οξείδωση λιπών και ελαίων και τις αλλαγές χρώματος των τροφίμων, αναστέλλοντας τις αντιδράσεις έναρξης και διάδοσης της αυτοοξείδωσης. Ειδικότερα, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, τα μέταλλα και το μοριακό οξυγόνο. Ειδικότερα, ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών συσχετίζεται σημαντικά με το φυσικό μεταβολισμό των αερόβιων κυττάρων, καθώς κατά την κατανάλωση οξυγόνου, δημιουργείται μία σειρά ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Κατ' επέκταση, η αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών με μόρια λιπιδικής φύσης παράγει καινούριες ρίζες, όπως είναι τα υδροϋπεροξείδια και άλλα υπεροξείδια. Αυτές οι ρίζες ασκούν κυτταροτοξική συμπεριφορά στα βιολογικά συστήματα με τα οποία μπορεί να αλληλεπιδράσουν, προκαλώντας ασθένειες, όπως καρκίνος και καρδιαγγειακές παθήσεις.[43]Έτσι, οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή αναχαιτίζουν αυτή τη συμπεριφορά με την αντιοξειδωτικής τους δράση, η οποία είναι κυρίως βασισμένη στις ιδιότητες οξειδοαναγωγής των φαινολικών υδροξυλομάδων τους και στις δομές τους.[62]

Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιοξειδωτικών, τα φυσικά και τα συνθετικά, βέβαια, αναλόγως τον τρόπο δράσης τους χωρίζονται σε πρωτογενή (κύρια) και σε δευτερογενή (συνεργιστικά).

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες με αντιοξειδωτικές ενώσεις. Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής τους δράσης, διαδραματίζουν διάφοροι παράγοντες, όπως το είδος του φυτού, οι συνθήκες καλλιέργειας, ο χρόνος συλλογής, ο τρόπος επεξεργασίας, οι συνθήκες, αλλά και ο διαλύτης εκχύλισης.[61] Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα φύλλα ελιάς είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες, γι' αυτό και οι έρευνες συνεχώς

πολλαπλασιάζονται, ειδικά όσον αφορά τις δυνατότητες της ελιάς για χρήση στην ιατρική και στη φαρμακευτική βιομηχανία, αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων.[45,49]

Μία από τις σημαντικότερες δράσεις των φύλλων ελιάς είναι η αντιοξειδωτική. Οι περισσότερες έρευνες για την αντιοξειδωτική δράση των φύλλων ελιάς έχουν βασιστεί στη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πικρυλυδραζίλιο). Τελικά, διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς οφείλεται στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων καθώς επίσης ότι ο διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα.[61,73,15,33]

Μία διαφορετική μελέτη που διεξήχθη για την πρόβλεψη αντιοξειδωτικών επιδράσεων στις βιοχημικές διεργασίες χρησιμοποίησε τεχνικές για την αξιολόγηση της δραστηριότητας σάρωσης έναντι αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου, που παράγονται in vivo, για παράδειγμα, υποχλωριούχο οξύ (HOCl), υπεροξείδιο ανιόν ($O2^-$) και νιτρικό οξείδιο (NO). Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς διακρίνεται για την αντιοξειδωτική του ικανότητα, καθώς έχει ανασταλτικό ρόλο έναντι της δράσης δραστικών ειδών, που συμμετέχουν σε κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες και προστατευτικό προς τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα από την οξειδωτική βλάβη. Επίσης, το εκχύλισμα φύλλων ελιάς μπορεί να βρει χρήση ως φυσικό αντιοξειδωτικό στη διατήρηση προϊόντων τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, όπου λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές αλλοιώσεις. Βέβαια,δεν βρέθηκε σε ποιες ενώσεις οφείλεται ακριβώς η αντιοξειδωτική δράση.[65] Ωστόσο, σε μία έρευνα που ακολούθησε από τους ίδιους, διαπιστώθηκε ότι, όντως, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς οφείλεται κυρίως στην παρουσία των φαινολικών ενώσεων, λόγω της δομής τους, δηλαδή των χαρακτηριστικών των λειτουργικών τους ομάδων.[66] Πιο συγκεκριμένα, οι Bevanente-Barcia et al. έχουν μελετήσει το που οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς. Για τα φλαβονοειδή υπάρχουν τρεις δομικές ομάδες που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική δράση, η δομή της κατεχόλης στο δακτύλιο Β, η οποία προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα στις ρίζες αροξυλίου, ο 2,3-διπλός δεσμός, υπεύθυνος για τη μετάθεση των ηλεκτρονίων από τον δακτύλιο Β, καθώς και η παρουσία των 3 και 5 υδροξυλομάδων, οι οποίες μεγιστοποιούν την ικανότητα απομάκρυνσης και απορρόφηση ριζών. Για τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις, μόνο η δομή της κατεχόλης που υπάρχει στις χαρακτηριστικές τους ομάδες είναι υπεύθυνη για την αντιοξειδωτική τους δράση.[62]

1.4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Τα εκχυλίσματα που προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες και περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις, έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν πιθανή πηγή ενώσεων με έντονη κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων, όπως λευχαιμικά, του παχέος εντέρου και του μαστού. Σημαντικό παράδειγμα αποτελούν πολλές μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, πάνω σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Έχει αποδειχθεί ότι, τα εκχυλίσματα είναι δυνατόν να μειώσουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων καρκίνου του μαστού, όταν αυτά συνδυάζονται με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-HER2 trastuzumab.[33] Να σημειωθεί ότι, η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ποικιλία της ελιάς, την απόδοση της διαδικασίας εκχύλισης ή την ποσότητα φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο εκχύλισμα.[9]

Μελέτες έχουν διεξαχθεί για τα κύρια συστατικά των φύλλων ελιάς, όπως για την ελαιοευρωπεΐνη και την υδροξυτυροσόλη, η οποία φαίνεται να προστατεύει τον οργανισμό από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο προκαλεί βλάβη στο DNA και γονιδιακές μεταλλάξεις.[41] Ωστόσο, μία μελέτη, η οποία διεξήχθη για τον εντοπισμό των συνθηκών που οδηγούν την ελαιοευρωπεΐνη και την υδροξυτυροσόλη στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων απέναντι του, απέδειξε ότι η ελαιοευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη, σε κοινά χρησιμοποιούμενα μέσα, υπό συγκεκριμένες συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας και σε υψηλές συγκεντρώσεις, παράγουν σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου. Οι αρνητικές επιπτώσεις αυτής της παραγωγής επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των καρκινικών, αλλά και των φυσιολογικών κυττάρων.[23]

1.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ

1.5.1 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η εκχύλιση αποτελεί το πρώτο βήμα διαχωρισμού ενός φυσικού προϊόντος από τις πρώτες ύλες, πιο συγκεκριμένα είναι μία φυσική διεργασία διαχωρισμού ενός ή περισσοτέρων συστατικών ενός μίγματος. Αναλυτικότερα, το μίγμα μπορεί να είναι υγρό ή στερεό. Στην περίπτωση του υγρού μίγματος τα συστατικά διαχωρίζονται με κατάλληλο διαλύτη, στον οποίο τα συστατικά διαλύονται, ενώ στην περίπτωση του στερεού, ένα διαλυτό συστατικό απομακρύνεται από αδρανές στερεό με την επίδραση κατάλληλου διαλύτη. Γενικά, κατά την εκχύλιση ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια[71]:

(1) ο διαλύτης διεισδύει στη στερεά μήτρα του φυσικού προϊόντος,

(2) η διαλυμένη ουσία διαλύεται στους διαλύτες,

(3) η διαλυμένη ουσία διαχέεται από τη στερεά μήτρα,

(4) συλλέγεται το εκχύλισμα.

Επιθυμείται η συμμετοχή παραγόντων ενίσχυσης διαλυτότητας και διάχυσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν ο διαχωρισμός με απόσταξη δεν είναι εύκολος ή αποτελεσματικός, η εκχύλιση αποτελεί σημαντική εναλλακτική, καθώς τα μίγματα με κοντινά σημεία ζέσεως ή ουσίες με μικρή ανοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορούν να διαχωριστούν με εκχύλιση, που βασίζεται σε χημικές διαφορές και όχι σε διαφορές τάσεων ατμών.[58]

Στην εκχύλιση, καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει ο διαλύτης, ο οποίος αποτελεί παράγοντα διαχωρισμού και πρέπει να είναι εκλεκτικός και μη αναμίξιμος με την επιθυμητή ουσία που επιθυμείται να απομακρυνθεί, φθηνός και ασφαλής για χρήση σε μεγάλη ποσότητα. Η διεργασία βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα της μεταφερόμενης ουσίας μεταξύ αρχικού και προστιθέμενου διαλύτη. Επίσης, ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι κρίσιμος, καθώς πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να αποφέρουν την αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ουσιών, αλλά και του διαλύτη με αποτέλεσμα να παραμείνουν ακαθαρσίες στο εκχύλισμα.[71] Ένας ακόμη παράγοντας είναι ο χρόνος εκχύλισης, που διαφέρει σημαντικά από μέθοδο σε μέθοδο, η αύξηση του οποίου αυξάνει την απόδοσή της εντός ενός συγκεκριμένου εύρους. Μετά το πέρας της ισορροπίας, η αύξηση του χρόνου δεν επιφέρει καμία αλλαγή.

Οι εκχυλιστικές μέθοδοι κατηγοριοποιούνται σε συμβατικές και μη συμβατικές. Στις συμβατικές μεθόδους ανήκουν η διαβροχή, η διήθηση, η εκχύλιση Soxhlet και η εκχύλιση με χρήση διαλύτη, με μεγάλα μειονεκτήματα την απαίτηση σε μεγάλο όγκο διαλυτών και το μεγάλο χρόνο εκχύλισης.

Στις μη συμβατικές ανήκουν η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, η εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά, η εκχύλιση με υποκρίσιμα υγρά και η ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση. Σε αντίθεση με τις συμβατικές, οι μη συμβατικές μέθοδοι διακρίνονται για την ταχύτητα, την υψηλή απόδοση, την απλότητα, τη δυνατότητα εφαρμογής σε δείγματα που περιέχουν ίχνη ή και μεγάλες

ποσότητες ουσίας, μικρότερη κατανάλωση οργανικού διαλύτη και υψηλότερη εκλεκτικότητα.[71]

1.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Η εκχύλιση υποβοήθουμενη με υπερήχους αποτελεί μία πράσινη καινοτόμο τεχνολογία, η οποία χρησιμοποιείται εν γένει για την εκχύλιση φυσικών προϊόντων, ειδικότερα για θερμοευαίσθητα και ασταθή.[71]

Η αρχή των υπέρηχων βασίζεται στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης, όπου χρησιμοποιούνται ακουστικά κύματα για τη διατάραξη των βιολογικών μεμβρανών και τη διευκόλυνση της διάχυσης των ενώσεων στόχων από τη στερεή μήτρα προς τον διαλύτη.[27] Το κύμα διαδίδεται μέσα στο προς εκχύλιση στερεό, σαν μια διαταραχή των σωματιδίων του, η οποία συντηρεί τη διάδοση του κύματος. Η ταλάντωση συμβαίνει κατά μήκος της διεύθυνσης διάδοσης του κύματος και δημιουργεί ένα διαμήκες κύμα, που δεν συνοδεύεται από συνολική μετατόπιση των σωματιδίων και μεταφορά μάζας.[77] Τα διαμήκη κύματα σχηματίζουν περιοχές εναλλασσόμενων κυμάτων συμπίεσης και διαστολής, τα οποία επάγονται στα μόρια του μέσου. Κατά τη διαστολή δημιουργούνται φυσαλίδες στο υγρό, με άμεσο αποτέλεσμα την αρνητική πίεση, η οποία εξαρτάται από τη φύση και την καθαρότητα του υγρού. Δυναμική ισορροπία αποκαθίσταται όταν επέλθει σταθερή ένταση υπέρηχων μεταξύ του σχηματισμού και της κατάρρευσης των φυσαλίδων. Όταν οι φυσαλίδες σπηλαίωσης καταρρέουν κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα, η υψηλή πίεση και η θερμοκρασία δημιουργούν μικροπίδακες και κύματα κρούσης που κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα και την αύξηση του ρυθμού της μεταφοράς μάζας. Πραγματοποιούνται δυο φυσικά φαινόμενα, ο εμποτισμός της φυτικής ύλης από τον διαλύτη, με σκοπό τη διάχυση αυτού στο εσωτερικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και η έκπλυση των συστατικών των κυττάρων όταν τα τοιχώματα διαρρηχθούν. Τελικά, η μεταφορά ουσιών στόχων στο διαλύτη πραγματοποιείται μέσω των φαινομένων διάχυσης και ώσμωσης. Συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι διευκολύνουν την διόγκωση και την ενυδάτωση προκαλώντας μεγέθυνση των πόρων των κυτταρικών τοιχωμάτων ευνοώντας την διαδικασία έκπλυσης.[40] Καθώς οι υπέρηχοι αυξάνουν την πρόσληψη νερού στο φυτικό υλικό (δείκτης διόγκωσης), η απόδοση της εκχύλισης είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι στην περίπτωση της μηχανικής ανάδευσης.[91]

1.5.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Για τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους υπάρχουν δύο είδη εξοπλισμού: το λουτρό και το probe υπερήχων. Το λουτρό υπερήχων είναι μία απλή συσκευή, η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον σε εργαστηριακό επίπεδο, ωστόσο αυτή η μέθοδος έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα, τη μη ομοιόμορφη διάχυση της ισχύος στο δείγμα προς μελέτη, χαρακτηριστικό που οδηγεί τους ερευνητές να επιλέξουν το probe υπερήχων.[73] Το probe υπερήχων επιτρέπει την ενίσχυση και τη συμπύκνωση της ενέργειας υπερήχων σε όλη την έκταση του μίγματος, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, σε σύγκριση με αυτή των λουτρών και δίνοντας τη δυνατότητα ευρύτερης επιλογής παραμέτρων για ερευνητικούς λόγους.[54,42] Κατά την εκχύλιση το probe υπερήχων βυθίζεται στο δοχείο, όπου βρίσκεται η πρώτη ύλη και ο διαλύτης, δηλαδή βρίσκεται σε άμεση επαφή. Ο όγκος του δείγματος προς εκχύλιση καθορίζει το μέγεθος του probe, ενώ το δοχείο τις νεκρές ζώνες, δηλαδή τα σημεία που δεν ακουμπά το probe, οι οποίες πρέπει να είναι ελαχιστοποιημένες.[42]

1.5.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Πολλές είναι οι παράμετροι που επιδρούν θετικά ή αρνητικά στη διεργασία της εκχύλισης υποβοηθούμενη με υπερήχους. Δύο είναι οι βασικοί παράγοντες προς την ενίσχυση της απόδοσης της εκχύλισης με τη βοήθεια υπερήχων, η ικανοποιητική διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και η επαρκής μεταφορά μάζας. Σε αντίθεση με άλλες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, τα φυτικά εκχυλίσματα διαχέονται κατά μήκος των κυτταρικών τοιχωμάτων σε συντομότερο διάστημα.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου σε σχέση με συμβατικές τεχνικές εκχύλισης αποτελεί η υψηλή απόδοση της εκχύλισης με εύκολη ανάμιξη, το μικρό κόστος της διεργασίας και ο μικρός χρόνος εκχύλισης σε συνδυασμό με την ταχύτερη απόκριση κατά τον έλεγχο της διαδικασίας, η ταχύτερη μεταφορά ενέργειας, η μείωση της ενέργειας και της χρήσης του διαλύτη και τέλος η επιλεκτική εκχύλιση.[31] Ωστόσο, παρουσιάζονται μερικά μειονεκτήματα, όπως η μειωμένη ισχύς με την πάροδο του χρόνου, η έλλειψη ομοιομορφίας στην κατανομή της ενέργειας των υπερήχων, αναλόγως τη συσκευή εκχύλισης και η μείωση της αναπαραγωγιμότητας και επαναληψιμότητας των πειραμάτων.

Ωστόσο, υπάρχουν κι άλλες παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Παρακάτω αναφέρονται μερικές εξ αυτών.

1. Ο διαλύτης αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα του αποτελέσματος της εκχύλισης, οπότε πρέπει να επιλέγεται με προσοχή. Μερικά από τα κριτήρια επιλογής του διαλύτη είναι τα εξής:
   - δυνατότητα απομάκρυνσης του διαλύτη, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων του στο τελικό εκχύλισμα.
   - την δυνατότητα ανακύκλωσης ή και ανάκτησης του διαλύτη, με σκοπό την ελαχιστοποίηση ποσοτήτων που χρησιμοποιούνται για οικονομικούς λόγους.
   - την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του διαλύτη, διότι ο διαλύτης πρέπει να είναι ικανός να διαπερνά την μήτρα του υλικού και το ιξώδες του θα πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να ρέει εύκολα. Αποφεύγεται η υψηλή επιφανειακή τάση, γιατί μειώνει τα φαινόμενα σπηλαίωσης.
   - τη διαβρεξιμότητα του διαλύτη, η οποία είναι επίσης σημαντική καθώς και αυτή επηρεάζει την διείσδυση του διαλύτη μέσα στους πόρους της μήτρας
   - τις υπόλοιπες ιδιότητες του διαλύτη, καθώς ο διαλύτης πρέπει να είναι μη τοξικός, σταθερός (χημικά και θερμικά), μη αντιδραστικός, μη διαβρωτικός, μη εύφλεκτος, ασφαλής προς το περιβάλλον και οικονομικά προσιτός.
2. Για την επίτευξη των αποτελεσματικών φυσαλίδων σπηλαίωσης, πρέπει η αρνητική πίεση κατά τον κύκλο σπηλαίωσης να υπερβαίνει τις φυσικές συνεκτικές δυνάμεις στο μέσο. Συνιστάται, επίσης, υψηλή ένταση ώστε να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες μηχανικές δονήσεις που προκαλούν την σπηλαίωση. Επιθυμείται ο έλεγχος της θερμοκρασίας, καθώς η υψηλή θερμοκρασία επιφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα, λόγω της αύξησης του αριθμού των φυσαλίδων σπηλαίωσης και της μεγαλύτερης επαφής με την επιφάνεια του στερεού-διαλύτη. Ωστόσο, υπάρχει ο κίνδυνος μείωσης αποτελεσματικότητας στην περίπτωση των πτητικών ενώσεων, όπως και η αποδόμησή τους.
3. Η στερεή μήτρα μπορεί να είναι είτε νωπή είτε ξηρή, όπου γίνεται διάχυση του υγρού, αναλόγως το πορώδες της.
4. Οι παράμετροι που μπορούν να βελτιστοποιηθούν στην εκχύλιση με υπερήχους σχετίζονται με τη λειτουργία του εξοπλισμού των υπερήχων, όπως η συχνότητα, το μήκος κύματος, το πλάτος του κύματος, η ισχύς και η ένταση αυτών.

1.5.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

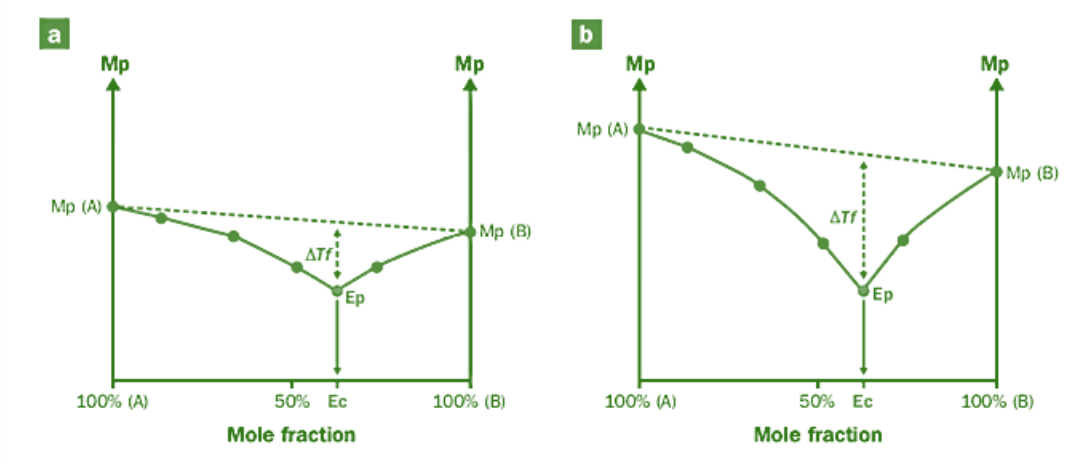
Για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς, χρησιμοποιούνται συνήθως κλασικές τεχνικές εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες. Πιο συγκεκριμένα, συναντώνται

τεχνικές, όπως διήθηση, εκχύλιση Soxhlet ή απόσταξη με χρήση διαλυτών όπως αιθανόλη, μεθανόλη ή νερό. Αυτές οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού-υγρού προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως αποτελεσματικότητα, αναπαραγωγιμότητα και εύκολη διαχείριση ευαίσθητων ενώσεων. Ωστόσο, σημειώνονται αρκετά μειονεκτήματα, όπως είναι η αναποτελεσματική διάχυση, ο υψηλός χρόνος εκχύλισης, η μεγάλη ποσότητα απαιτούμενου διαλύτη εκχύλισης (με πιθανή τοξικότητα), η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και το υψηλό κόστος επεξεργασίας. Γι' αυτό θεωρήθηκε επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων, τροποποιημένων τεχνολογιών για την αποτελεσματικότερη εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα ελιάς, εξαλείφοντας τα παραπάνω μειονεκτήματα των συμβατικών τρόπων εκχύλισης. Πλέον, έχουν εφαρμοστεί πιο πράσινες τεχνικές, όπως εκχύλιση σε υπερκρίσιμη κατάσταση, τεχνικές υψηλής ενέργειας, δηλαδή εκχύλιση με υπερήχους και εκχύλιση με μικροκύματα με συμβατικούς αλλά πιο προσφάτως στη βιβλιογραφία σε συνδυασμό με πράσινους διαλύτες, όπως είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES) και οι DES φυσικής προέλευσης (NADES). [26,35,27]

1.6 ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Deep Eutectic Solvents, DES)

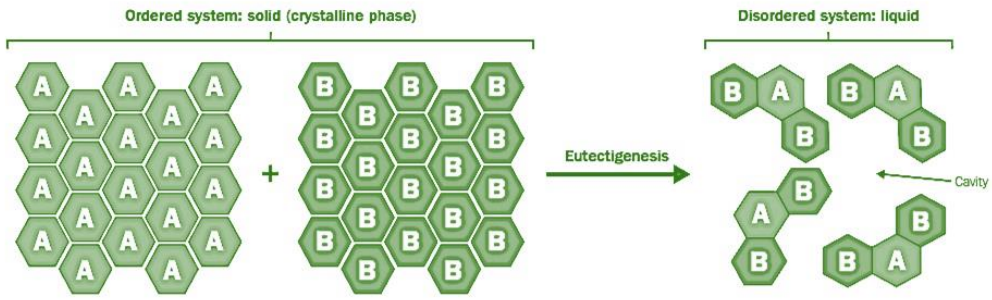
Οι επιστήμες της πράσινης χημείας και μηχανικής αναζητούν ολοένα καινούριους διαλύτες ικανούς να αντικαταστήσουν τους υπάρχοντες οργανικούς. Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για νέες οικολογικές και πράσινες αναλυτικές μεθόδους έχουν οδηγήσει στην προσπάθεια βελτίωσης των διαδικασιών εκχύλισης. Ένας τρόπος μετατροπής της παραπάνω διαδικασίας σε πιο φιλική προς το περιβάλλον είναι η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών με νέους. Αυτή η ανάγκη οδήγησε στην ανακάλυψη των ιοντικών υγρών, ωστόσο η τοξικότητα και το υψηλό κόστος τους έχουν επιτάσσει την ανάγκη εύρεσης νέων ακόμη πιο πράσινων διαλυτών. Το 2002 ανακαλύφθηκαν διαλύτες ικανοί να αντικαταστήσουν τα ιοντικά υγρά, λόγω των παρόμοιων ιδιοτήτων τους και της πράσινης φύσης τους, αυτοί είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvent, DES).[13]

Το όνομα των νέων διαλυτών προκύπτει από την ελληνικής ρίζας λέξη «εύτηκτος», τονίζοντας τη σημασία ότι λιώνει εύκολα, ενώ ο όρος «βαθέως» έχει προστεθεί για να τονίσει τη διαφορά του σημείου τήξης των DES από τα συστατικά του (ΔΤ=100-200°C) σε σχέση με τα απλά ευτηκτικά μίγματα, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.[59]



Εικόνα 2: Διαφοροποίηση μεταξύ (a) ευτηκτικού διαλύτη και (b) βαθέως ευτηκτικού διαλύτη σε διάγραμμα δύο φάσεων. Mp: σημείο τήξης, ΔTf: πτώση σημείου τήξης, Ec: ευτηκτική σύσταση, Ep: ευτηκτικό σημείο.[59]

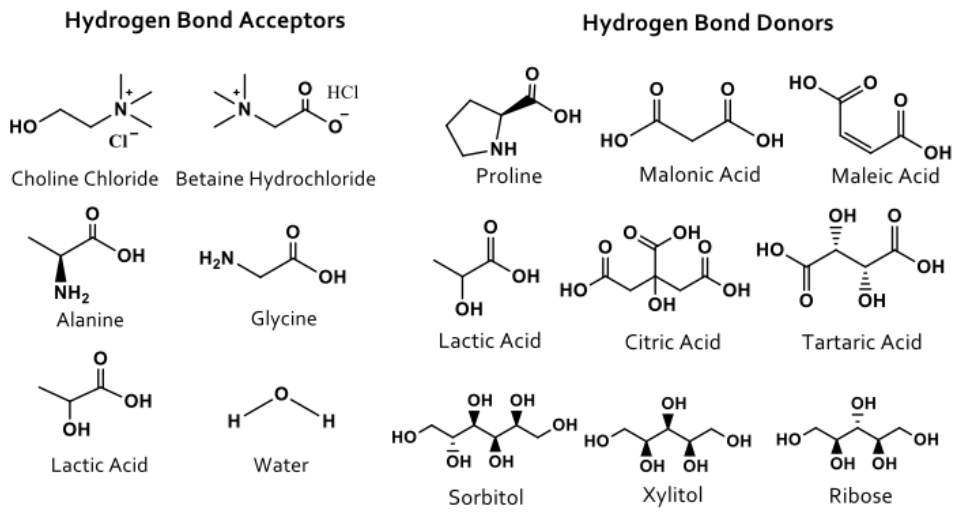
Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι ευτηκτικά συστήματα από οξέα ή βάσεις κατά Lewis ή Bronsted, τα οποία περιέχουν μία ποικιλία από ανιόντα ή και κατιόντα. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από ένα μίγμα, τουλάχιστον δύο συστατικών, δηλαδή, ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HydrogenBondDonors, HBD) και ενός δέκτη δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptors, HBA), σε στερεή ή υγρή κατάσταση, σε θερμοκρασία δωματίου και σε συγκεκριμένη γραμμομοριακή αναλογία, ώστε να δημιουργείται μία νέα ευτηκτική φάση (ευτεκτογένεση). Η νέα μορφή χαρακτηρίζεται από το σημαντικά χαμηλό σημείο τήξης που δεν υπερβαίνει τα σημεία τήξης των επιμέρους συστατικών.[59,57] Αναλυτικότερα, τα συστατικά των DES συνδυάζονται με κάθε δυνατό τρόπο, έτσι το μοριακό πλέγμα αναδιατάσσεται, δημιουργώντας κενές κοιλότητες, δηλαδή αυξάνοντας τον κενό όγκο, ώστε τα μόρια να έχουν χώρο να κινηθούν. Για παράδειγμά, το στερεό Α, της παρακάτω εικόνας, φαίνεται ότι έχει πολύ συμπαγή δομή χωρίς ελεύθερο χώρο για κίνηση των μορίων. Εάν αυτό αλληλεπιδράσει με το στερεό Β με δεσμούς υδρογόνου, θα διαταραχθεί το κρυσταλλικό πλέγμα και θα δημιουργηθεί ένα λιγότερο διατεταγμένο και ευτηκτικό σύστημα με περισσότερο κενό χώρο. Η ύπαρξη κενού όγκου στο σύστημα, καθιστά τα μόρια διάχυτα, άρα και το σύστημα σε υγρή φάση, ενώ ο περιορισμένος κενός όγκος οδηγεί στην αύξηση του ιξώδους τους διαλύτη.[59]



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της ευτεκτογένεσης σε μοριακό επίπεδο.[65]

Φυσικά βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NADES)

Όταν οι πρώτες ύλες παρασκευής είναι πρωτογενείς μεταβολίτες όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, τότε ονομάζονται φυσικά βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvent, NADES).[86] Οι DES και οι NADES έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι συνηθέστεροι δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου.



Εικόνα 4: Συνηθέστεροι δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου.

Οι NADES, με βάση τα συστατικά τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 5 βασικές ομάδες:[17]

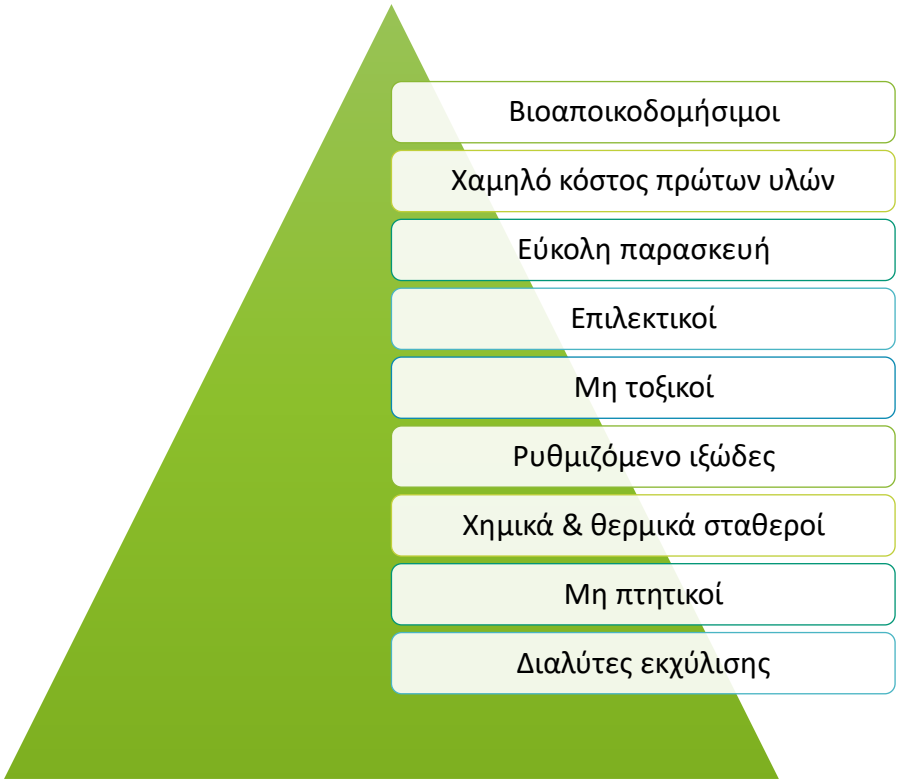
i. NADES που αποτελούνται από ένα οξύ και μια βάση
ii. NADES που αποτελούνται από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες (ουδέτερα DES)
iii. NADES που αποτελούνται από σάκχαρα/πολυλκοόλες και οργανικά οξέα (ουδέτερα DES με οξέα)

iv. NADES που αποτελούνται από σάκχαρα/πολυλκοόλες και οργανικές βάσεις (ουδέτερα DES με βάσεις)

v. NADES που αποτελούνται από αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα.

1.6.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Οι DES υπερισχύουν των οργανικών διαλυτών και των ιοντικών υγρών λόγω των ιδιοτήτων τους. Το πιο σημαντικό τους χαρακτηριστικό είναι η βιοαποικοδομησιμότητά τους, το χαμηλό κόστος των πρώτων υλών και η εύκολη παρασκευή τους, η επιλεκτικότητά τους καθώς και το γεγονός ότι είναι σχεδόν μη πτητικοί σε συνθήκες περιβάλλοντος. [52,96,6,63] Ωστόσο, η χαμηλή πτητικότητα δεν ευδοκιμεί το διαχωρισμό των διαλυτών από τα συστατικά.[20] Επίσης, είναι χημικά και θερμικά σταθεροί, μη αναφλέξιμοι και διαθέτουν καλές διαλυτικές ιδιότητες για οργανικά συστατικά.[63] Μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες είναι επίσης διαλυτά στους NADES. Η υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησής τους σχετίζεται με την υπερμοριακή δομή τους και το ευρύ εύρος πολικότητας.[96] Το ιξώδες κάποιων DES, μπορεί να είναι υψηλό με αποτέλεσμα να δυσχεραίνει η χρήση του σε ποικίλες εφαρμογές. Όμως, το μειονέκτημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί χάρη στην καλή αναμιξιμότητα που διαθέτουν πολλά DES με το νερό. Πιο συγκεκριμένα, μερική προσθήκη νερού μπορεί να μειώσει το ιξώδες χωρίς να αλλοιώσει τις ιδιότητες του διαλύτη.[97] Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι NADES είναι πιθανό να λειτουργούν ως μια εναλλακτική υγρή φάση στο νερό στη φύση για την προστασία των οργανισμών από την ξηρασία και το κρύο ώστε να επιτρέπεται η βιοσύνθεση και η αποθήκευση των ελάχιστα υδατοδιαλυτών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των μορίων υψηλού μοριακού βάρους.[97] Τέλος, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες δεν αντιδρούν με τον αέρα και την υγρασία, ιδιότητα που τους καθιστά ιδανικούς για διαλύτες εκχύλισης.[20]



Σχήμα 7: Βασικά πλεονεκτήματα βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

1.6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται δύο κύριες μέθοδοι παρασκευής των NADES. Η πρώτη μέθοδος ονομάζεται *μέθοδος θέρμανσης κι ανάδευσης*. Πιο συγκεκριμένα, τα συστατικά του μίγματος τοποθετούνται σε κλειστή φιάλη και θερμαίνονται περίπου στους 50-60°C, υπό μαγνητική ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί διαυγές υγρό. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου 30-90 min.[62,97] Η δεύτερη μέθοδος είναι η *μέθοδος εξάτμισης*, όπου τα συστατικά διαλύονται σε νερό και μέσω περιστροφικού εξατμιστή εξατμίζονται περίπου στους 50°C. Το υγρό που συλλέγεται τοποθετείται σε ξηραντήρα με silicagel έως ότου φτάσει σε σταθερό βάρος. Αναφορικά, έχει σημειωθεί η μέθοδος ξήρανσης με υπερκατάψυξη, η οποία, ωστόσο, δεν χρησιμοποιείται συχνά.[62]

1.6.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Όσον αφορά τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί για την εξακρίβωση της κυτταροτοξικότητάς τους. Σε μία απ' αυτές, μελετήθηκαν διάφοροι τύποι βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, με κύριο συμπέρασμα την μη κυτταροτοξική τους συμπεριφορά έναντι υγιών κυτταρικών σειρών, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες με βάση τη χλωριούχου χολίνη ([Chol] Cl) και

το χλωριούχο τετραμεθυλαμμώνιο ([N1111] Cl) επέτρεψαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων, σε αντίθεση με αυτούς με βάση το χλωριούχο τετραβουτυλαμμώνιο ([N4444] Cl). Έτσι, η χαμηλη κυτταροτοξικότητά τους, τους καθιστά καλούς διαλύτες στη βιομηχανία τροφίμων και στα φαρμακευτικά προϊόντα.[1,63]

1.6.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι εφαρμογές των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών εξετάζονται και διευρύνονται ταχαίως από την ανακάλυψή τους μέχρι και σήμερα. Μερικές από αυτές είναι η διάλυση πολυμερών, μετάλλων και φαρμάκων, η χρήση τους ως μέσο βιομετατροπής, επίσης, λόγω της μη τοξικότητάς τους χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικά σκευάσματα και τρόφιμα, σε βιομηχανία καλλυντικών και αγροχημικών σε αντίθεση με τα ιοντικά υγρά. Επιπλέον, συναντώνται στη σταθεροποίηση φυσικών χρωστικών και στον καθαρισμό του αργού πετρελαίου.[52,95,97]

Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται για εκχυλίσεις φυσικών προϊόντων, λόγω της δυνατότητας εκχύλισης πολικών και μη πολικών συστατικών και της εύκολης βελτιστοποίησης παραμέτρων όπως το ιξώδες, την πολικότητα και τη θερμοκρασία, αυξάνοντας έτσι την απόδοση εκχύλισης σε σύγκριση με συμβατικούς διαλύτες όπως το νερό και η αιθανόλη. Τέλος, γνωστή είναι η χρήση τους ως διαλύτες και καταλύτες σε αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης. Ωστόσο, σε σχέση με τα ιοντικά υγρά, οι DES έχουν λιγότερες εφαρμογές στους τομείς οργανικών αντιδράσεων, στις οργανικές εκχυλίσεις, στην ηλεκτροχημεία και στις ενζυμικές αντιδράσεις.[2,6,25,84,97]

1.6.5 ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΝ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ποικιλία διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση θρεπτικών συστατικών από φυτικές ύλες, οι συνηθέστεροι εξ αυτών είναι η μεθανόλη, αιθανόλη, η ακετόνη, το νερό αλλά και συνδυασμός αυτών.[93] Το νερό παραμένει ο διαλύτης που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα, κυρίως λόγω της μη τοξικότητάς του, του ελάχιστου κόστους του και της φιλικότητάς του προς το περιβάλλον. Ωστόσο, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνο, λόγω των πλεονεκτημάτων που τους χαρακτηρίζουν και αναφέρθηκαν προηγουμένως.

2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ NADES

Διάφοροι μέθοδοι χαρακτηρισμού χρησιμοποιούνται για τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες φυσικής προέλευσης (NADES). Στη βιβλιογραφία επικρατούν η υπέρυθρη φασματοσκοπία (FT-IR) και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) (^{1}H και ^{13}C) για την εις βάθως μελέτη της δομής των NADES. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως βασικό εργαλείο χαρακτηρισμού ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός ^{1}H NMR.[22,44,96]

2.1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (Nuclear Magnetic Resonace, NMR)

Η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί αναλυτική μέθοδο μελέτης μοριακής δομής υλικών, μετρώντας την αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών ραδιοσυχνοτήτων με τους πυρήνες μορίων, όταν αυτά τοποθετούνται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Από αυτή τη φασματοσκοπική μέθοδο αντλούνται σημαντικές πληροφορίες για τις υπό μελέτη ενώσεις όπως για τη δομή, την καθαρότητα, τις πιθανές αλληλεπιδράσεις κ.ά. Το φάσμα NMR που προκύπτει αποτελείται από κορυφές, δηλαδή συντονιστικές συχνότητες πυρήνων. Το ύψος κάθε κορυφής συσχετίζεται με τον αριθμό των πυρήνων που συντονίζονται σε κάθε συχνότητα ο αριθμός των οποίων δίνεται από την ολοκλήρωση του σήματος. Η φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της δομής των εξεταζόμενων χημικών ενώσεων, ενώ τα φάσματα NMR δύο ή και τριών διαστάσεων χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για πολυπλοκότερες ενώσεις και την εύρεση των πιθανών αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται στα μελετόμενα συστήματα.

2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

2.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ-ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV-Vis spectrophotometry)

Η μέθοδος της φασματομετρίας ορατού-υπεριώδους αποτελεί μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ποσότητας μιας χημικής ουσίας, που απορροφά το φως σε πολλαπλού τύπου δειγμάτων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο νόμο Beer-Lambert, δηλαδή μετράται η ένταση του φωτός που διέρχεται από το δείγμα προς επεξεργασία σε σύγκριση με την ένταση που διέρχεται από ένα δείγμα αναφοράς. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα φάσμα απορρόφησης, όπου παρατηρείται η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής

ακτινοβολίας που διεγείρει τα ηλεκτρόνια από την αρχική κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση και δίνει πληροφορίες ποσοτικές και ποιοτικές για το δείγμα μας.

2.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (High Perfomance Liquid Spectrometry-Mass Spectroscopy, HPLC-MS)

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας επιτυγχάνει το διαχωρισμό ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα (αναλύτη) με εφαρμογή υψηλής πίεσης. Υπάρχει μια κινητή φάση(διαλύτες αναλόγως το δείγμα μας) και μία στατική φάση (πληρωτικό υλικό εντός της στήλης, η οποία στήλη είναι stainless steel για να αντέχει την υψηλή πίεση). Η υψηλή πίεση επιθυμείται για να εξαναγκάζει και τα πιο μικρά μόρια που είναι προσκολλημένα στο πληρωτικό υλικό να εκλουστούν. Αναλόγως τη φύση του πληρωτικού υλικού, το δείγμα είτε θα προσκολληθεί σε αυτό, είτε θα θέλει να απομακρυνθεί, άρα θα εκλούεται. Τα μεγαλύτερα μόρια πάντα εκλούονται πρώτα, αλλά σε διαφορετικούς χρόνους. Το φάσμα που προκύπτει αποτελείται από κορυφές, κάθε μια αντιστοιχεί σε μία ένωση και η ολοκλήρωση του εμβαδού της κάθε μιας δείχνει την ποσότητα της αντίστοιχης ένωσης σε αυθαίρετες μονάδες.

Η μεθοδος της φασματομετρίας μάζας αποτελεί πολύ καλό ανιχνευτή ενώσεων. Εντός αυτού τα άτομα/ μόρια ιονίζονται, ώστε να βοηθηθεί ο διαχωρισμός τους και η αναγνώρισή τους, αναλόγως το μοριακό βάρος και το φορτίο τους. Το δείγμα εισέρχεται στο ιονισμένο δωμάτιο, ιονίζεται και δημιουργούνται κατιόντα (εάν είναι στο positive mode). Κάθε ένωση σπάει σε θραύσματα και αναλόγως το μοριακό βάρος και το φορτίο γίνεται ο διαχωρισμός.

Συνδυάζοντας αυτές τις δύο μεθόδους προκύπτει ιδανικός συνδυασμός για διαχωρισμό και ανίχνευση ενώσεων.

2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Ο χαρακτηρισμός του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) πραγματοποιείται κυρίως μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, ενίοτε με μικρές τροποποιήσεις, η οποία αναλύεται στη συνέχεια εκτενέστερα, στην παράγραφο 4.6.2.[7,61,71,87]

2.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Ο χαρακτηρισμός του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου χλωριούχου αργιλίου, όπου η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή υπολογίζεται σε ισοδύναμα κατεχίνης, αλλά και τη μέθοδο των Lee et al. (2007), που

υπολογίζεται σε ισοδύναμα ναρινγκίνης. Η μέθοδος του χλωριούχου αργιλίου είναι αυτή που εφαρμόζεται στην παρούσα μελέτη και αναλύεται στην παράγραφο 4.6.3.[70,71,53]

2.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές μεθόδους, όπως με τη μέθοδο προσδιορισμού της δέσμευσης ρίζας DPPH που περιέγραψαν οι Yen και Chen (1995), με τη δοκιμασία ABTS από τους Thaipong et al. (2006), με τη δοκιμή αντιοξειδωτικής ισχύος μείωσης σιδήρου (FRAP) από τους Benzie and Strain (1996) και τη μέθοδο δοκιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας μείωσης του χαλκού (CUPRAC), από τους Apak et al. (2006). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η πρώτη μέθοδος που αναφέρθηκε, DPPH και αναλύεται στην παράγραφο 4.6.1.[51,20,19,85,2]

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΕ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Ο πειραματικός σχεδιασμός αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, που βοηθάει στη σημαντική μείωση του αριθμού των πειραμάτων, με στόχο την επίτευξη εύρεσης βέλτιστων συνθηκών για τη μελετούμενη διεργασία. Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η διεργασία εκχύλισης με πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιώντας διάφορα μοντέλα, όπως το Box-Behnken, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη.

3.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ (Response Surface Methodology, RSM)

Η μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) αναπτύχθηκε από τους George E. P. Box και K. B. Wilson το 1951, με τον όρο να προέρχεται από τη γραφική προοπτική που δημιουργήθηκε μετά την καταλληλότητα του μαθηματικού μοντέλου και η χρήση του υιοθετήθηκε ευρέως. Η βάση αυτής της μεθοδολογίας είναι η χρήση μίας ακολουθίας σχεδιασμένων πειραμάτων για την επίτευξη της βέλτιστης απόκρισης. Η μεθοδολογία αυτή αποτελείται από μια ομάδα στατιστικών και μαθηματικών τεχνικών βασισμένες στην προσαρμογή των εμπειρικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται σε σχέση με τον πειραματικό σχεδιασμό. Ειδικότερα, χρησιμοποιούνται γραμμικές ή τετραγωνικές πολυωνυμικές συναρτήσεις για την περιγραφή του συστήματος προς μελέτη και για την εξερεύνηση (μοντελοποίηση και μετατόπιση) πειραματικών συνθηκών μέχρι τη βελτιστοποίησή του ιδίου.

Μερικά από τα στάδια στην εφαρμογή της μεθόδου RSM ως τεχνικής βελτιστοποίησης είναι τα εξής:[59]

(1) η επιλογή ανεξάρτητων μεταβλητών σημαντικών επιδράσεων στο σύστημα μέσω μελετών διαλογής και οριοθέτησης της πειραματικής περιοχής, σύμφωνα με τον στόχο του μελέτη και εμπειρία του ερευνητή,

(2) την επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού και την εκτέλεση των πειραμάτων σύμφωνα με την επιλεγμένη πειραματική μήτρα,

(3) τη μαθηματική-στατιστική επεξεργασία των λαμβανόμενων πειραματικών δεδομένων μέσω της προσαρμογής μιας πολυωνυμικής συνάρτησης,

(4) την αξιολόγηση της καταλληλότητας του μοντέλου,

(5) την επαλήθευση της αναγκαιότητας και της δυνατότητας εκτέλεσης μετατόπισης προς την βέλτιστη περιοχή και

(6) την απόκτηση των βέλτιστων τιμών για κάθε μεταβλητή που μελετήθηκε.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ BOX-BEHNKEN

Ο σχεδιασμός Box-Behnken είναι ένα εργαλείο της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης, το οποίο χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση πειραματικών δοκιμών και δίνει ένα μοντέλο πρόβλεψης. Αυτός ο σχεδιασμός έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης σε φυτικές πρώτες ύλες.[18]

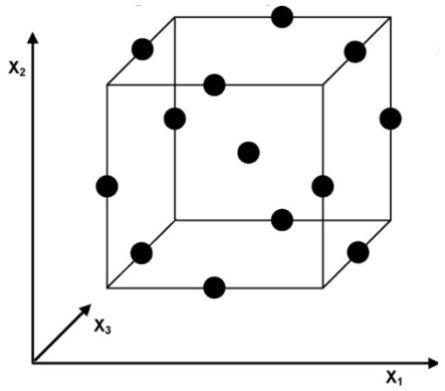
Ο σχεδιασμός Box-Behnken αποτελεί έναν ανεξάρτητο τετραγωνικό σχεδιασμό, που βασίζεται σε έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό τριών επιπέδων (χαμηλό, ενδιάμεσο, υψηλό). Η γεωμετρική αναπαράστασή του είναι ένα σύνολο σημείων τοποθετημένα στα μέσα των ακμών ενός κύβου συν το κεντρικό σημείο, το οποίο επαναλαμβάνεται.Το βασικό πλεονέκτημα αυτού του σχεδιασμού είναι η απουσία σημείων στα άκρα της κυβικής περιοχής, γεγονός που διευκολύνει την παρατήρηση των σημείων.[49] Ο αριθμός πειραμάτων (N) που απαιτείται για την ανάπτυξη του μοντέλου Box-Behnken ορίζεται ως $N = 2k(k-1) + C_0$, όπου το k είναι ο αριθμός παραγόντων και το C_0 είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων, ενώ όλα τα επίπεδα συντελεστών πρέπει να προσαρμόζονται σε μόνο τρία επίπεδα (−1, 0, +1) με συγκεκριμένα διαστήματα μεταξύ τους. Οι παράγοντες κωδικοποιούνται με βάση την εξίσωση [1]:

$$\text{κωδικοποιημένη τιμή} = \frac{\text{πραγματική τιμή} - 0.5 * (\text{υψηλή τιμή} + \text{χαμηλή τιμή})}{0.5 * (\text{υψηλή τιμή} - \text{χαμηλή τιμή})} \quad [1]$$

Έτσι προκύπτουν για κάθε παράγοντα τρεις τιμές, με τις δύο ακραίες να ισαπέχουν από την κεντρική.[59,28,77,82]

Ο Box-Behnken αποτελεί έναν σημαντικό σχεδιασμό για μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης καθώς επιτρέπει: (α) την εκτίμηση των παραμέτρων του τετραγωνικού μοντέλου, (β) την κατασκευή διαδοχικών σχεδίων (γ) την ανίχνευση έλλειψης προσαρμογής του μοντέλου και (δ) τη χρήση μπλοκ.[82] Ο σχεδιασμός Box-Behnken χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά προϊόντα, στη βιοεπεξεργασία, στη μηχανική τροφίμων και σε άλλες

βιομηχανίες εξαγωγής βιολογικών δραστικών ενώσεων που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση.[5]



Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken.

3.3 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

Οι παράμετροι που μελετώνται στις διεργασίες εκχύλισης είναι ποικίλες, οι πιο σημαντικές και συχνότερα απαντώμενες σε μελέτες εκχύλισης φυσικών πρώτων υλών, παρουσιάζονται παρακάτω:

3.3.1 ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Ο χρόνος εκχύλισης αποτελεί σημαντική παράμετρο προς μελέτη, ιδίως γιατι επηρεάζει συχνά την ποιότητα των εκχυλιζόμενων, από την μελετούμενη πρώτη ύλη, ενώσεων. Ο χαμηλός χρόνος εκχύλισης μπορεί να φέρει ως αποτέλεσμα μία ατελής εκχύλιση, ενώ ο υψηλός μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητές αντιδράσεις που θα οδηγήσουν σε υποβάθμιση των εκχυλισμάτων ή και καταστροφή των εκχυλιζόμεων ενώσεων.

Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι είναι πιθανό σε υψηλούς χρόνους εκχύλισης οι εκχυλιζόμενες ενώσεις να υποβαθμίζονται εάν είναι χημικά ή θερμικά ευαίσθητες, επομένως ο χρόνος κατά τον οποίο εκχυλίζονται επηρεάζει την ποιότητά τους. Επίσης, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η πρώτη ύλη βρίσκεται σε επαφή με το διαλύτη, άρα η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης επηρεάζεται έντονα από το χρόνο αλληλεπίδρασής τους, αφού επιδιώκεται η ανάκτηση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας βιοδραστικών συστατικών. Πρέπει να τονιστεί, επιπλέον, το γεγονός ότι ο υψηλός χρόνος εκχύλισης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους της διεργασίας, οπότε επιθυμείται βελτιστοποίησή του.[42]

3.3.2 ΙΣΧΥΣ

Η ισχύς, ομοίως με το χρόνο εκχύλισης, είναι δυνατό να οδηγήσει σε υποβάθμιση των επιθυμητών ενώσεων, έτσι η μελέτη της είναι κρίσιμης σημασίας. Επίσης, οι χαμηλές τιμές

ισχύος πιθανόν να οδηγούν στην ανάγκη αύξησης του χρόνου εκχύλισης, για την ενίσχυση της κινητικότητας των μορίων και τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι όσο περισσότερο εφαρμόζεται η υπερηχητική ισχύς, τόσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της σπηλαίωσης, άρα και η διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα, διευκολύνοντας τη μεταφορά μάζας και οδηγώντας σε διάρρηξη των κυττάρων και απελευθέρωση των ενώσεων-στόχων. Έτσι, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των επιθυμητών ενώσεων. Ωστόσο, είναι επιθυμητό η ισχύς να διατηρείται σε επίπεδα αποδεκτά από άποψη κόστους, αλλά και ενέργειας.[54]

3.3.3 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ

Η αναλογία μάζας διαλύτη προς πρώτη ύλη έχει ενδιαφέρον, διότι οδηγεί στον έλεγχο της εκχυλιστικής ικανότητας του διαλύτη. Είναι σημαντικό να διερευνηθεί η μέγιστη ικανότητα εκχύλισης του διαλύτη, ως προς τη ποσότητα της πρώτης ύλης, δηλαδή πόση ποσότητα διαλύτη αρκεί για μία συγκεκριμένη ποσότητα πρώτης ύλης, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή εκχύλιση. Επιθυμητή είναι στις διεργασίες εκχύλισης η χρήση της ελάχιστης αναλογίας μάζας διαλύτη προς πρώτη ύλη, για την ανάκτηση της μέγιστης ποσότητας εκχυλιζόμενων ενώσεων. Ως γενικότερη τάση, παρατηρείται πως οι μικρές αναλογίες βελτιώνουν το ρυθμό εκχύλισης και είναι πιο διαχειρίσιμες στην μετέπειτα επεξεργασία τους, καθώς επίσης είναι λιγότερο κοστοβόρες.[42]

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φύλλα ελιάς με χρήση πράσινων διαλυτών όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) και με χρήση υπερήχων που είναι μία τεχνική υψηλής ενέργειας, με στόχο την παραλαβή υψηλής αξίας και βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων.

Τα φύλλα ελιάς επιλέχθηκαν καθώς είναι ένα από τα σημαντικότερα παραπροϊόντα της γεωργικής παραγωγής στην Ελλάδα και είναι δυνατόν να ληφθούν σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών ενώσεων από αυτά. Τα εκχυλίσματα θεωρούνται υψηλής και προστιθέμενης αξίας καθώς είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις που παραλαμβάνονται από τα φύλλα ελιάς καθώς και από τη συνεργιστική δράση του στοχευμένα επιλεγμένου πράσινου διαλύτη. Οι NADES σχεδιάστηκαν στοχευμένα, ώστε να προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες που θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον και ασφαλείς (Generally Recognised as Safe, GRAS), όπως είναι η L-προλίνη, η β-αλανίνη, η βεταΐνη, η D-γλυκόζη, η γλυκερόλη, το D,L-γαλακτικό οξύ, το λεβουλινικό οξύ και το οξαλικό οξύ.

Έπειτα από μελέτη της χρήσης των σχεδιασμένων NADES ως διαλύτες εκχύλισης, βρέθηκε ως καλύτερος διαλύτης ως προς τις τιμές υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης, ελαιοευρωπεΐνης, του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, τη διαχείριση και το κόστος πρώτων υλών ο NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Η διεργασία εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε με χρήση πειραματικού σχεδιασμού και πιο συγκεκριμένα με Box-Behnken σχεδιασμό με παραμέτρους μελέτης, την αναλογία διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης, δηλαδή τα φύλλα ελιάς (olive leaves, OL), την ισχύ και το χρόνο εκχύλισης και μεταβλητές απόκρισης το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός τριών ενώσεων αναφοράς μέσω LC-MS ανάλυσης, της υδροξυτυροσόλης, της τυροσόλης και της ελαιοευρωπεΐνης. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό μέσω της μεθόδου υπολογισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH. Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε μελέτη εξάρτησης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε σχέση με το χρόνο. Τέλος, μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση

του βέλτιστου εκχυλίσματος, που προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό, του διαλύτη εκχύλισης που επιλέχθηκε ως βέλτιστος, καθώς και των πρότυπων ενώσεων υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και ελαιοευρωπεΐνη σε κύτταρα υγιών εμβυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3.

4.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1 και 2) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών της παρασκευής NaDES, της εκχύλισης και του χαρακτηρισμού των φύλλων ελιάς.

Πίνακας 1: Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα.

ΟΡΑΝΟ/ΣΥΣΚΕΥΗ	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ	ΜΟΝΤΕΛΟ
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Probe υπερήχων	Sonics & Materials	-
Φασματοφωτόμετρο Uv-vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Αναδευτήρας Vortex	Lbx instruments	V05 series
Φασματοφωτόμετρο FT-IR	Jasco	4200
Φασματοφωτόμετρο δειγματοφορέα πηγαδιών (microplate reader)	Molecular Devices	SpectraMax 250
Επωαστήρας κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO_2 σε αέρα και θερμοκρασία 37 ℃	Thermo Scientific	-
Οπτικό μικροσκόπιο	Unitron	-
Υδατόλουτρο 37 ℃	-	-
Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής	Bioair	-

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα.

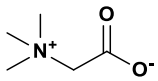
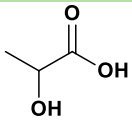
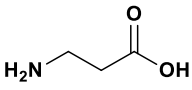
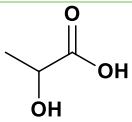
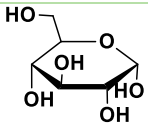
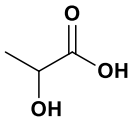
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ
Απιονισμένο νερό	H_2O	-
D-Γλυκόζη	$C_6H_{12}O_6$	Sigma Aldrich
Γαλακτικό οξύ (υδατικό διάλυμα 80- 85 %)	$C_3H_6O_3$	Alfa Aesar
DPPH	$C_{18}H_{13}N_5O_6$	Aldrich
Ελαιοευρωπεΐνη	$C_{25}H_{32}O_{13}$	Sigma Aldrich
Τυροσόλη	$C_8H_{10}O_2$	Fluoro Chem
Υδροξυτυροσόλη	$C_8H_{10}O_3$	Sigma Aldrich
Αιθανόλη	EtOH	Sigma Aldrich
Ανθρακικό νάτριο	Na_2CO_3	Penta
Αντιδραστήριο folin-ciocalteu	-	Merck Millipore
Νιτρώδες νάτριο	$NaNO_2$	Sigma Aldrich
Χλωριούχος αργίλιος	$AlCl_3$	Sigma Aldrich
Κατεχίνη	$C_{15}H_{14}O_6$	Sigma – Aldrich
Γαλλικό οξύ	$C_7H_6O_5$	Merck Millipore
Βεταΐνη	$C_5H_{11}NO_2$	Alfa Aesar
L-Προλίνη	$C_5H_9NO_2$	Fluka – Garantie
β-Αλανίνη	$C_3H_7NO_2$	MERCK
Λεβουλινικό Οξύ	$C_5H_8O_3$	Alfa Aesar
Γλυκερόλη	$C_3H_8O_3$	Kalo Chem
Οξαλικό οξύ	$C_2H_2O_4$	Sigma – Aldrich
3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ-)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)	-	Sigma-Aldrich
DMSO, ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες	-	Sigma-Aldrich

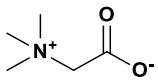
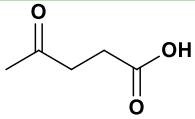
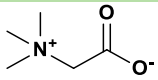
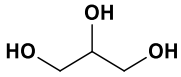
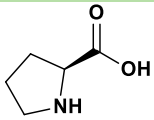
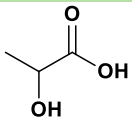
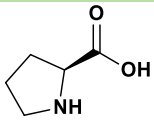
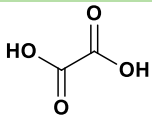
Θρεπτικό μέσο καλλιεργειών, Minimum Essential Medium Eagle, MEM-Earl, εμπλουτισμένο με: 10% ορός εμβρύου βοός 1% αντιβιοτικό αντιμυκητιασικό (antibiotic antimycotic) 0,5% στρεπτομυκίνη πενικιλίνη (penicillin streptomycin) 0,07% γενταμικίνη (genatmycin)	-	-

4.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται τα αρχικά συστατικά, τα οποία έχουν επιλεχθεί σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, και πραγματοποιείται θέρμανση υπό ανάδευση σε εύρος θερμοκρασιών 50-80 °C μέχρις ότου σχηματιστεί ένα διαυγές και ομοιογενές υγρό, για περίπου 1 με 4 ώρες. Για τους σχηματιζόμενους φυσικά βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NADES) πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός δομής με ^{1}H-NMR.

Πίνακας 3: Φυσικά βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που παρασκευάστηκαν.

ΟΝΟΜΑ NADES	**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΟΓΙΑ**			**ΔΕΚΤΗΣ ΔΕΣΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ** (HBA)	**ΔΟΤΗΣ ΔΕΣΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ** (HBD)	**ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ** (°C)	**ΧΡΟΝΟΣ** (h)
	HBA	HBD	NEPO*				
Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 Betaine	 D,L-Lactic Acid	50	3
β-Αλανίνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 beta Alanine	 D,L-Lactic Acid	50	3
D-γλυκόζη:D,L-Γαλακτικό οξύ	1	5	6,5	 D-(+)-Glucose	 D,L-Lactic Acid	60	1

Βεταΐνη:Λεβουλινικό οξύ	1	2	-	 Betaine	 Levulinic Acid	50	3
Βεταΐνη:Γλυκερόλη	1	3	-	 Betaine	 Glycerol	65	5
L-προλίνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 L-Proline	 D,L-Lactic Acid	45	2
L-προλίνη:Οξαλικό οξύ	1	1	-	 L-Proline	 Oxalic acid	50	4

*Η γραμμομοριακή αναλογία του νερού αντιστοιχεί στο νερό που περιέχεται στο αντιδραστήριο του D,L-γαλακτικού οξέος, καθώς αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των NADES είναι διαθέσιμο ως υδατικό διάλυμα (80%).

4.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ NADES ΚΑΙ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

4.4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΥΛΗΣ

Τα φύλλα ελιάς συλλέχθηκαν, πλύθηκαν με άφθονο νερό για να φύγουν οι ακαθαρσίες και η σκόνη και αφέθηκαν να ξηρανθούν φυσικά σε σκιερό και σκοτεινό μέρος, στον ατμοσφαιρικό αέρα για περίπου μία εβδομάδα. Στη συνέχεια, τα φύλλα ελιάς τεμαχίστηκαν με πολυκόφτη και έπειτα τρίφτηκαν σε γουδί και συλλέχθηκαν ως πούδρα φύλλων ελιάς κοκκομετρίας 212 μm. Τελικά, αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια σε σκιερό μέρος στους 4 °C έως ότου χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

4.4.2 ΔΙΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Σε γυάλινο σκεύος προστίθενται 3 g βαθέως ευτηκτικού διαλύτη D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικού οξέος και η κατάλληλη ποσότητα της πούδρας φύλλων ελιάς. Στη συνέχεια, το σκεύος μεταφέρεται σε παγόλουτρο, ώστε να παρέχεται συνεχής ψύξη στο μίγμα καθ' όλη τη διάρκεια των υπερήχων και τοποθετείται στο probe των υπερήχων. Να σημειωθεί ότι το probe υπερήχων πρέπει να είναι βυθισμένο στο δείγμα, αλλά να μην ακουμπά τον πυθμένα του σκεύους, ώστε να αποφευχθεί η θραύση του. Μετά το τέλος της εκχύλισης, το δείγμα παραλαμβάνεται και μεταφέρεται σε κατάλληλα φιαλίδια φυγοκέντρησης και

φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 7000 στροφές. Το τελικό εκχύλισμα παραλαμβάνεται έπειτα από διήθηση υπό κενό και φυλάσσεται σε γυάλινα φιαλίδια σε σκοτεινό μέρος υπό ψύξη μέχρι τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του.

Εικόνα 5: Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους εργαστηρίου.

4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Μετά τον προσδιορισμό του κατάλληλου πράσινου διαλύτη από τους επτά διαθέσιμους (§5.1.2), πραγματοποιήθηκαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα εκχύλισης (6 πειράματα) για τη διερεύνηση των κατάλληλων ορίων μελέτης του συστήματος για τη διεξαγωγή του πειραματικού σχεδιασμού. Έπειτα από την πραγματοποιήση αυτής της πρώτης σειράς εκχυλίσεων, που αποτελούνταν από έξι πειράματα, τα προκύπτοντα εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν με βάση (α) τη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ρίζας DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, (β) τον προσδιορισμό ολικού περιεχομένου φαινολικών εώσεων με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και (γ)

τον προσδιορισμό ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.

Από τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων αυτών των εκχυλισμάτων, καθορίστηκαν τα εύρη τιμών των πειραματικών παραμέτρων που εφαρμόστηκαν στη δεύτερη σειρά εκχυλίσεων.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων αφορά στα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Τα εκχυλίσματα της δεύτερης σειράς, αναλύθηκαν στατιστικά, με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης, μέσω του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken.
Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εξετάστηκαν είναι:

- ο χρόνος εκχύλισης στο probe των υπερήχων (x_1)
- η αναλογία NADES/μάζα φύλλων ελιάς(OL) w/w (x_2)
- η ισχύς του probe των υπερήχων (x_3)

Για καθεμία από τις παραπάνω μεταβλητές ορίζονται τρεις τιμές (3^3 πειραματικός σχεδιασμός), οι οποίες χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα -, 0 και +, σε αύξουσα σειρά.

- Για τη μεταβλητή **x1**:

  - →15 (min)

  0 →30 (min)

  + →45 (min)

- Για τη μεταβλητή **x2**:

  - →3:300 (10 g/g)

  0 →3:150 (20 g/g)

  + →3:100 (30 g/g)

- Για τη μεταβλητή **x3**:

  - → 20% (80 W)

  0 →30% (120 W)

  + → 40% (160 W)

Οι τρεις αυτές παράμετροι επιλέχθηκαν καθώς κρίθηκαν από τις πιο σημαντικές προς μελέτη για τη διεργασία εκχύλισης. Οι μεταβλητές απόκρισης είναι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Στον παρακάτω Πίνακα 4 παρουσιάζονται αναλυτικά τα πειράματα που διεξήχθησαν στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού.

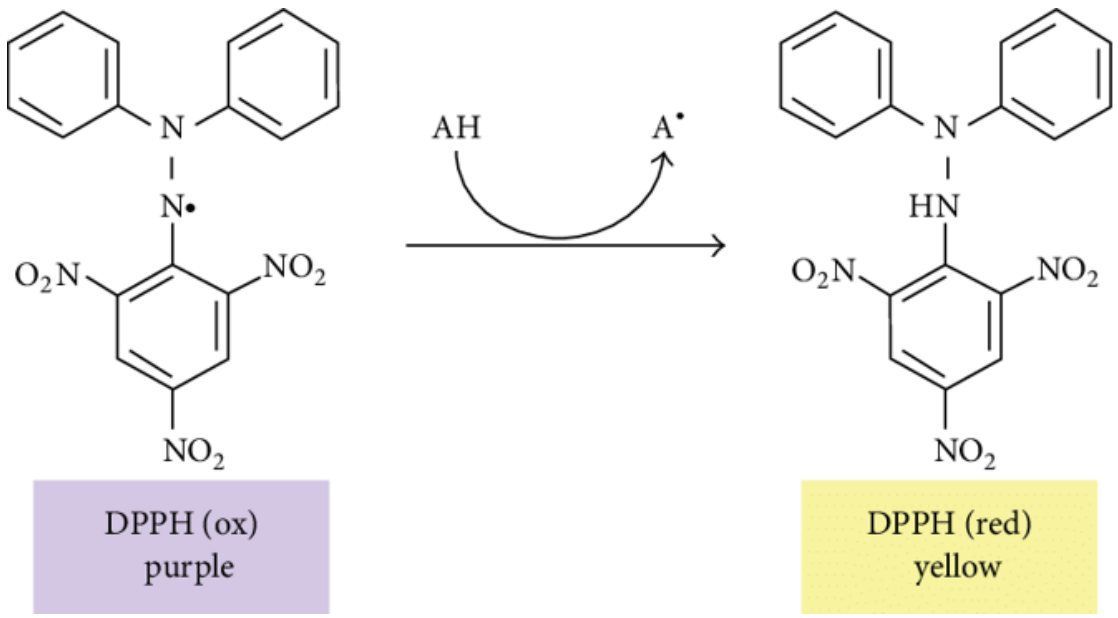
Πίνακας 4: Συνθήκες εκχύλισης πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

		ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ		
ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	**ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ**	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ NADES ΠΡΟΣ ΜΑΖΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ (g DES/g OL)**	**ΙΣΧΥΣ (W)**	**ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (min)**
ZL_17	+ 0 +	30	120	45
ZL_15	0 + -	20	160	15
ZL_19	0 + +	20	160	45
ZL_16	0 - -	20	80	15
ZL_20	- 0 +	10	120	45
ZL_21	+ - 0	30	80	30
ZL_22	0 0 0	20	120	30
ZL_23	0 - +	20	80	45
ZL_24	- + 0	10	160	30
ZL_26	- - 0	10	80	30
ZL_27	0 0 0	20	120	30
ZL_28	0 0 0	20	120	30
ZL_29	+ + 0	30	160	30
ZL_30	+ 0 -	30	120	15
ZL_31	- 0 -	10	120	15

4.6 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

4.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πικρυλυδραζίλιο). Πρόκειται για μία σταθερή και εμπορικά διαθέσιμη ρίζα αζώτου που απορροφά στο ορατό και υπεριώδες μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με μέγιστο μήκος κύματος τα 515 nm. Το αρχικό χρώμα είναι μωβ, ενώ όταν αντιδρά με αντιοξειδωτικά, δηλαδή άλλες ρίζες, ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου, η υδραζίνη που προκύπτει είναι αποχρωματισμένη. Οι διαλύτες πρέπει να είναι οργανικοί, καθώς είναι υδρόφοβο. Το DPPH δεν είναι επιλεκτικό ως προς συγκεκριμένη αντιοξειδωτική δράση, αλλά ως προς τη συνολική του δείγματος προς επεξεργασία. Οι αντιδράσεις αυτές είναι αρκετά ευαίσθητες στις συνθήκες που πραγματοποιούνται και ειδικά φωτοευαίσθητες.[21,76]



Εικόνα 6: Αριστερά φαίνεται η ρίζα του DPPH που έχει χρώμα βαθύ μωβ, ενώ δεξία το άχρωμο προϊόν μετά από αντίδραση.[88]

Η κινητική συμπεριφορά των αντιοξειδωτικών διακρίνεται από το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η απορρόφηση σε μία σταθερή τιμή, και κατηγοριοποιείται σε γρήγορη < 5 min, ενδιάμεση 5-30 min και αργή >30 min. Κάποια αντιοξειδωτικά απαιτούν πολικούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη), ενώ γίνεται χρήση αιθυλ-ακετόνης και χλωροφόρμιου για την εκχύλιση λιποφιλικών αντιοξειδωτικών. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ότι σε αυτό το στάδιο η προσθήκη νερού βελτιστοποιεί την απόδοση της εκχύλισης. Μικρή σημασία φαίνεται να έχει το pH του διαλύματος σε περιπτώσεις χρήσης αιθανόλης ή μεθανόλης.[76]

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, είτε μετρώντας το ποσοστό του DPPH που παραμένει μετά τις αντιδράσεις, είτε μετρώντας το χρόνο που απαιτείται για να καταλήξει σε μία σταθερή τιμή συγκέντρωσης αντιοξειδωτικού που προκαλεί τη μείωση του DPPH κατά 50%.[21]

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH, ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg της ρίζας DPPH, τα οποία διαλύονται, εντός ογκομετρικής φιάλης σε αιθανόλη μέχρις τελικού όγκου 50 mL. Το διάλυμα αναδεύεται για περίπου μία ώρα, μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι το πολύ 48 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας εφόσον φυλαχθεί ερμητικά κλειστό και απουσία φωτός σε θερμοκρασία μικρότερη των 4 °C. Στη συνέχεια, για την παρασκευή των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων (stock), 50μl από κάθε εκχύλισμα προστίθενται σε 950μl αιθανόλης, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαλύματα εκχυλισμάτων

συγκέντρωσης (C αρχική συγκέντρωση) 5%. Στη συνέχεια, πληρώνεται ένα πλακίδιο 96 θέσεων, τοποθετώντας σε κάθε κυψελίδα 100μl διαλύματος εκχυλίσματος (σε κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα) και 100μl διαλύματος DPPH που παρασκευάστηκε. Τα stock διαλύματα των εκχυλισμάτων έχουν υποστεί αραίωση με αιθανόλη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε στο πλακίδιο να υπάρχουν διαλύματα συγκεντρώσεων C, 0,8C, 0,6C, 0,4C και 0,2C. Για παράδειγμα, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C, τοποθετούνται 100μl του αντίστοιχου stock και 100μl διαλύματος DPPH, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0,6C τοποθετούνται 60μl του stock, 40μl αιθανόλης και 100μl διαλύματος DPPH, κ.ο.κ.

Επιπλέον, τυφλά διαλύματα παρασκευάζονται από 100μl αιθανόλης και 100μl DPPH. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τόσο τα δείγματα που περιείχαν εκχύλισμα όσο και τα τυφλά διαλύματα, παρασκευάστηκαν εις τριπλούν, άρα στους υπολογισμούς θα υπεισέρχονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων που λήφθηκαν. Το πλακίδιο αφέθηκε σε σκοτεινό χώρο και ερμητικά κλειστό, για 30 min, 40 min και 70 min ώστε να επωαστούν τα διαλύματα και τελικά, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 510 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

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

$$\%\,Inhibition = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100 \qquad [2]$$

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

4.6.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC)

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Για τη μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content, TPC) χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu βάσει της μεθόδου Waterman και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ. Σε ένα δοχείο Eppendorf προστίθενται 780 μl απεσταγμένο νερό, 20 μl stock δείγμα περιεκτικότητας σε εκχύλισμα 30% και αντιδραστήριο

50 μl Folin-Ciacalteu. Τα παραπάνω αναδεύονται για ακριβώς ένα λεπτό σε Vortex. Έπειτα προστίθενται 150 μl κορεσμένου ανθρακικού νατρίου και τοποθετείται στο Vortex ξανά. Το σύστημα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 60 min. Ποιοτικά παρατηρείται η παρουσία φαινολικών συστατικών με την εμφάνιση μπλε απόχρωσης. Μετά την επώαση, μετράται η απορρόφηση του συστήματος σε μήκος κύματος 755 nm μέσω φασματοφωτόμετρου UV-Vis.[92]

Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος συναρτήσει της απορρόφησής του σε μήκος κύματος 755 nm.

$$C_{gallic\ acid} = 0{,}5802 \times \mathrm{A}_{\mathrm{gallic\ acid}} + 0{,}0098 \ \ \mu\varepsilon\ R^2 = 0{,}982 \quad [3]$$

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος:

$$TPC\left(\frac{mg\ gal}{mg}\right) = \frac{C_{gallic\ acid\ eq}\left(\frac{mg_{gal}}{L}\right) * V_{ext}(L) * D}{m_{OL}\ (g)} \qquad [4]$$

όπου:

$\mathrm{C}_{\mathrm{gallic\ acid\ eq}}$, η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που υπολογίζεται από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προηγήθηκε

$\mathrm{V}_{\mathrm{ext}}$: ο όγκος του εκχυλίσματος

D : Παράγοντας αραίωσης (Dilution factor)

m_{OL}: η μάζα των φύλλων ελιάς που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση

Τα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα παρασκευάζονται εις διπλούν για έλεγχο επαναληψιμότητας.

4.6.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC)

Μεθοδος χλωριούχου αργιλίου

Για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC) χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου με μερικές παραλλαγές και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε η κατεχίνη. Παρασκευάζεται δείγμα stock που περιέχει 50 μL εκχυλίσματος και 250 μL νερό. Σε ένα δοχείο eppendorf προστίθενται 50 μL stock διαλύματος, 30 μL $NaNO_2$ 5% και αφήνεται για επώαση 6 min. Έπειτα, προστίθενται 60 μL $AlCl_3$ και αφήνεται για επώαση 5 min. Επιπλέον, προστίθενται 300 μL NaOH και 560 μL

απεσταγμένο νερό. Το σύστημα αναδεύεται σε Vortex και αφήνεται για επώαση 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τελικά, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 510 nm μέσω φασματοφωτόμετρου UV-Vis.

Κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης συναρτήσει της απορρόφησής της σε μήκος κύματος 510 nm.

$$C_{catechin} = 0{,}8909 \times \mathrm{A_{catechin}} + 0{,}0105 \;\; \mu\varepsilon \; R^2 = 0{,}9999 \quad [5]$$

Μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης, οι λαμβανόμενες απορροφήσεις μετατρέπονται σε ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης και τελικά, τα αποτελέσματα ανάγονται σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανά g πρώτης ύλης μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$TFC\left(\frac{mg\ cat}{g\ OL}\right) = \frac{C_{catechin\ eq}\left(\frac{mg_{cat}}{L}\right) * V_{ext}(L) * D}{m_{OL}\ (g)} \quad [6]$$

όπου:

$\mathrm{C_{catechin\ eq}}$, η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που υπολογίζεται από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που προηγήθηκε

$\mathrm{V_{ext}}$: ο όγκος του εκχυλίσματος

D : Παράγοντας αραίωσης (Dilution factor)

$\mathrm{m_{OL}}$: η μάζα των φύλλων ελιάς που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση

Τα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα παρασκευάζονται εις διπλούν για έλεγχο επαναληψιμότητας.

4.6.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ HPLC

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αναπτύχθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με διαδοχική φασματομετρία μαζών (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ελαιοευρωπεΐνης, υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς της ποικιλίας Καλαμών, που παραλήφθηκαν έπειτα από εκχύλιση με διαλύτη το NADES D-γλυκόζη: D,L-γαλακτικό οξύ.

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, ΗΠΑ) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση, αποτελείται από (α) ένα απαερωτή κενού, (β) μια αντλία παροχής κινητής φάσης δύο καναλιών, (γ) έναν αυτόματο δειγματολήπτη και (δ) μια στήλη χρωματογραφίας. Αντίστοιχα, η διάταξη φασματομετρίας μάζας (MS) περιλαμβάνει υβριδικό φασματογράφο μάζας τριπλού τετράπολου-παγίδας ιόντων 3200 Q TRAP (3200 Q TRAP triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometer, Sciex, ΗΠΑ). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και των φασμάτων μάζας πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Analyst (Sciex, ΗΠΑ). Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated measures ANOVA) μέσω της χρήση του στατιστικού προγράμματος Statistica (Version 12, StatSoft, Inc., USA). Οι υπολογισμοί έγιναν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ενώ τιμές p-value≤0.05 υποδεικνύουν ότι μία τιμή διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από μια άλλη.

Πιο συγκεκριμένα, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των υπό εξέταση ενώσεων έλαβε χώρα με τη στήλη αντίστροφης φάσης Agilent Eclipse Plus C18 (50 mm μήκος × 2.1 mm εσωτερική διάμετρος, 3.5 μm μέγεθος σωματιδίων, Agilent Technologies, ΗΠΑ). Ως κινητή φάση επιλέχθηκε σύστημα νερού με 0.1% φορμικό οξύ (Διαλύτης Α) και ακετονιτριλίου (Διαλύτης Β). Η ροή της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0.2 mL/min, η θερμοκρασία της στήλης στους 25 °C και ο όγκος έγχυσης δείγματος, διαλύματος προτύπου ή ''τυφλού'' δείγματος, στα 5 μL. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε, παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης.

ΧΡΟΝΟΣ (min)	**(Α) ΝΕΡΟ+0.1% ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ**	**(Β) ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ**
0	70	30
1	60	40
5	0	100
7	0	100
7.5	70	30
14	70	30

Για την ανάλυση των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 50 μL εκχυλίσματος και αραιώθηκαν σε δεκαπλάσιο όγκο (τελική αραίωση στα 500 μL) μεθανόλης με 0.1% φορμικό οξύ. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την χρωματογραφική ανάλυση ήταν βαθμού καθαρότητας LC-MS (LC-MS grade). Τα διαλύματα των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς που παρασκευάστηκαν φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου διαμέτρου 13 mm και μεγέθους πόρων 0.45 μm, πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα LC.

Ο ιοντισμός των τριών εξεταζόμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) για την παραγωγή θετικά φορτισμένων ιόντων. Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής ιόντων και θραυσματοποίησής τους, καθώς και για τη λήψη φασμάτων μάζας πραγματοποιήθηκε άμεση έγχυση διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων, συγκέντρωσης 10 μg/mL. Επίσης, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων της πηγής ιοντισμού έλαβε χώρα με έγχυση των παραπάνω διαλυμάτων σε συνεχή ροή (Flow injection analysis, FIA). Οι βέλτιστες παράμετροι της πηγής ιοντισμού και της MS2 ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Κατά την ανάλυση, τόσο η ταυτοποίηση όσο και η ποσοτικοποίηση των τριών φαινολικών ενώσεων έλαβε χώρα μέσω της θραυσματοποίησης των μητρικών μοριακών τους ιόντων $[M+H-H_2O]^+$ ή $[M+Na]^+$ σε θυγατρικά ιόντα με την τεχνική «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM).

Πίνακας 6: Βέλτιστες τιμές παραμέτρων πηγής ιοντισμού.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΤΙΜΕΣ
Αέριο πλάκας επικάλυψης (Curtain gas, psi)	10
Δυναμικό Ιοντοψεκασμού (Ion spray needle voltage, V)	5000
Θερμοκρασία (Temperature, °C)	600
Αέριο εκνέφωσης (Nebulizer Gas 1, psi)	40
Θερμαντικό αέριο (Heater Gas 2, psi)	40
Θερμαντήρας διεπαφής (Interface heater)	ON
Αέριο διάσπασης μέσω συγκρούσεων (Collisionally Activated Dissociation Gas)	8
Δυναμικό Εισόδου (Entrance Potential, V)	10

Πίνακας 7: Βέλτιστες συνθήκες θραυσματοποίησης MS/MS για κάθε χαρακτηριστική μετάπτωση των μελετούμενων ενώσεων.

ΑΝΑΛΥΤΕΣ	ΜΗΤΡΙΚΟ ION (m/z)	ΘΡΑΥΣΜΑΤΑ MS2	ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ (Declustering Potential, V)	ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΕΛΙΟΥ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ (Collision Cell Entrance Potential, V)	ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ (Collision Energy, V)	ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΕΞΟΔΟΥ ΚΕΛΙΟΥ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗΣ (Collision Cell Exit Potential, V)
Υδροξυτυροσόλη	137.1 $[M+H-H2O]^+$	**91.1 (QN)$^{\alpha}$**	45	8.67	22	3
		119.1 (QL)$^{\beta}$	45	8.67	16	3
		65.1 (QL)$^{\beta}$	45	8.67	39	3

Τυροσόλη	121.1 [M+H-H2O]$^+$	**77.1 (QN)$^\alpha$**	41	8.11	29	2
		91.1 (QL)$^\beta$	41	8.11	20	2
		103.2 (QL)$^\beta$	41	8.11	19	2
Ελαιοευρωπεΐνη	563.3 [M+Na]$^+$	**401.3 (QN)$^\alpha$**	95	20	36	5
		369.1 (QL)$^\beta$	95	20	39	5
		383.3 (QL)$^\beta$	95	20	33	5

$^{\alpha:}$ QN (quantitative): ιόντα για ποσοτικοποίηση; $^\beta$ QL (qualitative): ιόντα για ταυτοποίηση

Στον Πίνακα 8 παραθέτονται οι λόγοι μάζας προς φορτίο (mass to charge, m/z) των πρόδρομων και των παραγόμενων ιόντων που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση (διαγνωστικά ιόντα) και τον ποσοτικό προσδιορισμό, καθώς και οι χρόνοι έκλουσης (retention time, RT) για κάθε ένωση.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά ιόντα και χρόνοι έκλουσης των εξεταζόμενων αναλυτών.

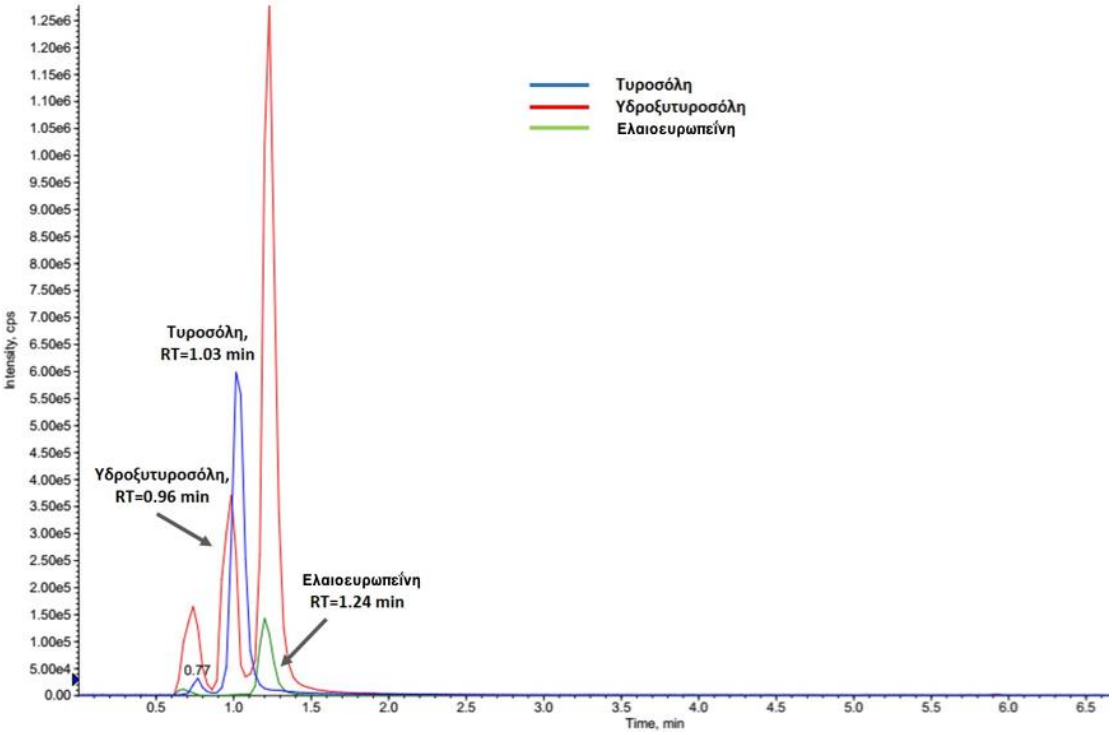
ΑΝΑΛΥΤΕΣ	**ΜΗΤΡΙΚΟ ΙΟΝ** (m/z)	**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΙΟΝΤΑ** (m/z)	**ΙΟΝΤΑ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ** (m/z)	**ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ** (min)
Υδροξυτυροσόλη	137.1 [M+H-H2O]$^+$	**91.1$^\alpha$**/119.1/65.1	91.1	0.96
Τυροσόλη	121.1 [M+H-H2O]$^+$	**77.1$^\alpha$**/91.1/103.2	77.1	1.03
Ελαιοευρωπεΐνη	563.3 [M+Na]$^+$	**401.3$^\alpha$**/369.1/383.3	369.1	1.24

$^{\alpha:}$ Με έντονη γραφή (bold) σημειώνονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα/ιόντα που εμφανίζουν την υψηλότερη ένταση στα αντίστοιχα φάσματα μάζας.

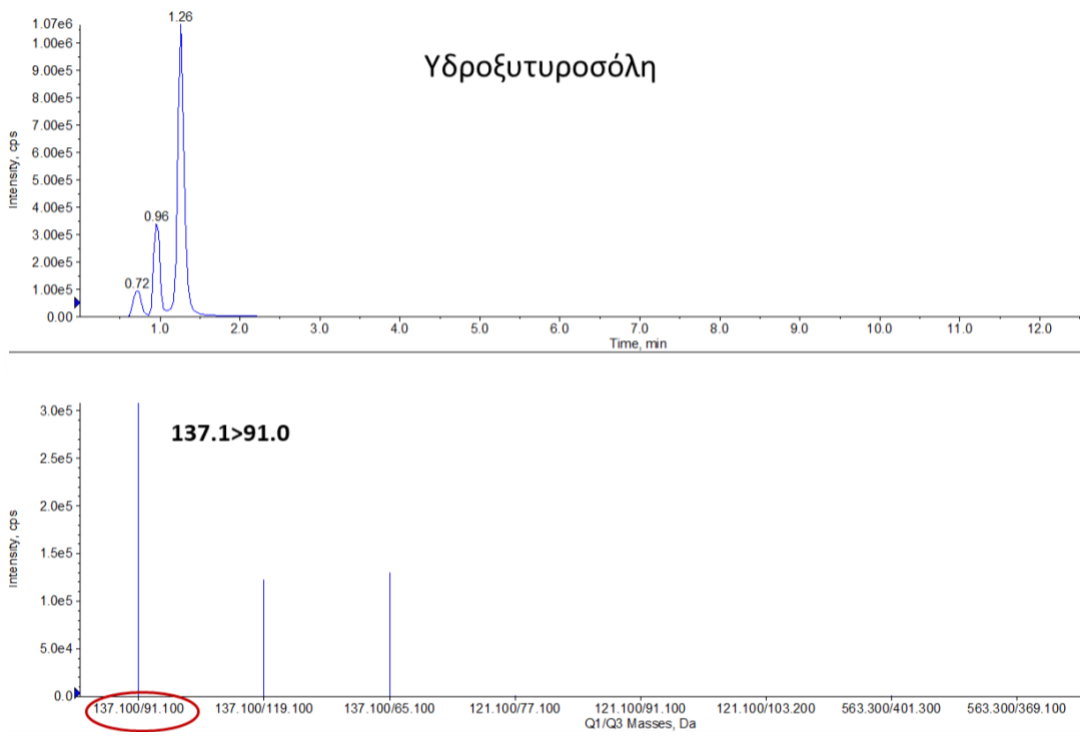
Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 8, για την ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη αναλυτών επιλέχθηκαν τα ιόντα με την υψηλότερη ένταση κορυφής στα αντίστοιχα φάσματα μάζας, με μοναδική εξαίρεση την ελαιοευρωπεΐνη. Στην περίπτωση αυτή, το θραύσμα με την υψηλότερη ένταση ήταν το θυγατρικό ιόν με m/z=401.3. Παρόλα αυτά, κατά την ανάλυση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις, μετατόπιση του χρόνου έκλουσης της ελαιοευρωπεΐνης σε μικρότερους χρόνους (περίπου 1.1 λεπτά αντί για 1.24 λεπτά) και εμφάνιση ευρείας κορυφής στα χρωματογραφήματα, που πιθανά να οφείλεται στην αλληλεπικάλυψη της κορυφής της ελαιοευρωπεΐνης και άλλων ισομερών μορφών της ίδιας ένωσης, που, λόγω ισομέρειας, μπορούν να εμφανίζουν παρόμοια μοτίβα θραυσματοποίησης άρα και παραγόμενα ιόντα με m/z=401.3 [3]. Γι' αυτό το λόγο και

προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία και η ακρίβεια κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοευρωπεΐνης στα NADES εκχυλίσματα, η ποσοτικοποίησή της βασίστηκε στη μετάπτωση 563.3>369.1, που εμφανίζει οξεία κορυφή στο χρόνο έκλουσης που αντιστοιχεί στην πρότυπη ένωση της ελαιοευρωπεΐνης (1.24 λεπτά).

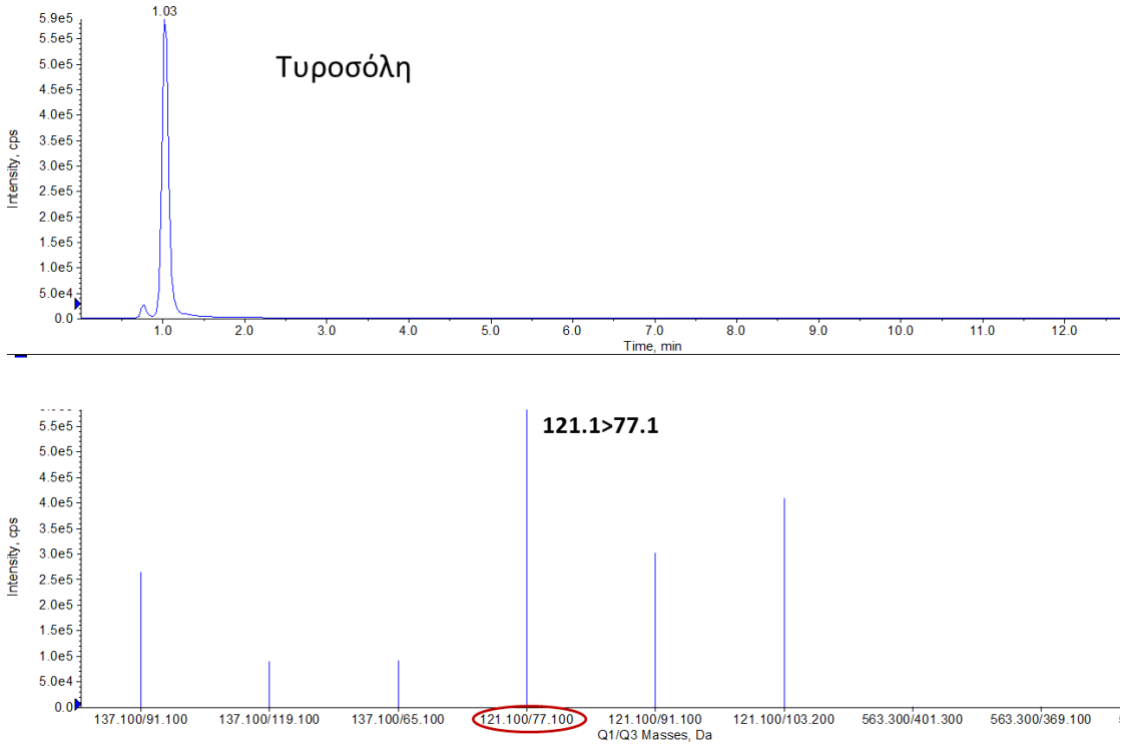
Τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα μάζας με τις χαρακτηριστικές μεταπτώσεις ιόντων των πρότυπων ενώσεων παρουσιάζονται στις Εικόνες 7,8,9 και 10 .



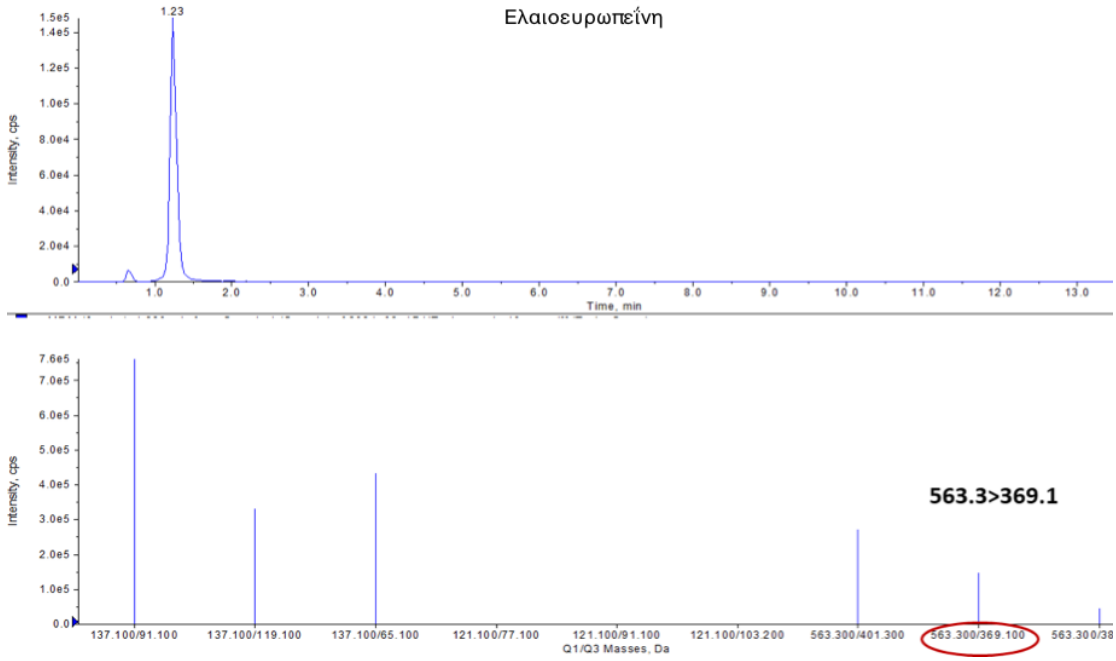
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα μίγματος πρότυπων διαλυμάτων υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης και ελαιοευρωπεΐνης συγκέντρωσης 10 μg/mL.



Εικόνα 8: Χρωματογραφικές κορυφές και φάσματα μάζας μίγματος πρότυπων διαλυμάτων υδροξυτυροσόλης 10 μg/mL.



Εικόνα 9: Χρωματογραφικές κορυφές και φάσματα μάζας μίγματος πρότυπων διαλυμάτων τυροσόλης 10 μg/mL.



Εικόνα 10: Χρωματογραφικές κορυφές και φάσματα μάζας μίγματος πρότυπων διαλυμάτων ελαιοευρωπεΐνης 10 μg/mL.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 10, το μοτίβο θραυσματοποιήσης της ελαιοευρωπεΐνης εμφανίζει κοινά ιόντα με αυτό της υδροξυτυροσόλη (137.1>91.1, 119.0 και 65.0), καθώς η ελαιοευρωπεΐνη αποτελεί εστέρα της υδροξυτυροσόλης.[4] Παρά το γεγονός ότι τα κοινά, και στις δύο ενώσεις, παραγόμενα ιόντα (91.1, 119.0, 65.0) παρουσιάζουν, στο φάσμα μάζας της ελαιοευρωπεΐνης, υψηλότερη ένταση σε σχέση με τα υπόλοιπα ιόντα (Εικόνα 10), για την ποσοτικοποίησή αυτής της ένωσης επιλέχθηκε η μετάπτωση 563.3>369.1, που αποτελεί χαρακτηριστική μετάπτωση της ελαιοευρωπεΐνης και όχι της υδροξυτυροσόλης.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε, για κάθε ένωση, ως προς (α) τη γραμμικότητα (linearity) των καμπυλών αναφοράς και τη γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (linear dynamin range) και ως προς (β) την πιστότητα (precision) μέσω επαναληψιμότητας (repeatability intra-day ή precision) και της αναπαραγωγιμότητας (reproducibility ή inter-day precision). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες επίσημων διεθνών φορέων πιστοποίησης, όπως η Διεθνής Διάσκεψη Εναρμόνισης (ICH) και ο Οργανισμός Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων, οι καμπύλες αναφοράς θεωρούνται γραμμικές όταν το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης R^2 (coefficient of determination) είναι μεγαλύτερο του 0.95. Οι καμπύλες αναφοράς, τα κριτήρια γραμμικότητας, καθώς και το γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων για τρεις πρότυπες φαινολικές ενώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.[31]

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης και ελαιοευρωπεΐνης στα δείγματα, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς $y=ax(\pm s_a) - b(\pm s_b)$, όπου y= εμβαδό χρωματογραφικής κορυφής (peak area, a.u. × 10^5), a= κλίση καμπύλης αναφοράς, s_a=τυπική απόκλιση της κλίσης καμπύλης αναφοράς, b= σταθερός όρος καμπύλης αναφοράς, s_b=τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της καμπύλης αναφοράς, x= συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα (μg/mL). Τα διαλύματα των διαφορετικών συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες αναφοράς (διαλύματα εργασίας), παρασκευάστηκαν από διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) συγκεντρώσεων 1000 και 100 μg/mL, ενώ οι μετρήσεις κάθε διαλύματος εργασίας πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές. Όπως προκύπτει και από τον Πίνακα 9, οι καμπύλες αναφοράς και των τριών ουσιών ήταν γραμμικές στην περιοχή συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν.

Πίνακας 9: Καμπύλες αναφοράς και κριτήρια γραμμικότητας των τριών πρότυπων ουσιών.

ΑΝΑΛΥΤΕΣ	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	R^2	ΓΡΑΜΜΙΚΟ ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (μg/mL)
Υδροξυτυροσόλη	y=2.101(±0.038)x-0.24(±0.15)	0.998	0.05-10 (n^{α}=8)
Τυροσόλη	y=4.77(±0.18)x-0.39(±0.20)	0.994	0.05-2.5 (n=6)
Ελαιοευρωπεΐνη	y=1.365(±0.053)x-0.155(±0.060)	0.994	0.05-2.5 (n=6)

$^{\alpha}$: ο αριθμός των διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Επιπλέον, η μέθοδος θεωρείται επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη όταν η % σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) των μετρήσεων (%RSD=[τυπική απόκλιση/μέσος όρος μετρήσεων]×100) είναι μικρότερη του 15% (ICH), (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2011).Ειδικότερα, για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ελέγχου (quality standards, QCs) των ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.05, 0.50 και 10 μg/mL για την υδροξυτυροσόλη, 0.05, 0.50 και 2.5 μg/mL για τυροσόλη και ελαιοευρωπεΐνη) και μετρήθηκαν τρεις φορές. Η εκτίμηση της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου έλαβε χώρα με τη χρήση διαλυμάτων ελέγχου σε ίδια επίπεδα συγκέντρωσης. Το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης μετρήθηκε εις τριπλούν σε τρεις διαφορετικές μέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, η μέθοδος που αναπτύχθηκε κρίθηκε ως επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη, αφού %RSD≤15%, σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 10: Προσδιορισμός επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου LC-MS/MS.

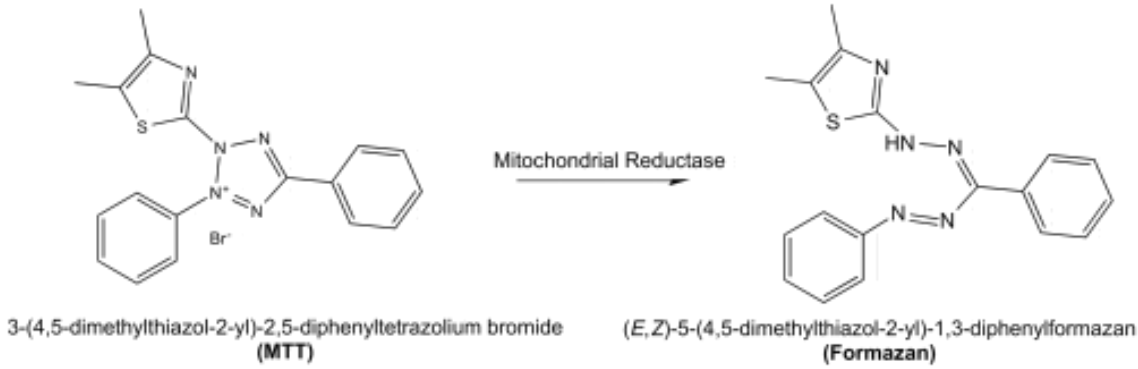
ΑΝΑΛΥΤΕΣ	ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (QCs)		
Υδροξυτυροσόλη	**0.05 μg/Ml (n=3$^{\alpha}$)**	**0.5 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**	**10 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**
Επαναληψιμότητα (RSD%)	5.2	1.4	3.0
Αναπαραγωγιμότητα (RSD%), N=3$^{\beta}$	8.0	10.0	14.9
Τυροσόλη	**0.05 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**	**0.5 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**	**2.5 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**
Επαναληψιμότητα (RSD%)	1.8	5.6	0.37
Αναπαραγωγιμότητα (RSD%), N=3$^{\beta}$	7.9	13.4	4.9
Ελαιοευρωπεΐνη	**0.05 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**	**0.5 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**	**2.5 μg/mL (n=3$^{\alpha}$)**
Επαναληψιμότητα (RSD%)	7.5	6.6	4.6
Αναπαραγωγιμότητα (RSD%), N=3$^{\beta}$	14.9	9.8	11.8

$^{\alpha}$n: ο αριθμός των μετρήσεων σε κάθε διάλυμα προτύπου, $^{\beta}$N: ο αριθμός των διαφορετικών ημερών, όπου έλαβαν χώρα τα πειράματα αναπαραγωγιμότητας.

4.7 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

4.7.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ MTT

Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος χρώσης, η μέθοδος MTT, η οποία είναι απλή, γρήγορη και ποσοτική και περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983. Με χρήση αυτής της μεθόδου, αποφεύγονται βήματα έκπλυσης που αυξάνουν το χρόνο πειραματικής διαδικασίας και είναι δυνατή η πολλαπλή σάρωση με υψηλό βαθμό ακριβείας. Αυτή η μέθοδος, βασίζεται στη μετατροπή του διαλυτού άλατος τετραζολίου σε αδιάλυτα ιζήματα φορμαζάνης. Πιο αναλυτικά, το άλας του τετραζολίου, MTT, που φέρει κίτρινο χρώμα, οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων, δηλαδή ο δακτύλιος υπόκειται μία ρήξη. Η ρήξη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πορφυρού χρώματος, οι οποίοι συγκεντρώνονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT λαμβάνει χώρα, μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι ενεργά, άρα η παραγωγή φορμαζάνης είναι ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης, μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε πληθώρα οργανικών διαλυτών και η οπτική τους πυκνότητα μετράται με φασματοφωτόμετρο. Αυτή η μέθοδος έχει υποστεί αρκετές τροποποιήσεις και χρησιμοποιείται ευρέως.[67,89]



Εικόνα 11: Παραγωγή φορμαζάνης από την οξείδωση του MTT.

Πραγματοποιήθηκε μελέτη κυτταροτοξικότητας σε υγιείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικιού 3T3 για το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ως εκχυλιστικό μέσο, που είναι ο φυσικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης, D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, για το βέλτιστο εκχύλισμα με κωδικό πειράματος ZL_20, το οποίο εκχυλίστηκε υπό συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 10, χρόνο εκχύλισης 45 min και ισχύ 30%, καθώς και για τις τρεις καθαρές ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί ποσοτικά στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, στην ελαιοευρωπεΐνη, στην υδροξυτυροσόλη και στην τυροσόλη.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεκριμένης συγκέντρωσης του διαλύτη, του εκχυλίσματος και των καθαρών ενώσεων. Ειδικότερα, για το διαλύτη και το εκχύλισμα παρασκευάστηκαν διαλύματα καταλλήλων συγκεντρώσεων σε απιονισμένο νερό, ενώ για τις καθαρές ενώσεις διαλύματα καταλλήλων συγκεντρώσεων σε διαλύτη DMSO. Τα διαλύματα διατηρήθηκαν υπό ψύξη. Πριν την περαιτέρω επεξεργασία τους, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 °C και αναδεύτηκαν με τη βοήθεια του Vortex, ώστε να ομογενοποιηθούν. Έπειτα εντός αποστειρωμένου, με Uv ακτινοβολία, θαλάμου προετοιμάστηκαν τα stock δείγματα εντός eppendorf. Σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 398 μL θρεπτικό και 2 μL από κάθε ένα διάλυμα που είχε παρασκευασθεί στην αρχή με στόχο την επίτευξη συγκεντρώσεων 50,100,150,250,400,500 μg/ml για το διαλύτη και το εκχύλισμα και 25,50,100,150,200 μg/ml για τις καθαρές ενώσεις. Επίσης, παρασκευάστηκαν αντίστοιχα δύο δείγματα control, που περιείχαν τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή το απιονισμένο νερό και το DMSO, έναντι των δειγμάτων.

Σε πλακίδιο 96 θέσεων επιστρώθηκαν 10^4 κύτταρα υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 σε κάθε πηγάδι σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Το πλακίδιο αφέθηκε στον επωαστήρα για 24 ώρες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε από κάθε πηγάδι το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 100 μL από κάθε διάλυμα δείγματος, με τριπλή επανάληψη. Η τελική συγκέντρωση DMSO

σε κάθε πηγάδι ήταν 0.5% (v/v). Το πλακίδιο 96 θέσεων αφέθηκε στον επωαστήρα για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφαιρέθηκε το περιεχόμενο υλικό από κάθε πηγάδι και αντικαταστάθηκε από 100 μL πλήρους θρεπτικού υλικού. Μετά από μία μέρα, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από κάθε πηγάδι και προστέθηκαν 115 μL MTT συγκέντρωσης 0,65 μg/mL και τα κύτταρα επωάστηκαν για διάστημα 3 ωρών στους 37 °C και 5% CO_2. Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρέθηκε από κάθε πηγάδι το θρεπτικό μέσο και προστέθηκαν 150 μL DMSO σε κάθε πηγάδι, ώστε να διαλυτοποιηθεί η φορμαζάνη και τελικά μετρήθηκε η απορρόφηση του χρώματος στα 570 nm. Η βιωσιμότητα των κυττάρων θα εκφραστεί ως το % ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων αναφοράς.

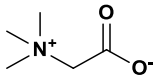
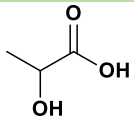
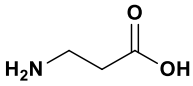
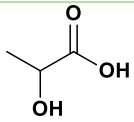
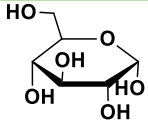
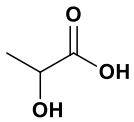
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

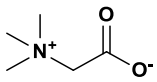
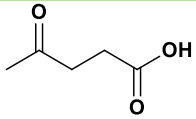
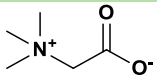
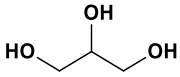
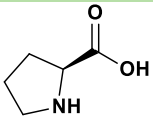
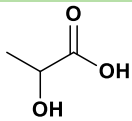
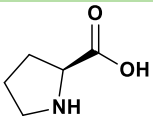
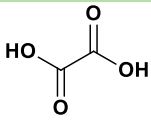
5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Η επιλογή των αρχικών συστατικών των NADES ήταν στοχευμένη ώστε να είναι όλα φυσικής προέλευσης καθώς και αποδεκτά για εφαρμογές που έχουν ως τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο. Οι πρώτες ύλες που επιλέχθηκαν είναι ασφαλείς για χρήση σε τρόφιμα και καλλυντικά, ενώ περιλαμβάνονται στον κατάλογο καλλυντικών συστατικών που καταρτίστηκε με βάση κυρίως τις πληροφορίες που παρέχει η ευρωπαϊκή βιομηχανία καλλυντικών προϊόντων, η οποία εκπροσωπείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση Καλλυντικών Προϊόντων (COLIPA) και για κάποιες εξ αυτών υπάρχουν αναφορές από το Διεθνές Συμβούλιο Διατροφικών Πληροφοριών (IFIC) και τις Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για τη χρήση τους στον τομέα των τροφίμων.[98,90]

Στον παρακάτω Πίνακα 11 παρουσιάζονται αναλυτικά οι NADES που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στην παρούσα εργασία. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως η ποσότητα νερού που σημειώνεται στα συστήματα είναι η ποσότητα νερού που εμπεριέχεται στο αντιδραστήριο του D,L-γαλακτικού οξέος, καθώς είναι υδατικό διάλυμα (80-85% aq sol.).

Πίνακας 11: NADES που σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα.

ΟΝΟΜΑ NADES	ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΟΓΙΑ			ΔΕΚΤΗΣ ΔΕΣΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (HBA)	ΔΟΤΗΣ ΔΕΣΜΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (HBD)
	HBA	HBD	NEPO*		
Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 Betaine	 D,L-Lactic Acid
β-Αλανίνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 beta Alanine	 D,L-Lactic Acid
D-γλυκόζη:D,L-Γαλακτικό οξύ	1	5	6,5	 D-(+)-Glucose	 D,L-Lactic Acid

Βεταΐνη:Λεβουλινικό οξύ	1	2	-	 Betaine	 Levulinic Acid
Βεταΐνη:Γλυκερόλη	1	3	-	 Betaine	 Glycerol
L-προλίνη:Γαλακτικό οξύ	1	2	2,5	 L-Proline	 D,L-Lactic Acid
L-προλίνη:Οξαλικό οξύ	1	1	-	 L-Proline	 Oxalic acid

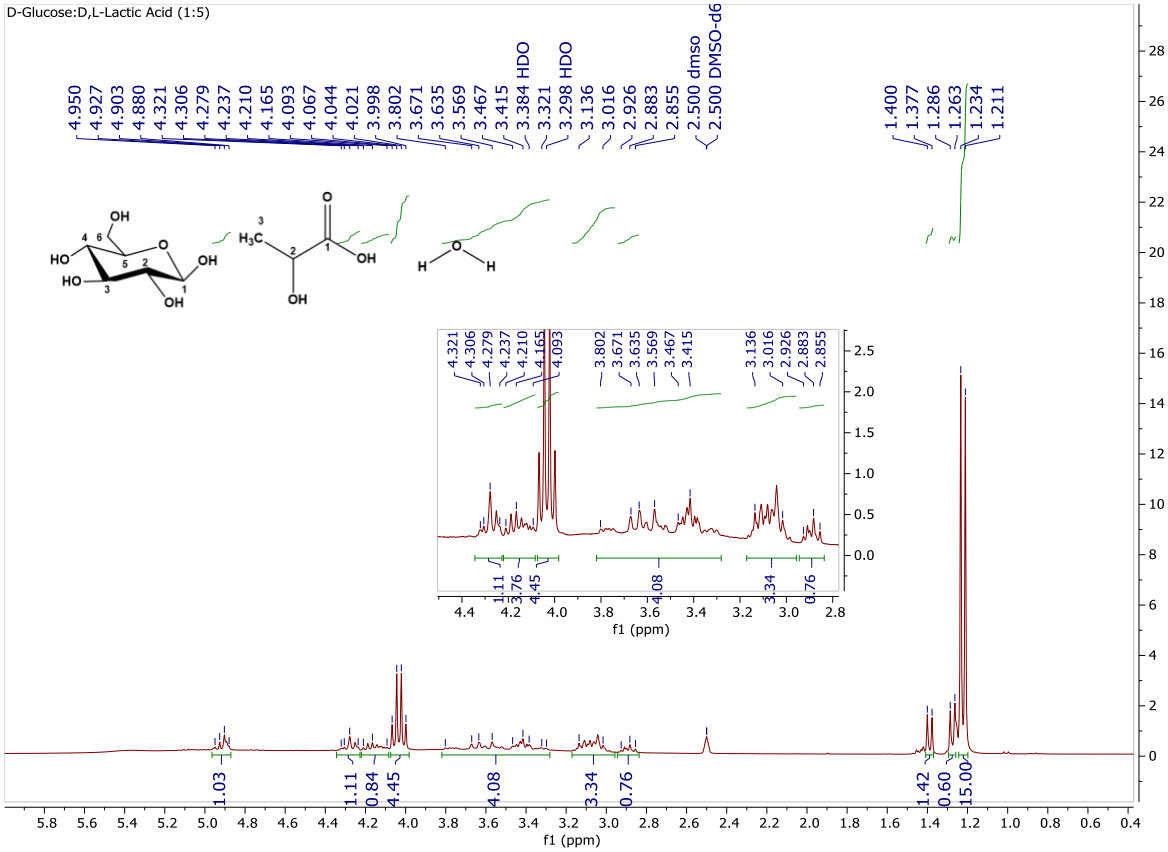
Αναλυτικότερα για κάθε πρώτη ύλη, η βεταΐνη ανήκει στην ομάδα των βιταμινών Β, ενώ το γαλακτικό οξύ είναι φυσικό, βιοδιασπώμενο, μη τοξικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία των τροφίμων. Η β-αλανίνη αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για τους μύες και το κεντρικό νευρικό σύστημα, βοηθά στο μεταβολισμό των οργανικών οξέων και σακχάρων και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα. Η β-αλανίνη ως αμινοξύ είναι συμβατό με τον άνθρωπο. Η L-προλίνη βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο κολλαγόνο στον άνθρωπο προάγοντας την υγεία του δέρματος, των τενόντων και των οστών. Ομοίως ως αμινοξύ είναι συμβατό με τον άνθρωπο. Η D-γλυκόζη και η γλυκερόλη αποτελούν ανθρώπινους μεταβολίτες. Το οξαλικό οξύ βρίσκεται ήδη φυσικά σε πολλά τρόφιμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Τέλος το λεβουλινικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακοβιομηχανία ως μη τοξικό οξύ.[100,101,102,103,104,12]

5.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Οι πράσινοι διαλύτες που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), η οποία και χρησιμοποιείται ευρέως για μοριακές ταυτοποιήσεις. Είναι δυνατό με τη βοήθεια ενός φάσματος NMR, να ερμηνευτεί η δομή μίας άγνωστης ή και γνωστής ένωσης, χρησιμοποιώντας παράγοντες όπως χημική μετατόπιση, πολλαπλότητα κορυφής, σταθερές σύζευξης και ολοκλήρωση. Το φάσμα αποτελείται από μία σειρά κορυφών, οι οποίες έχουν τη δική τους πολλαπλότητα, ανάλογα με τα γειτονικά υδρογόνα και μοναδική χημική

μετατόπιση. Ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίστανται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση της ενέργειας. Οι χημικές μετατοπίσεις αυξάνονται από τα δεξιά (υψηλότερα μαγνητικά πεδία) προς τα αριστερά (χαμηλότερα μαγνητικά πεδία), με το φάσμα ^{1}H NMR να λαμβάνεται συνήθως εντός της περιοχής 0-12 (ή 14) ppm. Η κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί στα χημικά ισοδύναμα πρωτόνια που υπάρχουν στην εξεταζόμενη ένωση. Όσον αφορά την πολλαπλότητα των κορυφών, είναι ενδεικτική της αλληλεπίδρασης της κάθε κορυφής από τα γειτονικά πρωτόνια. Πιο συγκεκριμένα, η πολλαπλότητα υπολογίζεται βάσει του κανόνα «N+1», όπου N ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων, για παράδειγμα, μια κορυφή τριπλής πολλαπλότητας δείχνει ότι το πρωτόνιο (^{1}H) που αντιπροσωπεύεται έχει 2 γειτονικά υδρογόνα. Η χημική μετατόπιση ενός πρωτονίου επηρεάζεται από το χημικό περιβάλλον, την εγγύτητά του στα ηλεκτραρνητικά άτομα και στις ακόρεστες ομάδες.

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά τα φάσματα ^{1}H NMR του NADES D-γλυκόζη: D,L-γαλακτικό οξύ, καθώς αποτελεί τον διαλύτη εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, καθώς και του NADES L-προλίνη: οξαλικό οξύ.

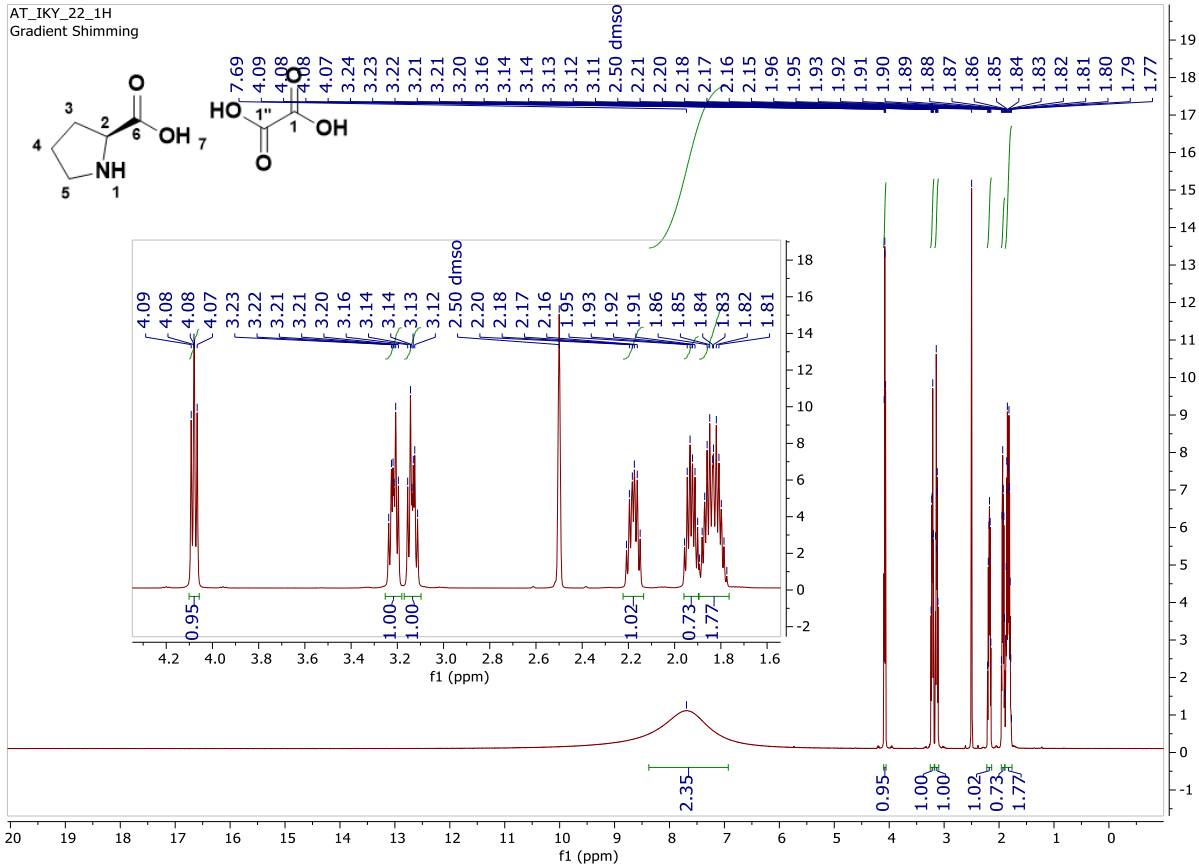


Εικόνα 12: Φάσμα ^{1}H NMR του NADES D-γλυκόζη: D,L-γαλακτικό οξύ.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12 τα σήματα του D,L-γαλακτικού οξέος και της D-γλυκόζης εμφανίζονται σαφώς διαχωρισμένα. Ξεκινώντας από τα υψηλότερα (δεξιά) προς τα χαμηλότερα (αριστερά) μαγνητικά πεδία, δηλαδή από τις πιο προστατευμένες ομάδες, αρχικά εμφανίζεται μία διπλή κορυφή στα 1.22 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα πιο προστατευμένα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 3 του γαλακτικού οξέος.
Στα 2.50 ppm φαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στον δευτεριωμένο διαλύτη DMSO-d_6. Στο εύρος 3.67 με 2.85 ppm βρίσκονται τα πρωτόνια της D-γλυκόζης, εκτός από αυτά της θέσης 1. Στο εύρος 2.86-3.80 ppm δεν είναι ξεκάθαρη η πολλαπλότητα των κορυφών, ωστόσο βάσει μίας έρευνας των Pisano et al. (Pisano, et al., 2018) τα πρωτόνια των θέσεων 2,3,4,5 και 6 αντιστοιχούνται σε αυτό το εύρος. Ενδεικτικά, στο εύρος 2.855-2.926, όπου φαίνεται να αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2, ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, στο εύρος 3.016-3.136 τα πρωτόνιο των θέσεων 3 και 4 ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια και στο εύρος 3.415-3.802 τα πρωτόνια των θέσεων 5 και 6, που ολοκληρώνονται για 4 πρωτόνια.

Στη συνέχεια, η χαρακτηριστική τετραπλή κορυφή στα 4,02 ppm με σταθερά σύζευξης J=6.9 Hz, αντιστοιχεί στο μοναδικό πρωτόνιο του γειτονικού της θέσης 2, γειτονικού στην ομάδα καρβονυλίου του D,L-γαλακτικού οξέος. Ολοκληρώνεται, όπως και αναμένεται, για πέντε πρωτόνια καθώς το γαλακτικό οξύ βρίσκεται σε αναλογία 5:1 ως προς τη γλυκόζη. Τέλος, στα εύρη 4,165-4,321 ppm και 4.880-4.950 ppm εμφανίζονται τα δύο πρωτόνια της θέσης 1 της D-γλυκόζης παρουσιάζοντας πολλαπλές κορυφές, και ολοκληρώνονται για ένα πρωτόνιο το έκαστο.

Ενδεικτικά αναλύεται και το ^{1}H NMR του NADES L-προλίνη: οξαλικό οξύ.



Ξεκινώντας από τα υψηλότερα και πηγαίνοντας προς τα χαμηλότερα, δηλαδή από τις πιο προστατευμένες ομάδες, εμφανίζονται τα πρωτόνια της L-προλίνης, αρχικά μία πολλαπλή κορυφή στο εύρος 1.77-1.89 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 4 και ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, έπειτα μία πολλαπλή κορυφή στο εύρος 1.90-1.96 ppm, που αντιστοιχεί στο ένα πρωτόνιο της θέσης 3 και το δεύτερο πρωτόνιο της ίδιας θέσης στο εύρος 2.15-2.21 ppm. Στη συνέχεια, εμφανίζονται δύο κορυφές (dt) στα 3.13-3.22 ppm, αντιστοίχως, οι οποίες ολοκληρώνονται για ένα πρωτόνιο ή κάθε μία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσης 5.

Τέλος, το πρωτόνιο της θέσης 2 εμφανίζεται με μία διπλή κορυφή (dd) στα 4.08 ppm ολοκληρώνεται επίσης για ένα εμφανίζεται με μία διπλή κορυφή (dd) στα 4.08 ppm ολοκληρώνεται επίσης για ένα πρωτόνιο. Όσον αφορά το οξαλικό οξύ, εμφανίζεται στο φάσμα μία απλή ευρεία κορυφή στα 7.69 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, καθώς τα πρωτόνια είναι χημικά ισοδύναμα.

Χαρακτηριστικό στα φάσμα ^{1}H NMR των NADES, είναι γεγονός πως δεν εμφανίζεται το χαρακτηριστικό, πιο αποπροστατευμένο, πρωτόνιο των οξέων (όπως π.χ. του γαλακτικού οξέος ή του οξαλικού οξέος) κάτι που αποτελεί ένδειξη της συμμετοχής στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται εντός των NADES.

5.1.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ NADES ΩΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Η σύσταση των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τις χημικές και φυσικές ιδιότητές τους (ιξώδες, pH κ.ά.) και κατ' επέκταση επηρεάζει την αποτελεσματικότητα εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων από την πρώτη ύλη. Έτσι, απαιτείται η διερεύνηση ποικιλίας διαλυτών, ώστε να διακριθεί ο καταλληλότερος διαλύτης για την προκείμενη διεργασία που μελετάται.

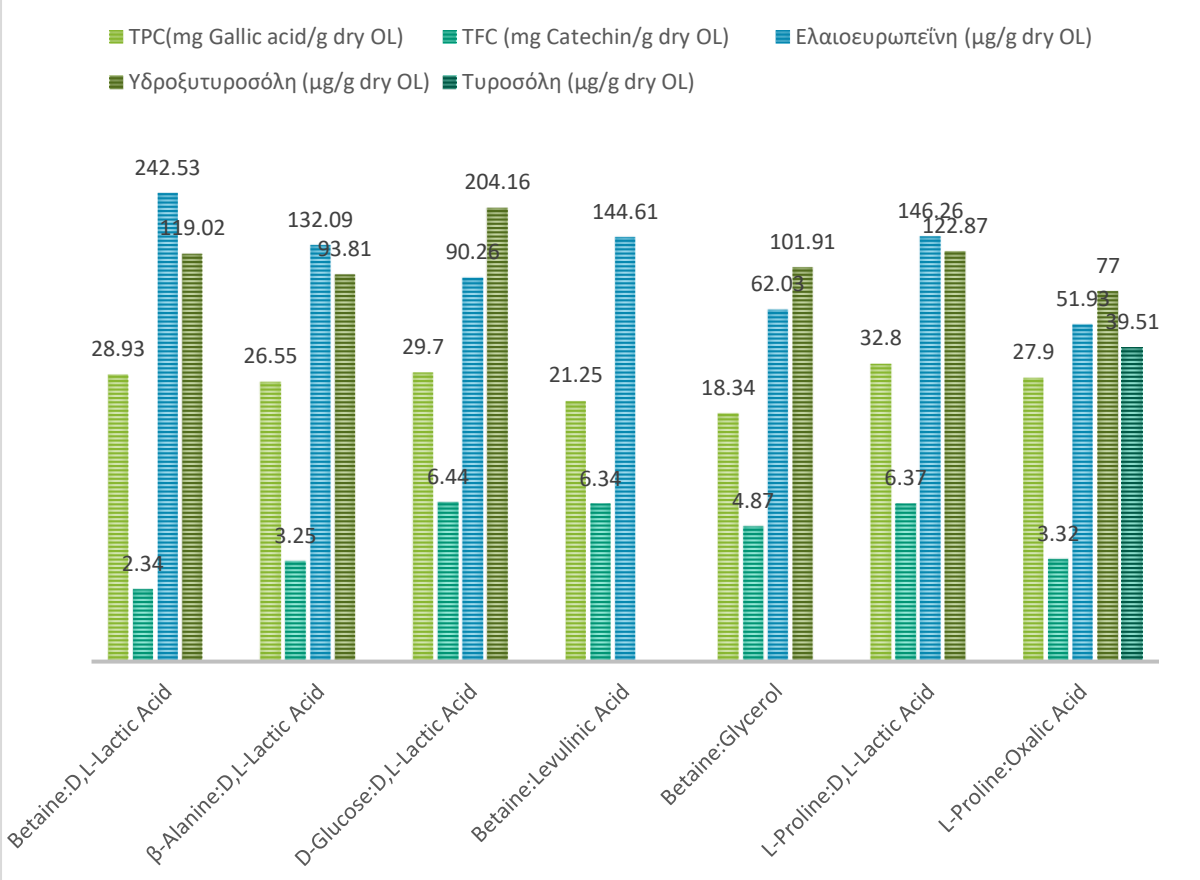
Οι διαλύτες που συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε σταθερές συνθήκες εκχύλισης, δηλαδή για χρόνο εκχύλισης 15 min, ισχύ 35% (140 W), αναλογία NADES/H_2O 75:25 και αναλογία διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 33 (3 g διαλύτη προς 90 mg φύλλων ελιάς) για τα φύλλα ελιάς ποικιλίας Καλαμών, ώστε από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής να επιλεχθεί ο καταλληλότερος διαλύτης για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών (TFC) και φαινολικών (TPC) και της ελαιοευρωπεΐνης, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης, που περιέχονται σε κάθε ένα από τα εκχυλίσματα.

Πίνακας 12: Αξιολόγηση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με NADES.

NADES	ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Phenolic Content, TPC)	ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Flavonoid Content, TFC)	ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗ		ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ		ΤΥΡΟΣΟΛΗ	
	(mg GAL/g)	(mg CAT/g)	(μg/g)	StDev	(μg/g)	StDev	(μg/g)	StDev
Betaine:D,L-Lactic Acid	28,93	2,34	**242,53**	0,47	119,02	8,18	ND	-
β-Alanine:D,L-Lactic Acid	26,55	3,25	132,09	1,55	93,81	2,22	ND	-
D-Glucose:D,L-Lactic Acid	29,70	**6,44**	90,26	1,11	**204,16**	3,86	ND	-
Betaine:Levulinic Acid	21,25	6,34	144,61	1,14	ND	-	ND	-
Betaine:Glycerol	18,34	4,87	62,03	0,92	101,91	1,42	ND	-
L-Proline:D,L-Lactic Acid	**32,80**	6,37	146,26	0,16	122,87	3,33	ND	-
L-Proline:Oxalic Acid	27,90	3,32	51,93	1,84	77	4,49	**39,51**	3,56

*ND: Not Determined



Διάγραμμα 1: Γραφική αναπαράσταση των τιμών του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών (TFC), του ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC), της ελαιοευρωπεΐνης, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης, που προέκυψαν από την εκχύλιση φύλλων ελιάς με διαφορετικό φυσικά βαθέως ευτηκτικό διαλύτη.

Από τον παραπάνω Πίνακα 12 και το Διάγραμμα 1 παρατηρείται ότι οι συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση φυσικά βαθέως ευτηκτικών διαλυτών παρουσιάζουν αρκετά διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ τους. Για κάθε μεταβλητή απόκρισης, διαφορετικός διαλύτης έχει παρουσιάσει την υψηλότερη τιμή, όπως φαίνεται από τις τιμές με έντονη επισήμανση. Πιο συγκεκριμένα, μέγιστο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) παρουσίασε το εκχύλισμα με το NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, μέγιστο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) η L-προλίνη:D,L-γαλακτικό οξύ, μέγιστη περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη η βεταΐνη:D,L-γαλακτικό οξύ, σε υδροξυτυροσόλη η D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, ενώ η τυροσόλη, στις μελετούμενες συνθήκες εκχύλισης, ανιχνεύθηκε μόνο στην L-προλίνη:οξαλικό οξύ.

Συγκρίνοντας τους διαλύτες που προέρχονται από το γαλακτικό οξύ, φαίνεται ότι αυτός που έδωσε εκχυλίσματα με καλύτερα αποτελέσματα ως προς τις εξεταζόμενες παραμέτρους, είναι ο NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, ενώ μεταξύ των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το NADES με κοινό συστατικό την βεταΐνη, καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να έδωσε

το εκχύλισμα που προέκυψε από εκχύλιση με διαλύτη NADES βεταΐνη:D,L-γαλακτικό οξύ. Κατά γενική ομολογία, οι διαλύτες με δότη υδρογόνου το D,L-γαλακτικό οξύ δίνουν καλύτερα αποτελέσματα, σε σύγκριση με το λεβουλινικό οξύ, τη γλυκερόλη και το οξαλικό οξύ. Παρατηρείται ότι οι διαλύτες με τις λιγότερο καλές αποδόσεις είναι η βεταΐνη:γλυκερόλη, καθώς παρουσιάζει ελάχιστο στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων και πολύ χαμηλή τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Οι διαλύτες που παρουσιάζουν συνδυαστικά τα καλύτερα αποτελέσματα, ως προς τις μελετούμενες αποκρίσεις και στις εξεταζόμενες συνθήκες εκχύλισης, είναι η L-προλίνη:D,L-γαλακτικό οξύ και η D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ. Ωστόσο, ο διαλύτης D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ σημειώνει το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, σε συνδυασμό με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη, με τα υπόλοιπα να είναι σε επιθυμητά επίπεδα σε σχέση με την L-προλίνη:D,L-γαλακτικό οξύ. Επίσης, συγκρίνοντας τη διαχείριση των διαλυτών ως προς το ιξώδες τους κατά την πειραματική διαδικασία, το χρόνο παρασκευής τους και το κόστος πρώτων υλών τους, συμπεραίνεται ότι ο καταλληλότερος διαλύτης για περαιτέρω μελέτη είναι ο NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ.

5.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (Design of Experiments, DoE)

Εκπονήθηκαν 15 πειράματα στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, τα οποία προέκυψαν ύστερα από υπόδειξη του χρησιμοποιούμενου λογισμικού, Design Expert (free trial version). Έγιναν τρεις επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα-τιμές των αποκρίσεων, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και φαινολικών ενώσεων (TPC), πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση αυτών και εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση.

5.2.1 ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC)

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής “Reduced Cubic Model”, δηλαδή το απλοποιημένο κυβικό. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει του όρους A, B, C, AB, AC, BC, A^2, B^2, A^2B, A^2C και AB^2, όπου το A, B, C συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς, σε g DES/g OL, ισχύ σε Watt και χρόνο εκχύλισης σε

min, αντίστοιχα. Από αυτή τη μορφή αφαιρέθηκαν οι όροι που δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί δηλαδή είχαν υψηλά p-value και που επηρέαζαν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου.

Στον παρακάτω Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	482.18	11	43.83	41.12	0.0054	significant
A-qDES/mg OL	89.02	1	89.02	83.50	0.0028	
B-POWER	0.0000	1	0.0000	0.0000	0.9964	
C-TIME	105.17	1	105.17	98.64	0.0022	
AB	64.08	1	64.08	60.11	0.0045	
AC	74.56	1	74.56	69.94	0.0036	
BC	36.30	1	36.30	34.05	0.0100	
A^2	0.2153	1	0.2153	0.2020	0.6836	
B^2	62.00	1	62.00	58.16	0.0047	
A^2B	16.19	1	16.19	15.18	0.0300	
A^2C	57.03	1	57.03	53.49	0.0053	
AB^2	13.16	1	13.16	12.34	0.0391	
Residual	3.20	3	1.07			
Lack of Fit	0.0011	1	0.0011	0.0007	0.9816	not significant
Pure Error	3.20	2	1.60			
Cor Total	485.37	14				

Η F-value του μοντέλου είναι 41,12 που υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 0,54% πιθανότητα μία τέτοια τόσο μεγάλη F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Φαίνεται ότι όλοι οι όροι του μοντέλου εκτός από δύο, το C και A^2, έχουν p-value χαμηλότερο του 0,05, γεγονός που τους καθιστά σημαντικούς για το μοντέλο. Οι όροι C και A^2 δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, ωστόσο, για να διατηρηθεί η ιεραρχία του μοντέλου, αυτοί οι όροι επιλέχθηκε να μην παραληφθούν. Επιπλέον, η έλλειψη προσαρμογή (Lack of Fit) έχει τιμή 0,0011 υποδεικνύοντας ότι αυτή δεν είναι σημαντική και σχετική με το καθαρό σφάλμα του μοντέλου, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται σωστά.

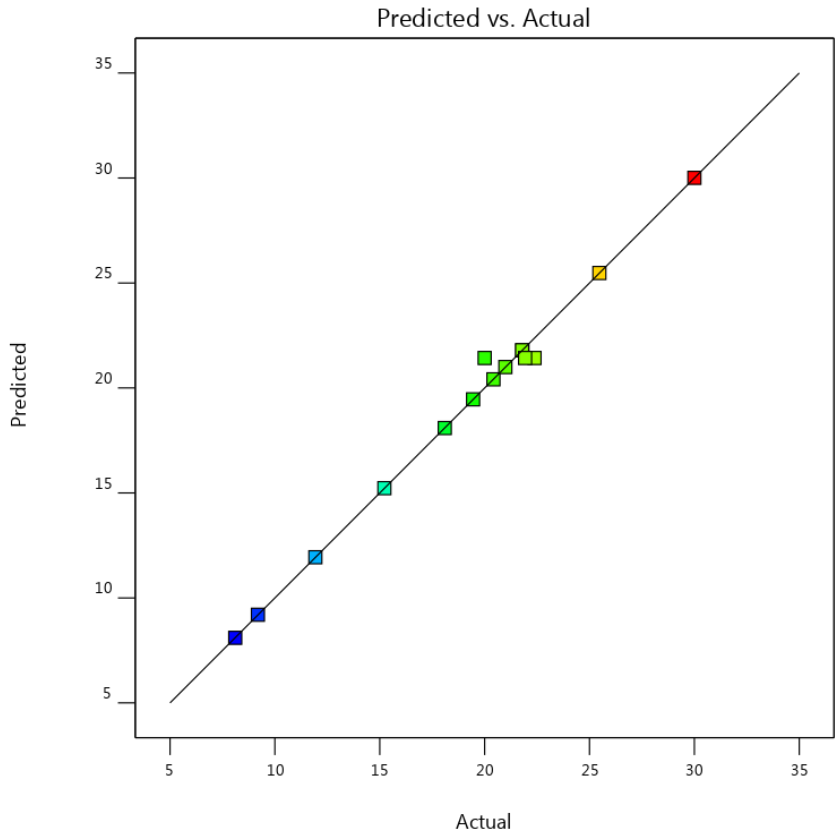
Στον Πίνακα 14 παρουσιάζεται η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή του συγκλίνει αρκετά στο 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των

μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές “Adjusted R^2” και “Predicted R^2” δεν αποκλίνουν περισσότερο από 0,2 μονάδες, οπότε η τιμή R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή “Adequate precision” μετρά το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, που επιθυμείται, αυτό υποδεικνύει ότι η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιηγηθούμε στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC).

Std. Dev.	1.03		**R^2**	0.9934
Mean	19.12		**Adjusted R^2**	0.9692
C.V. %	5.40		**Predicted R^2**	0.9884
			Adeq Precision	23.7198

Το παρακάτω Διάγραμμα 2 απεικονίζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών, από το μοντέλο, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως φαίνεται η συσχέτιση είναι πολύ καλή καθώς οι τιμές είναι όλες πολύ κοντά στη διαγώνιο υποδεικνύοντας πως οι τιμές πρόβλεψης είναι πολύ κοντά με τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 2: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών είναι η εξής:

$$TFC = 21{,}43 + 4{,}72A - 0{,}0025B - 5{,}13C - 4AB - 4{,}32AC - 3{,}01BC - 0{,}2408A^2 - 4{,}09B^2 + 2{,}84A^2B + 5{,}34A^2C - 2{,}57AB^2 \quad [7]$$

Αυτή η εξίσωση, με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι η εξής:

$$\begin{aligned} TFC = & -105.53135 + 8{,}00981 * \frac{gDES}{mg\ OL} + 0{,}478553 * Power + 2{,}26033 * Time \\ & + 0{,}000019 * \frac{gDES}{mg\ OL} * Power - 0{,}171183 * \frac{gDES}{mg\ OL} * Time \\ & - 0{,}005021 * Power * Time - 0{,}194558 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 + 0{,}00065 * Power^2 \\ & + 0{,}000711 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Power + 0{,}003560 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Time \\ & - 0{,}000160 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Power^2 \quad [8] \end{aligned}$$

Αυτή η εξίσωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν. Αυτή η εξίσωση, σε αντίθεση με την προηγούμενη, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται ώστε να φιλοξενούν τις μονάδες κάθε παράγοντα.

5.2.2 ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ (TPC)

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής “Reduced Cubic Model”, δηλαδή το απλοποιημένο κυβικό. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει του όρους A, B, C, AB, AC, BC, A^2, B^2, A^2B,

A^2C και AB^2, όπου το A, B, C συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς, σε g DES/g OL, ισχύ σε Watt και χρόνο εκχύλισης σε min, αντίστοιχα. Από αυτή τη μορφή αφαιρέθηκαν οι όροι που δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί δηλαδή είχαν υψηλά p-value και που επηρέαζαν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου.

Στον παρακάτω Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 15:Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	791.58	11	71.96	77.74	0.0021	significant
A-qDES/mg OL	12.25	1	12.25	13.23	0.0358	
B-POWER	12.71	1	12.71	13.73	0.0342	
C-TIME	6.63	1	6.63	7.16	0.0753	
AB	230.13	1	230.13	248.60	0.0006	
AC	164.35	1	164.35	177.55	0.0009	
BC	232.72	1	232.72	251.40	0.0005	
A^2	18.95	1	18.95	20.48	0.0202	
B^2	4.20	1	4.20	4.54	0.1230	
A^2B	49.65	1	49.65	53.64	0.0053	
A^2C	28.31	1	28.31	30.59	0.0116	
AB^2	50.40	1	50.40	54.45	0.0051	
Residual	2.78	3	0.9257			
Lack of Fit	0.7771	1	0.7771	0.7771	0.4710	not significant
Pure Error	2.00	2	1.0000			
Cor Total	794.35	14				

Η F-value του μοντέλου είναι 77,74 που υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ότι υπάρχει μόλις 0,21% πιθανότητα μία τέτοια τόσο μεγάλη F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Φαίνεται ότι όλοι οι όροι του μοντέλου εκτός από δύο, το C και B^2, έχουν p-value χαμηλότερο του 0,05, γεγονός που τους καθιστά σημαντικούς για το μοντέλο. Οι όροι C και B^2 δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, ωστόσο, για να διατηρηθεί η ιεραρχία του μοντέλου, αυτοί οι όροι επιλέχθηκε να μην παραληφθούν. Επιπλέον, η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit) έχει τιμή 0,78 υποδεικνύοντας ότι αυτή δεν είναι σημαντική και σχετική με το καθαρό σφάλμα του μοντέλου, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται σωστά.

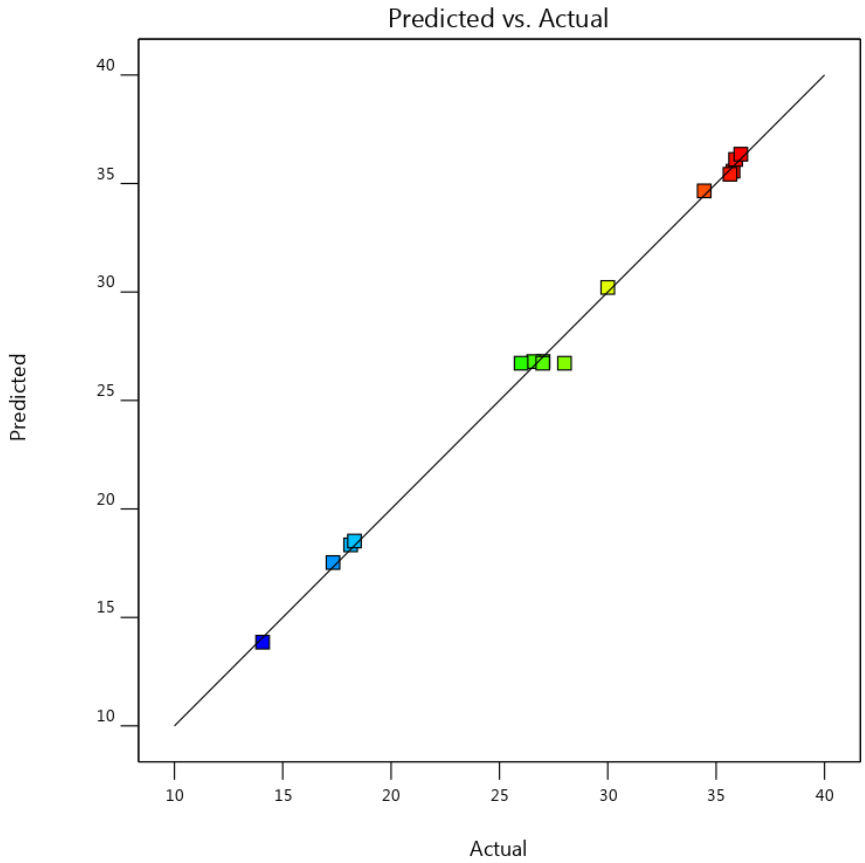
Στον Πίνακα 16 παρουσιάζεται η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή του συγκλίνει αρκετά στο 1, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των

μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές “Adjusted R^2” και “Predicted R^2” δεν αποκλίνουν περισσότερο από 0,2 μονάδες, οπότε η τιμή R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή “Adequate precision” μετρά το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, που επιθυμείται, αυτό υποδεικνύει ότι η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιηγηθούμε στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 16:Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Std. Dev.	0.9621		**R^2**	0.9965
Mean	27.36		**Adjusted R^2**	0.9837
C.V. %	3.52		**Predicted R^2**	0.7918
			Adeq Precision	26.1385

Το παρακάτω Διάγραμμα 3 απεικονίζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών, από το μοντέλο, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως φαίνεται η συσχέτιση είναι πολύ καλή καθώς οι τιμές είναι όλες πολύ κοντά στη διαγώνιο υποδεικνύοντας πως οι τιμές πρόβλεψης είναι πολύ κοντα με τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 3: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών είναι η εξής:

$$TPC = 26{,}72 - 1{,}75A - 1{,}78B + 1{,}29C - 7{,}58AB - 6{,}41AC - 7{,}63BC + 2{,}26A^2 - 1{,}06B^2 + 4{,}98A^2B - 3{,}76A^2C + 5{,}02AB^2 \quad [9]$$

Αυτή η εξίσωση, με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Από προεπιλογή τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων είναι η εξής:

$$\begin{aligned} TPC = & -204{,}50981 + 9{,}96588 * \frac{gDES}{mg\ OL} + 2{,}87983 * Power + 1{,}46267 * Time \\ & - 0{,}144088 * \frac{gDES}{mg\ OL} * Power + 0{,}05600 * \frac{gDES}{mg\ OL} * Time \\ & - 0{,}012713 * Power * Time - 0{,}051635 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 \\ & - 0{,}006940 * Power^2 + 0{,}001246 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Power \\ & - 0{,}002508 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Time + 0{,}000314 * \frac{gDES}{mg\ OL}^2 * Power^2 \quad [10] \end{aligned}$$

Αυτή η εξίσωση, με τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν. Αυτή η εξίσωση σε αντίθεση με την προηγούμενη δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται ώστε να φιλοξενούν τις μονάδες κάθε παράγοντα.

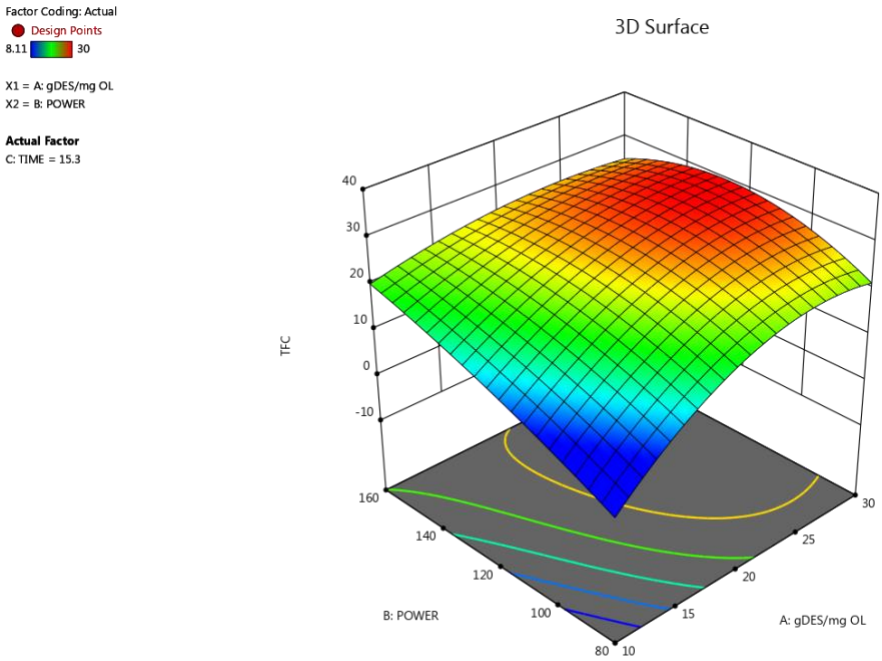
5.2.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων εντός του πεδίου μελέτης. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

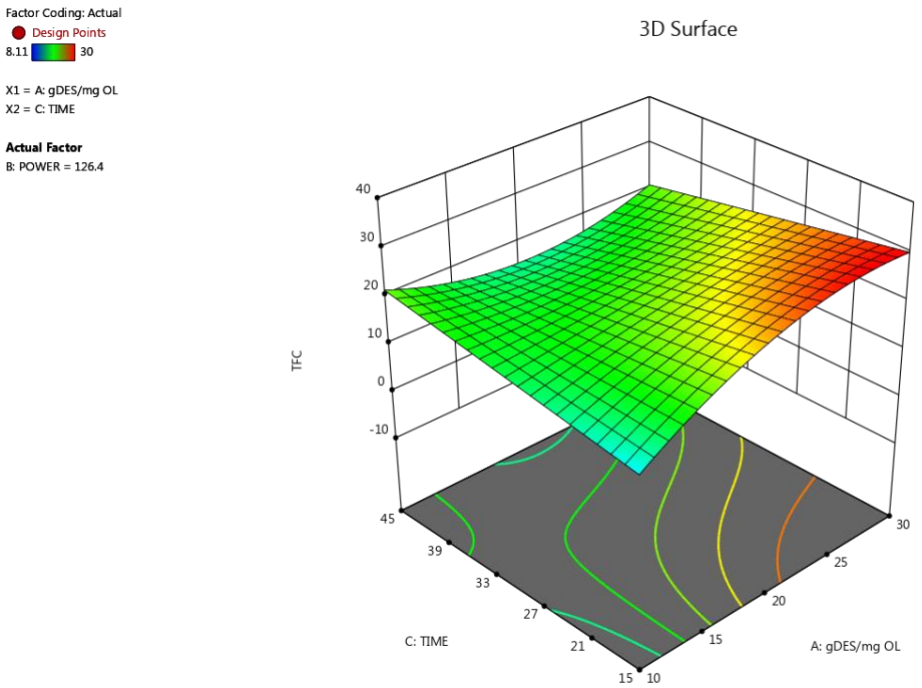
Πίνακας 17: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για βελτιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών.

ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (min)	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΜΑΖΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ** (g DES/g OL)	**ΙΣΧΥΣ** (W)	**ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Flavonoid Content, TFC)** (mg CAT/g)	**ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Phenolic Content, TPC)** (mg GAL/g)
15,25	29,86	126,89	30,08	36,39

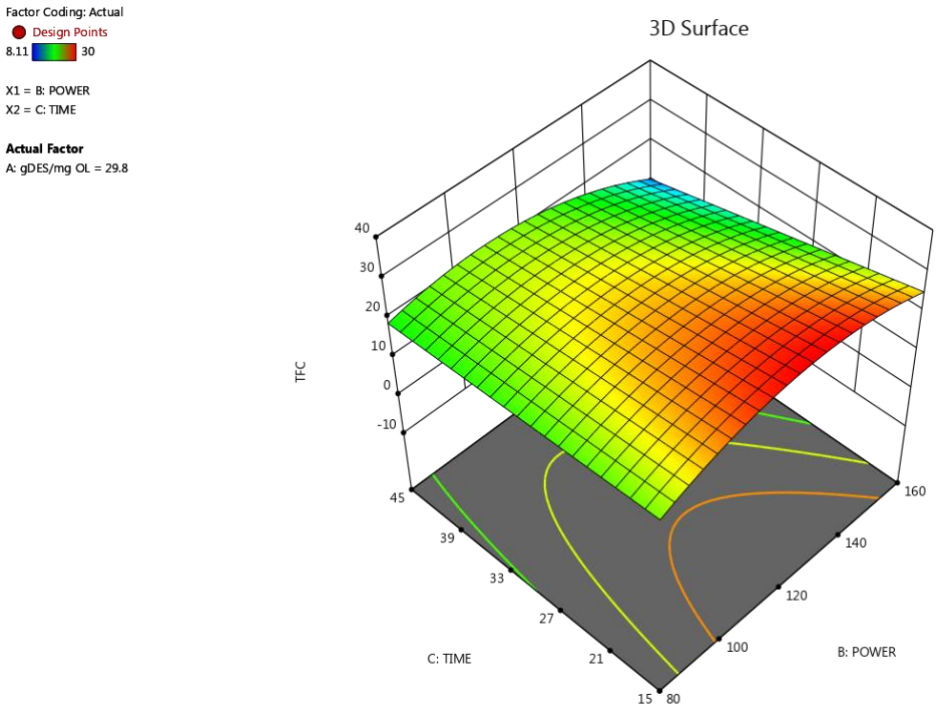
Παρακάτω παρατίθενται τα τρισδιάστατα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, όπου η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της. Υπενθυμίζεται ότι τα A, B, C συμβολίζουν την αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς σε g DES/g OL, την ισχύ σε Watt και το χρόνο εκχύλισης σε min, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.



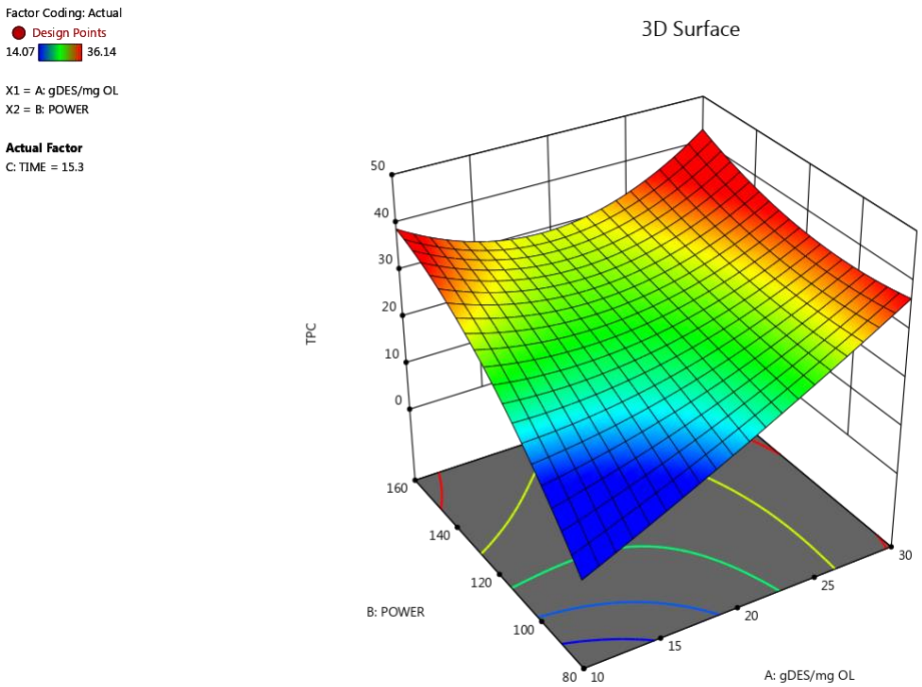
Διάγραμμα 5: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.



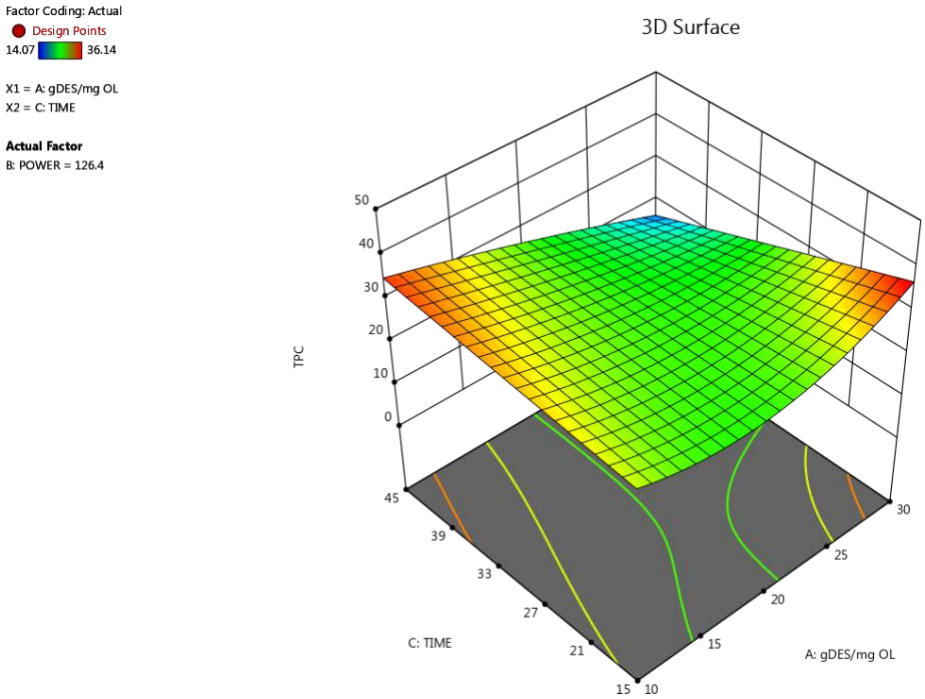
Διάγραμμα 6: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.

Για το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, παρατηρώντας τα αποτελέσματα βελτιστοποίησης και τα παραπάνω τρισδιάστατα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης (Διαγράμματα 4 έως 6), γίνεται αντιληπτό ότι με ταυτόχρονη αύξηση της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και ισχύος, λαμβάνεται η μέγιστη τιμή TFC, ενώ ο χρόνος

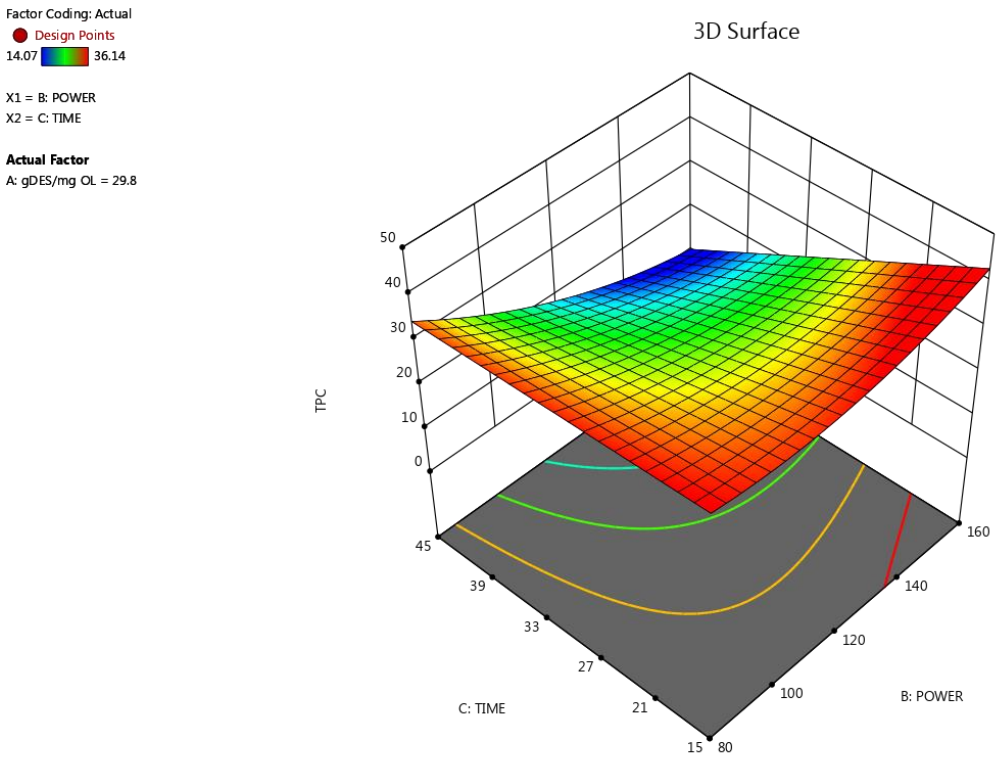
εκχύλισης φαίνεται να μην επιφέρει σημαντικές μεταβολές. Πιο συγκεκριμένα, το εύρος τιμών ισχύος που επιδρούν θετικά στην απόκριση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών είναι 100 με 150 W, ενώ το εύρος τιμών αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς είναι περίπου 22 με 30 g DES/g OL.



Διάγραμμα 7: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων(TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.



Διάγραμμα 8: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.



Διάγραμμα 9: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη.

Για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, παρατηρώντας τα αποτελέσματα βελτιστοποίησης και τα παραπάνω τρισδιάστατα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης (Διαγράμματα 7 έως 9), γίνεται αντιληπτό ότι όσον αφορά την αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και την ισχύ, ακολουθείται το ίδιο μοτίβο με το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, δηλαδή με ταυτόχρονη αύξησή τους, λαμβάνεται η μέγιστη τιμή TFC. Πιο συγκεκριμένα, το εύρος τιμών ισχύος που επιδρούν θετικά στην απόκριση ολικού περιεχομένου φαινολικών είναι περίπου 135 με 160 W, ενώ το εύρος τιμών αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς είναι κοντά στα 30 g DES/g OL. Επίσης, η τιμή ισχύος που υποδείχθηκε ως βέλτιστη φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά αν και παρατηρείται μία μικρή αύξηση της τιμής TFC με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης.

5.2.4 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Για την επιβεβαίωση του μοντέλου που πορέκυψε από τη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε ένα ακόμη πείραμα ελέγχου (εκτός αυτών που διεξήχθησαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό) εντός του πεδίου μελέτης που έχει οριστεί. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε φύλλα ελιάς ποικιλίας Καλαμών, και προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και φαινολικών ενώσεων (TPC). Οι συνθήκες εκχύλισης ήταν αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 21,3 g DES/ g OL, ισχύ 160 W και χρόνο εκχύλισης 15 min.

Μετά τον χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος προέκυψε ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων 21,2 mg CAT/g και ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων 31,04 mg GAL/g. Οι πειραματικές τιμές για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων και το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεωνν φάνηκε πως είναι εντός επιθυμητών ορίων όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Πειραματικές τιμές ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών ενώσεων για το επιπλέον πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου.

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
TFC	25.7524	25.7524		1.03253	1	1.43588	21.1828	21.2	30.322
TPC	30.67	30.67		0.962125	1	1.33797	26.412	31.04	34.9281

Έτσι, επιβεβαιώθηκε ότι το μοντέλο δίνει αποτελέσματα αρκετά κοντά στα πειραματικά προσδιοριζόμενα και κατά συνέπεια είναι σημαντικό.

5.2.5 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΑΛΛΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ

Πραγματοποιήθηκε ένα τελευταίο πείραμα για μελέτη του πειραματικού σχεδιασμού ως προς την απόκρισή του για εκχυλίσματα από διαφορετική ποικιλία από την επιλεγμένη (Καλαμών). Επιλέχθηκε η ποικιλία Αμφίσσης και διεξήχθη ένα πείραμα σε συνθήκες εκχύλισης αναλογίας μάζα διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 20,55 g DES/g OL, ισχύος 40% (160 W) και χρόνου εκχύλισης 15 min. Σε αυτό το εκχύλισμα προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και φαινολικών ενώσεων. Μετά τον χαρακτηρισμό του εκχυλίσματος προέκυψε ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων 18,78 mg CAT/g και ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων 29,77 mg GAL/g. Οι πειραματικές τιμές για το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων είναι εντός επιθυμητών ορίων, σε αντίθεση με το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 19.

Πίνακας 19: Πειραματικές τιμές ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών ενώσεων για το πείραμα ποικιλίας Αμφίσσης.

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
TFC	25.5944	25.5944		1.03253	1	1.43852	21.0164	**18.78**	30.1724
TPC	30.344	30.344		0.962125	1	1.34044	26.0781	29.77	34.6099

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 19 το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων απέχει από το προβλεπόμενο κάτω όριο τιμών που έχει ορίσει ο πειραματικός σχεδιασμός. Βέβαια δεν ήταν

αναμενόμενο οι τιμές αυτού του πειράματος να βρίσκονται απαραιτήτως εντός επιθυμητών ορίων. Είναι πιθανό κάθε ποικιλία να χρειάζεται διαφορετικό πειραματικό σχεδιασμό και εκ νέου βελτιστοποίηση καθώς κάθε ποικιλία ελιάς διαθέτει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Σε μία έρευνα από τους Yancheva et al. (2016), όπου τρεις διαφορετικές ποικιλίες φύλλων ελιάς εκχυλίστηκαν με την ίδια μέθοδο εκχύλισης, προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα ολικού φαινολικού περιεχομένου, συνεπώς δεν είναι απαραίτητο ένας πειραματικός σχεδιασμός να ταιριάζει σε όλες τις ποικιλίες ελιάς.[87] Τέλος, συγκρίνοντας το πείραμα που χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση του μοντέλου και αυτό διαφορετικής ποικιλίας, λόγω του ότι οι συνθήκες εκχύλισής τους είναι παρόμοιες, προκύπτει ότι η Καλαμών παρουσιάζει υψηλότερες τιμές TFC και TPC σε σύγκριση με την Αμφίσσης.

5.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Τα εκχυλίσματα που μελετώνται κατά τον πειραματικό σχεδιασμό χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο του αργιλίου και το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για κάθε εκχύλισμα.

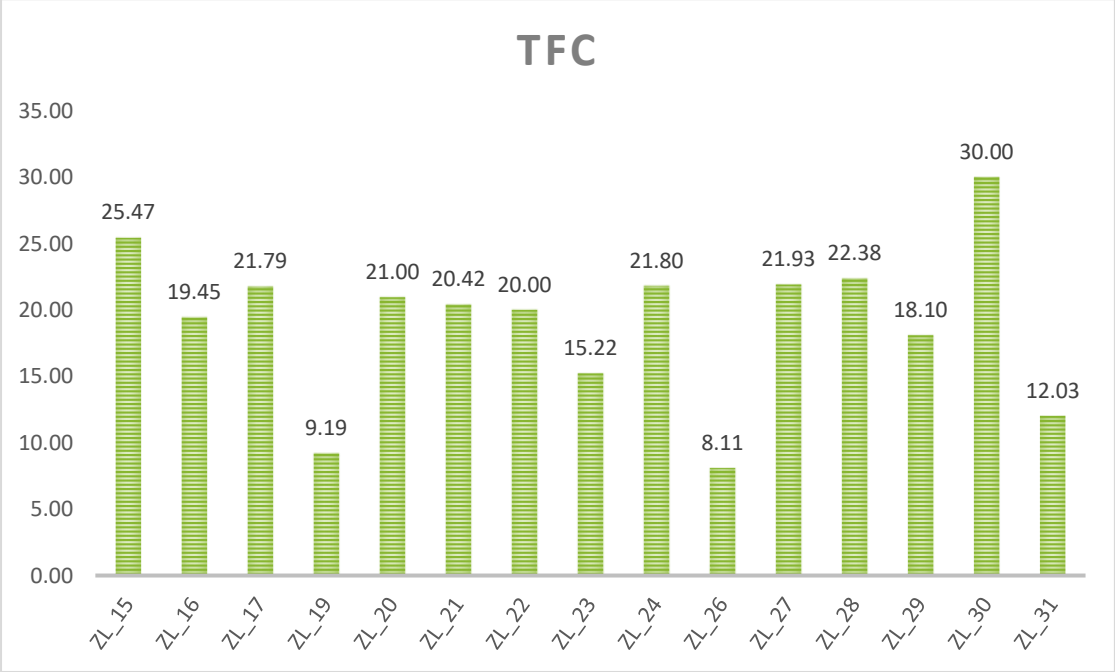
5.3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC)

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελήφθησαν από το χαρακτηρισμό εκχυλισμάτων με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών (TFC).

Πίνακας 20: Ποσοτικοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών (TFC) στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ)	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΜΑΖΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ** (g NADES/g OL)	**ΙΣΧΥΣ** (W)	**ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ** (min)	**ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Flavonoid Content, TFC)** (mg CAT/g)
ZL_15	20	160	15	25,47
ZL_16	20	80	15	19,45
ZL_17	30	120	45	21,79
ZL_19	20	160	45	9,19
ZL_20	10	120	45	21,00

ZL_21	30	80	30	20,42
ZL_22	20	120	30	20,00
ZL_23	20	80	45	15,22
ZL_24	10	160	30	21,80
ZL_26	10	80	30	8,11
ZL_27	20	120	30	21,93
ZL_28	20	120	30	22,38
ZL_29	30	160	30	18,10
ZL_30	30	120	15	30,00
ZL_31	10	120	15	12,03



Διάγραμμα 10: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων των εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού.

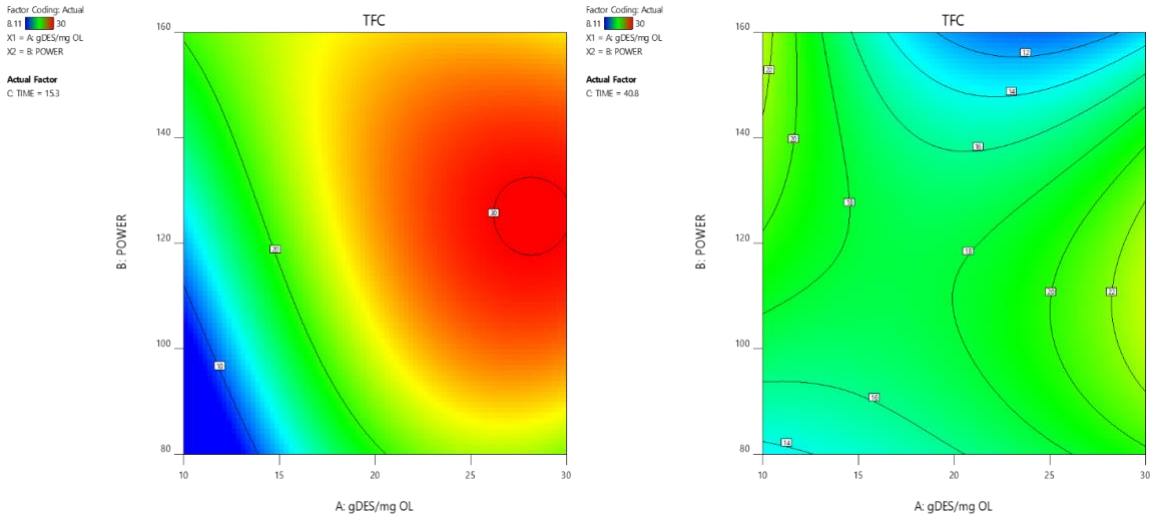
Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 20 και στο Διάγραμμα 10 φαίνεται ότι το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων είχε το εκχύλισμα με κωδικό πειράματος ZL_30 με τιμή 30,00 mg CAT/g, το οποίο εκχυλίστηκε υπό συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL), χρόνου εκχύλισης 15 min και ισχύος 30% (120 W). Αντίθετα, το χαμηλότερο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων είχαν τα εκχυλίσματα με κωδικό πειράματος ZL_19 και ZL_26 με τιμές 9,19 mg CAT/g και 8,11 mg CAT/g αντίστοιχα. Παρατηρείται, ότι τα εκχυλίσματα των πειραμάτων ZL_19 και ZL_26 παρουσιάζουν κοντινές τιμές παρ' όλα αυτά προέρχονται από εκχυλίσεις με αρκετά διαφορετικες πειραματικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, το ZL_19 πραγματοποιήθηκε με αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 20 (3 g NADES/ 0,15

g OL), ισχύ 40% (160 W) και χρόνο εκχύλισης 45 min, ενώ το ZL_26 με 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL), 20% (80 W) και 30 min αντίστοιχα.

Όσον αφορά την ισχύ, δεν φαίνεται να επηρεάζει δραματικά (σε ένα μεγάλο εύρος τιμών της) όταν μεταβάλλεται ο χρόνος ή η αναλογία διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, αναλύονται εκχυλίσματα που παρουσιάζουν ίδιες συνθηκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης και χρόνο εκχύλισης, αλλά μέγιστη ή ελάχιστη τιμή ισχύος. Τα εκχυλίσματα ZL_15, ZL_16 με ίδια τιμή αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 20 και χρόνο εκχύλισης 15 min, και τα ZL_24, ZL_26 με 10 και 30 min αντίστοιχα παρουσιάζουν αύξηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών με αύξηση της ισχύος. Αντίθετα, τα ZL_29, ZL_21 με ίδια τιμή αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 30 και χρόνο εκχύλισης 30 min, και τα ZL_19, ZL_23 με 20 και 45 min αντίστοιχα παρουσιάζουν μείωση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών με αύξηση της τιμής ισχύος. Η διαφορά στα παραπάνω εκχυλίσματα έγκειται στις συνθήκες εκχύλισης, αφού στα τέσσερα πρώτα (ZL_15, ZL_16, ZL_24, ZL_26) η αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης κυμαίνεται από υψηλές μέχρι μεσαίες τιμές, ενώ ο χρόνος εκχύλισης από μικρές μέχρι μεσαίες. Αντίθετα, στα τεσσερα τελευταία (ZL_29, ZL_21, ZL_19, ZL_23) ισχύουν οι αντίθετες τάσεις, δηλαδή μικρές μεχρι μεσαίες τιμές αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης, ενώ ο χρόνος εκχύλισης από μεσαίες μέχρι υψηλές. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από εκχύλιση με ισχύ 30% (120 W) σημειώνουν παρόμοιες τιμές ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, εκτός των ZL_30 και ZL_31, τα οποία έφεραν ως αποτέλεσμα 30,00 mg CAT/g και 12,03 mg CAT/g αντίστοιχα, δηλαδή την υψηλότερη τιμή και μία από τις χαμηλότερες.

Τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα έχουν ίδιες συνθήκες εκχύλισης όσον αφορά το χρόνο και την ισχύ, αλλά το πρώτο έχει τη ελάχιστη ποσότητα φύλλων ελιάς, ενώ το δεύτερο τη μέγιστη, κάτι που εδώ υποδεικνύει πόσο σημαντικά επιδρά η παράμετρος της αναλογίας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς στη διεργασία. Σε αντιπαράθεση με τα προηγούμενα, τα εκχυλίσματα ZL_17 και ZL_20 με ισχύ 30% (120 W), χρόνο εκχύλισης 45 min και αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL) και 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL) αντίστοιχα, παρουσιάζουν πολύ κοντινές τιμές TFC. Κατά συνέπεια η ισχύς δεν είναι η παράμετρος που από μόνη της διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο, αλλά ο συνδυασμός αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και ο χρόνος εκχύλισης. Αυτό το συμπέρασμα, στηρίζεται και οπτικοποιείται από τα Διαγράμματα 11 που δίνονται ενδεικτικά

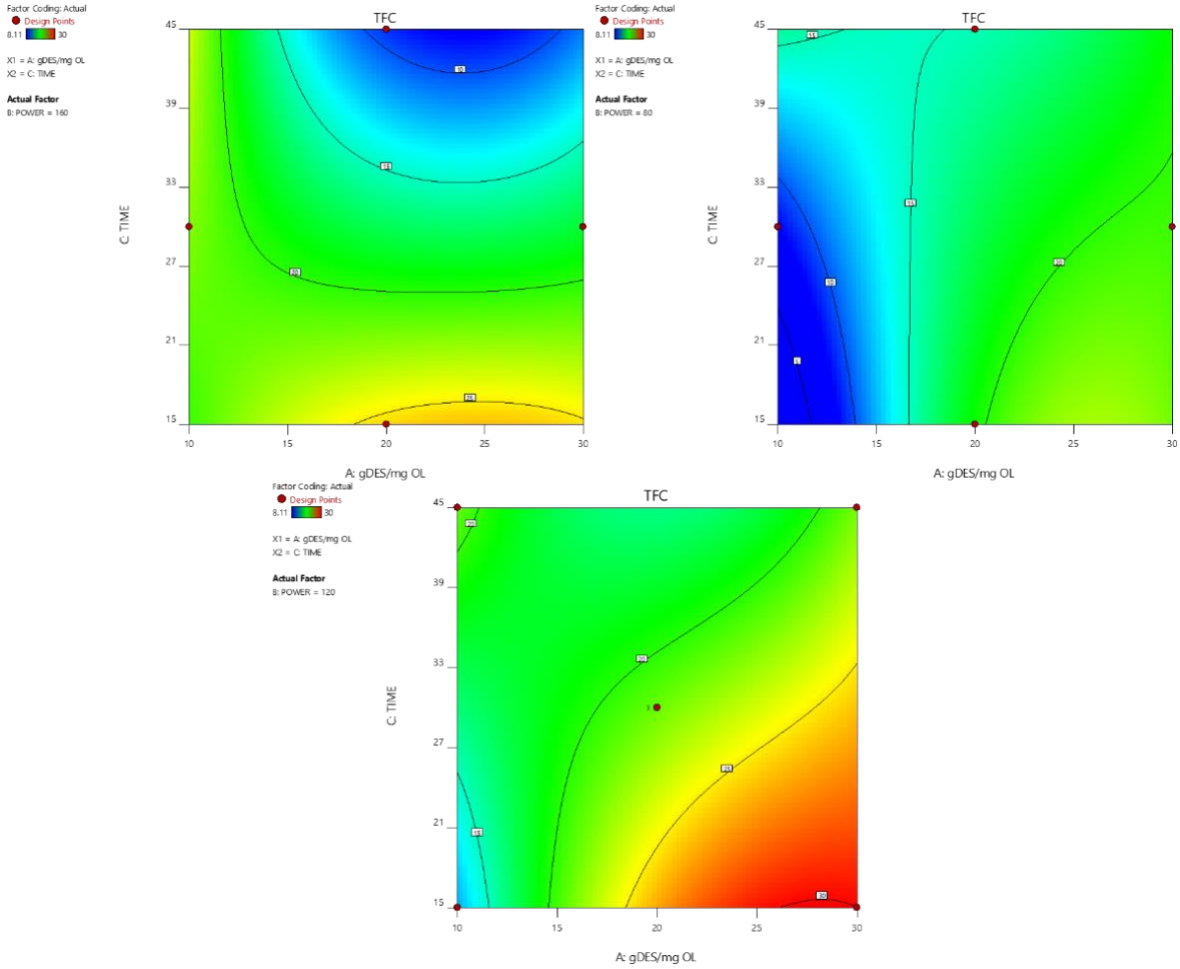
για τους χρόνους 15 και 41 min, που προκύπτουν από το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε από τον πειραματικό σχεδιασμό.



Διάγραμμα 11: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται στη τιμή C=15,3 min, ενώ δεξιά στη τιμή C=40,8 min.

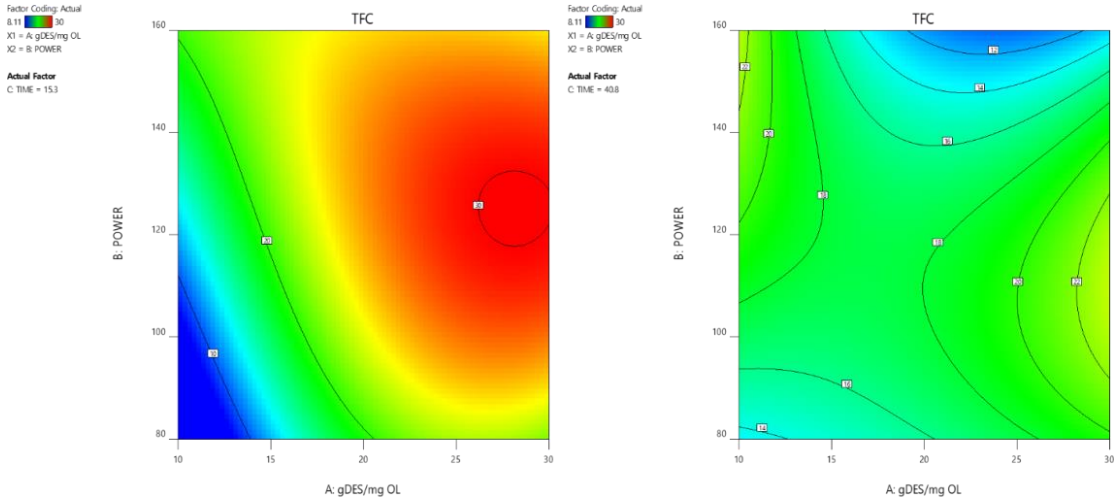
Σύμφωνα με τα Διαγράμματα 12 παρατηρείται πως σε υψηλότερους χρόνους εκχύλισης (41 min) η ισχύς δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως προς την παράμετρο TFC. Αντιθέτως, σε χαμηλότερους χρόνους φαίνεται πως ο ρόλος της ισχύος είναι σημαντικότερος συγκριτικά με τους υψηλότερους, όμως και πάλι αυτό συμβαίνει κυρίως στις υψηλότερες αναλογίες μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς.

Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, αν συγκριθούν τα εκχυλίσματα οι δυάδες εκχυλισμάτων που έχουν ίδιες συνθήκες εκχύλισης, εκτός του χρόνου, και συγκεκριμένα τον υψηλότερο και το χαμηλότερο χρόνο, παρατηρείται ότι με άυξησή του, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων μειώνεται στις περιπτώσεις των υψηλότερων τιμών ισχύος (160 W και 120 W) (διαγράμματα πάνω αριστερά και κάτω αντιστοίχως). Ενώ, για μεσαίους χρόνους εκχύλισης οι τιμές παρατηρείται να κυμαίνονται περίπου στο ίδιο εύρος.



Διάγραμμα 12: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Πάνω αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται σε τιμή B=160 W, πάνω δεξία αναφέρεται σε τιμή B=80 W και κάτω αναφέρεται σε τιμή B=120 W.

Αν τα εκχυλίσματα κατηγοριοποιηθούν βάσει της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς, δεν προκύπτει συγκεκριμένη τάση. Σε κάθε αναλογία, οι τιμές μεταβάλλονται και δεν κινούνται γύρω από μία τιμή. Ωστόσο, αν παρατηρηθούν τα εκχυλίσματα ανά δυάδες με ίδιες όλες τις συνθήκες εκχύλισης εκτός της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς, συμπεραίνεται ότι με μείωση των φύλλων ελιάς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων αυξάνεται, στην περίπτωση των εκχυλίσεων με μικρούς και μεσαίους χρόνους εκχύλισης (ZL_30 & ZL_31, ZL_21 & ZL_26), ενώ στα 45 λεπτά που ήταν και ο μέγιστος χρόνος μελέτης φαίνεται πως η παράμετρος δεν επιδρά σημαντικά (ZL_17 & ZL_20). Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και οπτικοποιείται στα Διαγράμματα 13, δηλαδή σε υψηλές αναλογίες μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς παρουσιάζεται σημαντική επίδραση για χαμηλούς χρόνους εκχύλισης, σε αντίθεση με τους υψηλούς.



Διάγραμμα 13: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων(TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται στη τιμή C=15,3 min, ενώ δεξιά στη τιμή C=40,8 min.

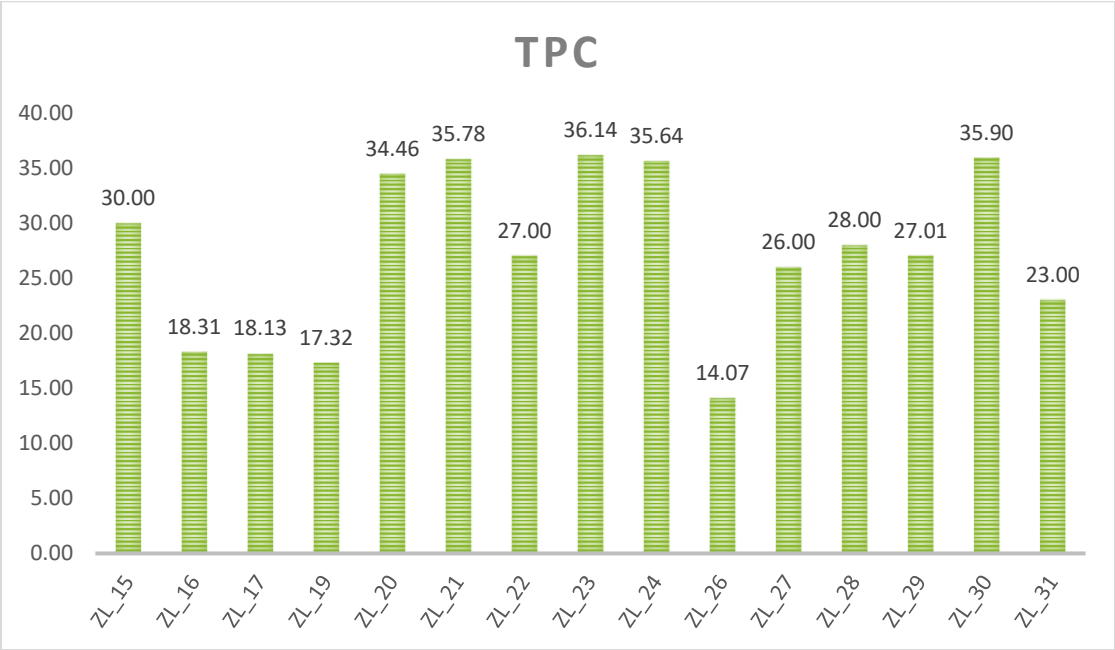
5.3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC)

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από ελήφθησαν από το χαρακτηρισμό εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών.

Πίνακας 21: Ποσοτικοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ)	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΜΑΖΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ** (g NADES/g OL)	**ΙΣΧΥΣ** (W)	**ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ** (min)	**ΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (Total Phenolic Content, TPC)** (mg GAL/g)
ZL_15	20	160	15	30,00
ZL_16	20	80	15	18,31
ZL_17	30	120	45	18,13
ZL_19	20	160	45	17,32
ZL_20	10	120	45	34,46
ZL_21	30	80	30	35,78
ZL_22	20	120	30	27,00
ZL_23	20	80	45	36,14
ZL_24	10	160	30	35,64
ZL_26	10	80	30	14,07
ZL_27	20	120	30	26,00

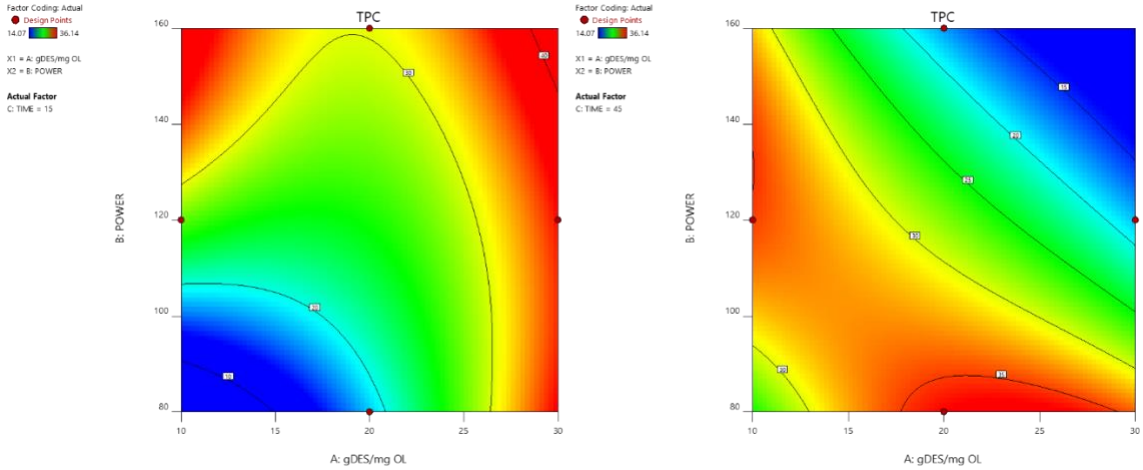
ZL_28	20	120	30	28,00
ZL_29	30	160	30	27,01
ZL_30	30	120	15	35,90
ZL_31	10	120	15	23,00



Διάγραμμα 14: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 21 και στο Διάγραμμα 14 φαίνεται ότι το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων είχε το εκχύλισμα με κωδικό πειράματος ZL_23 με τιμή 36,14 mg GAL/g, το οποίο εκχυλίστηκε υπό συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 20 (3 g NADES/ 0,15 g OL), χρόνου εκχύλισης 45 min και ισχύος 20% (80 W). Αντίθετα, το χαμηλότερο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων είχε το εκχύλισμα με κωδικό πειράματος ZL_26 με τιμή 14,07 mg GAL/g, με συνθήκες εκχύλισης 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL), ισχύ 20% (80 W) και χρόνο εκχύλισης 30 min.

Κατηγοριοποιώντας τα εκχυλίσματα βάσει της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και ισχύος, δεν φαίνεται να προκύπτει συγκεκριμένη τάση ως προς τα αποτελέσματα του ολικού περιεχομένου φαινολικών. Σε κάθε τιμή αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και ισχύος, οι τιμές του TPC μεταβάλλονται αρκετά κάτι που οτπικοποιείται και στα Διαγράμματα 15 για ακραίους χρόνους εκχύλισης, δηλαδή 15 και 45 min.

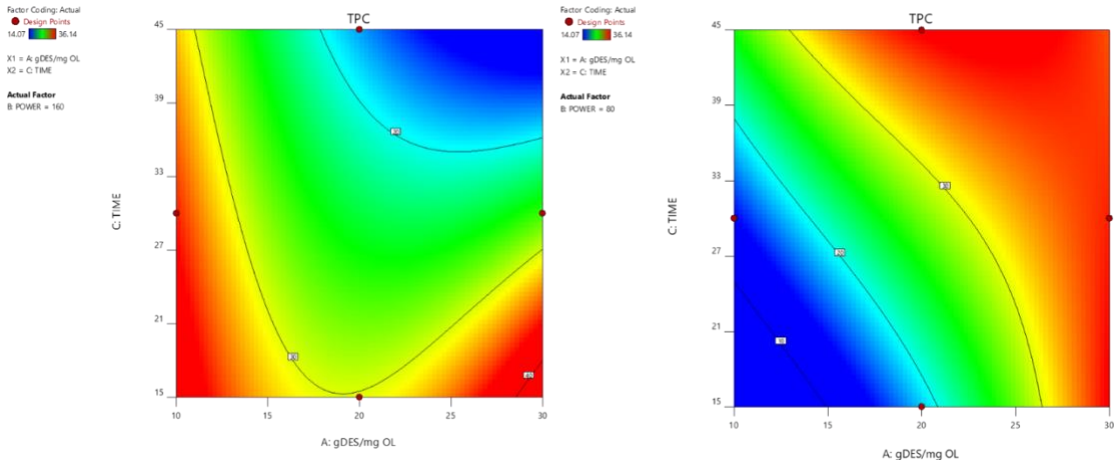


Διάγραμμα 15: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται στη τιμή C=15 min, ενώ δεξιά στη τιμή C=45 min.

Συνδυαστικά και με τις υπόλοιπες συνθήκες εκχύλισης, μπορούν να γίνουν κάποιες συγκρίσεις και να διεξαχθούν κάποια συμπεράσματα. Από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού, από τα εκχυλίσματα ZL_21 & ZL_26 και ZL_30 & ZL_31 φαίνεται ότι για χαμηλές (80 W, 15 min) και μεσαίες (120 W, 30 min) τιμές ισχυος και χρόνου εκχύλισης αντίστοιχα, η αύξηση των φύλλων ελιάς μειώνει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Αντιθέτως, από τα εκχυλίσματα ZL_17 & ZL_20 και ZL_29 & ZL_24, για μεσαίες (120 W, 30 min) και υψηλές (160 W, 45 min) τιμές ισχύος και χρόνου εκχύλισης, αντίστοιχα, η αύξηση των φύλλων ελιάς μειώνει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.

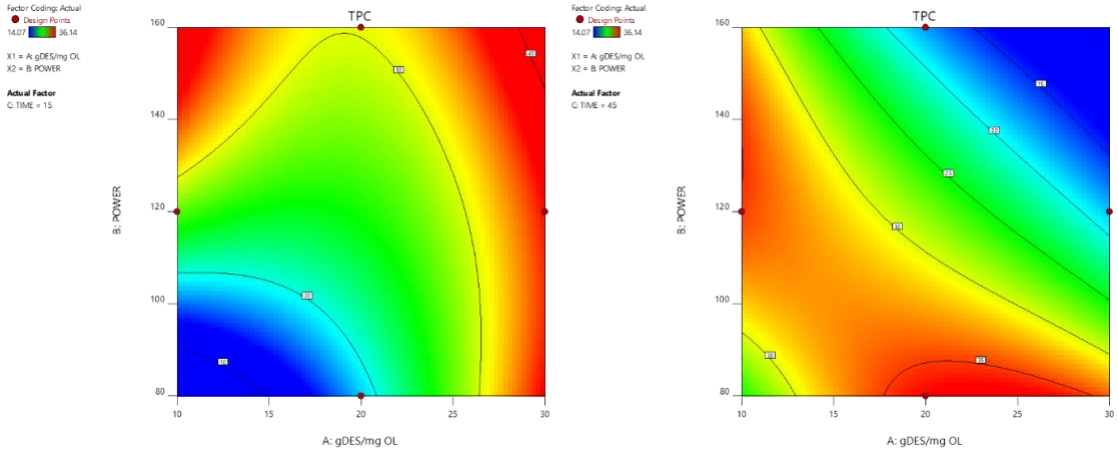
Για χρόνο εκχύλισης 30 min, οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων μεταβάλλονται αρκετά, με την υψηλότερη τιμή να είναι του ZL_21 με 35,78 mg GAL/g με συνθήκες εκχύλισης 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL) και ισχύ 20% (80 W) και με τη χαμηλότερη του ZL_26 με τιμή 14,07 mg GAL/g, με συνθήκες εκχύλισης 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL) και ισχύ 20% (80 W). Παρατηρώντας τα εκχυλίσματα ανά δύο, αυτά που έχουν ίδιες συνθήκες εκτός του χρόνου εκχύλισης, φαίνεται ότι σε υψηλές τιμές αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και σε υψηλές τιμές ισχύος (ZL_30 & ZL_17, ZL_15 & ZL_19), η μείωση του χρόνου εκχύλισης επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ενώ σε χαμηλές τιμές αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και σε χαμηλές τιμές

ισχύος, (ZL_31 & ZL_20, ZL_16 &ZL_23) συμβαίνει το αντίθετο, όπως χαρακτηριστικά οπτικοποιείται και από τα παρακάτω Διαγράμματα 16.



Διάγραμμα 16: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται στη τιμή B=160 W, ενώ δεξιά στη τιμή B=80 W.

Όσον αφορά την επίδραση της ισχύος, όπως και στον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, φαίνεται να μην σημειώνει σημαντικές μεταβολές ανεξάρτητη από τις άλλες συνθήκες εκχύλισης, αλλά συνδυαστικά με αυτές. Παρατηρώντας τα εκχυλίσματα ανά δύο, αυτά που έχουν ίδιες συνθήκες εκτός της ισχύος, φαίνεται ότι σε χαμηλές τιμές αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και σε χαμηλό χρόνο εκχύλισης (ZL_15 & ZL_16, ZL_24 & ZL_26), η μείωση της ισχύος επιδρά αρνητικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ενώ σε υψηλές τιμές αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και σε υψηλές τιμές χρόνου εκχύλισης, (ZL_29 & ZL_21, ZL_19 &ZL_23), συμβαίνει το αντίθετο, όπως χαρακτηριστικά οπτικοποιείται και από τα παρακάτω Διαγράμματα 17.



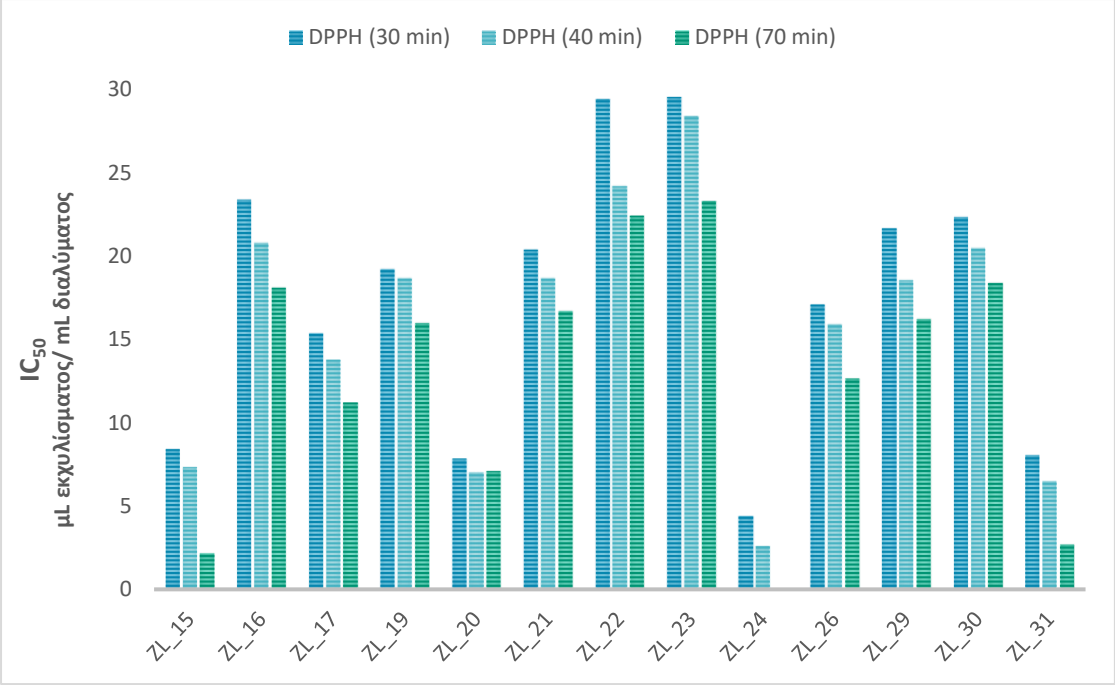
Διάγραμμα 17: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C όπως υποδείχθηκε από τη μελέτη. Αριστερά το διάγραμμα αναφέρεται στη τιμή C=15 min, ενώ δεξιά στη τιμή C=45 min.

5.3.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Μετά την πραγματοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης για κάθε εκχύλισμα που μελετήθηκε στον πειραματικό σχεδιασμό, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται συγκεντρωμένα στον Πίνακα 22 και Διάγραμμα 18. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικούς χρόνους επώασης, τα 30, 40 και 70 min, έτσι ώστε να γίνει και μία μελέτη της επίδρασης του χρόνου στην αναστολή της ρίζας.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ)	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΜΑΖΑΣ ΔΙΑΛΥΤΗ ΠΡΟΣ ΜΑΖΑ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ** (g NADES/g OL)	**ΙΣΧΥΣ** (W)	**ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ** (min)	**DPPH IC_{50}** (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	**DPPH IC_{50}** (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (40 min)	**DPPH IC_{50}** (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (70 min)
ZL_15	20	160	15	8,42	7,32	2,18
ZL_16	20	80	15	23,38	20,77	18,10
ZL_17	30	120	45	15,39	13,78	11,20
ZL_19	20	160	45	19,22	18,64	15,97
ZL_20	10	120	45	7,87	7,02	7,11
ZL_21	30	80	30	20,37	18,65	16,68
ZL_22	20	120	30	29,41	24,19	22,43
ZL_23	20	80	45	29,53	28,39	23,31
ZL_24	10	160	30	4,39	2,59	-
ZL_26	10	80	30	17,11	15,91	12,64
ZL_29	30	160	30	21,64	18,54	16,22
ZL_30	30	120	15	22,33	20,46	18,39
ZL_31	10	120	15	8,05	6,49	2,68



Διάγραμμα 18: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη αναστολής της ρίζας στα 30 πρώτα λεπτά, παρατηρείται ότι υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα ZL_24 με τιμή IC_{50} =4,39 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, το οποίο εκχυλίστηκε σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 10 (3 g DES/ 0,30 g OL), ισχύος 40% (160 W) και χρόνου εκχύλισης 30 min. Αξίζει να σημειωθούν τα αμέσως επόμενα τρία εκχυλίσματα που παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα υπόλοιπα, το εκχύλισμα ZL_20 με τιμή IC_{50} =7,87 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, το οποίο εκχυλίστηκε σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 10 (3 g DES/ 0,30 g OL), ισχύος 30% (120 W) και χρόνου εκχύλισης 15 min, το εκχύλισμα ZL_31 με τιμή IC_{50} =8,05 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 10 (3 g DES/ 0,30 g OL), ισχύος 30% (120 W) και χρόνου εκχύλισης 15 min, καθώς και το εκχύλισμα ZL_15 με τιμή IC_{50} =8,42 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 20 (3 g DES/ 0,15 g OL), ισχύος 40% (160 W) και χρόνου εκχύλισης 15 min. Αντίθετα, την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα εκχυλίσματα ZL_22 και ZL_23 με τιμές IC_{50} 29,53 και 29,41 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος αντίστοιχα, τα οποία εκχυλίστηκαν σε συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 20 και 10, ισχύος 20% (80 W) και 40 %(160 W) και χρόνου εκχύλισης 45 και 30 min, αντίστοιχα.

Έπειτα από παρατήρηση των αποτελεσμάτων που διεξήχθησαν από αυτή τη μελέτη, πραγματοποιείται μία σύντομη μελέτη ζευγών εκχυλίσεων, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο που κάθε παράμετρος επηρεάζει την αντιοξειδωτική δραστικότητα των εκχυλισμάτων.

Όσον αφορά την επίδραση της ισχύος στην αντιοξειδωτική δράση, παρατηρείται από τα ζεύγη πειραμάτων, συγκεκριμένα ZL_15 & ZL_16, ZL_19 & ZL_23, ZL_21 & ZL_29 και ZL_24 & ZL_26, ότι η αύξηση της ισχύος προκαλεί μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, αν χωριστούν τα εκχυλίσματα αναλόγως την τιμή ισχύος στην οποία εκχυλίστηκαν, παρατηρείται συγκεκριμένη συμπεριφορά μόνο για την τιμή 20% (80 W), όπου οι τιμές IC_{50} είναι αρκετά υψηλές, συνεπώς αυτά είναι τα εκχυλίσματα με την χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ για τις άλλες δύο τιμές ισχύος τα αποτελέσματα ποικίλουν. Το συμπέρασμα που θα μπορούσε να προκύψει από αυτή την παρατήρηση είναι πως σε χαμηλές τιμές ισχύος δεν εκχυλίζεται σημαντική ποσότητα αντιοξειδωτικών ενώσεων συγκριτικά με τις εκχυλίσεις σε υψηλότερες τιμές ισχύος και κατά συνέπεια τα εκχυλίσματα που προκύπτουν είναι χαμηλότερης αντιοξειδωτικής δραστικότητας.

Όσον αφορά στην επίδραση του χρόνου εκχύλισης, παρατηρώντας τα ζεύγη πειραμάτων συμπεραίνονται τα εξής: όταν η ισχύς είναι υψηλή (160 W), προτιμότεροι είναι οι υψηλοί χρόνοι εκχύλισης, καθώς φαίνεται πως τα εκχυλίσματα διαθέτουν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (ZL_15 & ZL_19). Στις μεσαίες και χαμηλές τιμές ισχύος οι διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση δεν είναι τόσο σημαντικές (ZL_16 & ZL_23, ZL_17 & ZL_30 και ZL_20 & ZL_31)

Όσον αφορά στην επίδραση της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς, συμπεραίνεται ότι με μείωση της αναλογίας αυτής, δηλαδή αύξηση της μάζας φύλλων ελιάς, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται (ZL_17 & ZL_20, ZL_21 & ZL_26, ZL_24 & ZL_29 και ZL_30 & ZL_31). Το γεγονός ότι τα πειράματα ZL_15 έχει χαμηλότερη αναλογία αλλά παρουσιάζει χαμηλότερη τιμή IC_{50}, πιθανόν οφείλεται στη συνεργιστική επίδρασης της ισχύος στη διεργασία της εκχύλισης.

Τέλος, από μία πιο συνολική μελέτη της επίδρασης του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPHτων δειγμάτων (30, 40 και 70 min) στην αντιοξειδωτική δράση, είναι εμφανές πως, η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα

DPPH. Αυτό είναι άξιο περαιτέρω διερεύνησης και συζήτησης καθώς αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποτελεί ένδειξη του ότι ο φυσικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε λειτουργεί ταυτόχρονα εκτός από εκχυλιστικό και ως προστατευτικό μέσο για τις εκχυλιζόμενες ενώσεις και κατά συνέπεια απαιτείται περισσότερος χρόνος, ώστε οι εκχυλιζόμενες ενώσεις να «ελευθερωθούν», να έρθουν σε επαφή και να δεσμεύσουν τη ρίζα του DPPH.

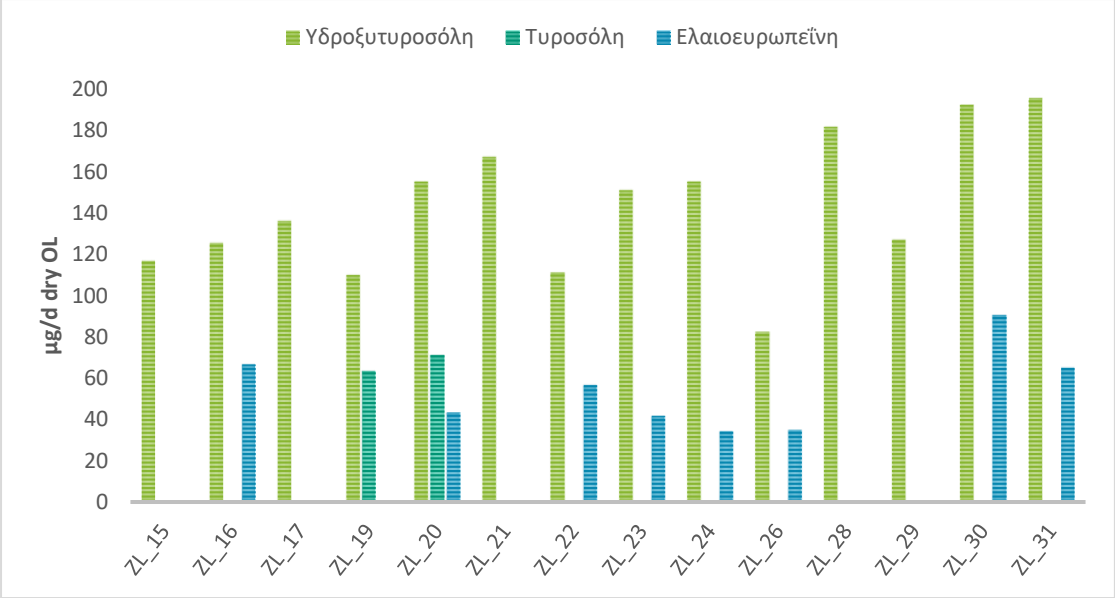
5.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LC-MS

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προήλθαν από την ανάλυση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς (olive leaves, OL) με τη μέθοδο HPLC-MS. Σε κάθε ένα εκχύλισμα του πειραματικού σχεδιασμού, ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις υδροξυτυροσόλη, ελαιοευρωπεΐνη και τυροσόλη.

Πίνακας 23: Ποσοτικοποίηση υδροξυτυροσόλης, ελαιοευρωπεΐνης και τυροσόλης στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού με τη μέθοδο HPLC-MS.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ (Κωδικός πειράματος)	**ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ** (Αναλογία NADES/OL, Ισχύς, Χρόνος εκχύλισης)	**ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ**		**ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗ**		**ΤΥΡΟΣΟΛΗ**	
		(μg HT/g dry OL)	StDev	(μg ole/g dry OL)	StDev	(μg Tyr/g dry OL)	StDev
ZL_15	0 + -	116,63	1,35	ND	-	ND	-
ZL_16	0 - -	125,50	0,54	66,52	2,40	ND	-
ZL_17	+ 0 +	136,05	1,45	ND	ND	ND	-
ZL_19	0 + +	109,97	0,43	ND	ND	63,46	3,80
ZL_20	- 0 +	155,39	6,95	43,43	0,91	71,09	0,97
ZL_21	+ - 0	167,12	0,81	ND	ND	ND	-
ZL_22	0 0 0	111,38	0,70	56,50	0,83	ND	-
ZL_23	0 - +	151,17	0,97	41,79	1,24	ND	-
ZL_24	- + 0	155,16	1,02	34,46	0,83	ND	-
ZL_26	- - 0	82,40	1,40	35,08	0,95	ND	-
ZL_28	0 0 0	181,63	2,91	ND	ND	ND	-
ZL_29	+ + 0	127,03	3,07	ND	ND	ND	-
ZL_30	+ 0 -	192,54	5,25	90,64	1,12	ND	-
ZL_31	- 0 -	195,72	3,77	65,00	1,08	ND	-

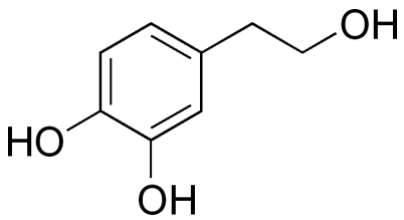
*ND: Not Determined



Διάγραμμα 19: Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων υδροξυτυροσόλης, ελαιοευρωπεΐνης και τυροσόλης με τη μέθοδο HPLC-MS.

5.4.1 ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ

Η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύεται σε όλα τα εκχυλίσματα. Οι υψηλότερες τιμές που ανιχνεύθηκαν είναι 195,72 μg HT/g dry OL του εκχυλίσματος ZL_31 με συνθήκες εκχύλισης αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL), χρόνο εκχύλισης 15 min και ισχύ 30% (120 W) και 192,54 μg HT/g dry OL του ZL_30, με συνθήκες εκχύλισης αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL), χρόνο εκχύλισης 15 min και ισχύ 30% (120 W). Τη χαμηλότερη τιμή υδροξυτυροσόλης σημειώνει το εκχύλισμα ZL_26 με 82,40 μg HT/g dry OL, με συνθήκες εκχύλισης αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL), χρόνο εκχύλισης 30 min και ισχύ 20% (80 W). Από αυτή την αρχική σύγκριση, παρατηρείται ότι η ισχύς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ποσότητα της υδροξυτυροσόλης που ανιχνεύεται στα εκχυλίσματα, ενώ ο χρόνος εκχύλισης δεν επιδρά σημαντικά.



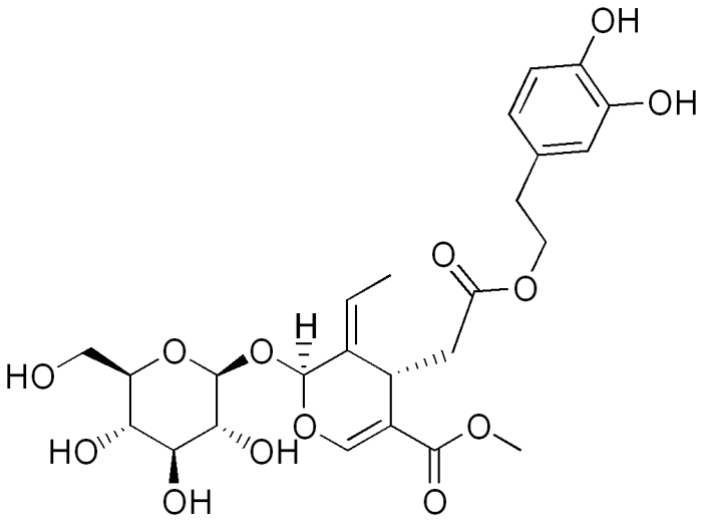
Σχήμα 9: Χημικός τύπος υδροξυτυροσόλης.

Στην κατηγορία εκχυλισμάτων με αναλογία διαλύτη προς πρώτη ύλη 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL) ανήκουν αυτά με την υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή υδροξυτυροσόλης, με τα υπόλοιπα να παρουσιάζουν τιμές που κυμαίνονται γύρω από το μέσο όρο, δηλαδή περίπου 155 μg HT/g dry OL, ενώ τα δείγματα με αναλογία 20 (3 g NADES/ 0,15 g OL) σημειώνουν τις χαμηλότερες τιμές, με υψηλότερη αυτή του ZL_28, 181,63 μg HT/g dry OL. Στα εκχυλίσματα με αναλογία διαλύτη προς πρώτη ύλη 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL), ανιχνεύεται αρκετά μεγάλη ποσότητα υδροξυτυροσόλης, με το δείγμα ZL_30 να παρουσιάζει τη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή, 192,54 μg HT/g dry OL.

Τα εκχυλίσματα με χρόνο εκχύλισης 15 min και 30 min παρουσιάζουν ποικιλία τιμών, ωστόσο σε αυτές τις συνθήκες ανήκουν τα εκχυλίσματα με τις υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές, ενώ αυτά με χρόνο εκχύλισης 45 min σημειώνουν μεσαίες τιμές υδροξυτυροσόλης. Τελικά, συνδυασμός παραγόντων επιδρά στην υδροξυτυροσόλη που εκχυλίζεται, ειδικά ο χρόνος εκχύλισης συνεργιστικά με την ισχύ, αφού οι τιμές της δεν φαίνεται να ακολουθούν κάποιο μοτίβο αποκλειστικά βάσει ενός παράγοντα.

5.4.2 ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΕΪΝΗ

Η ελαιοευρωπεΐνη φαίνεται να μην ανιχνεύεται σε αρκετά από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, (ZL_15, ZL_17, ZL_21, ZL_28, ZL_29), κυρίως σε αυτά που είχαν 30 αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης και 30 min χρόνο εκχύλισης, με την ισχύ να μεταβάλλεται αρκετά. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η ελαιοευρωπεΐνη υδρολύεται σε υδροξυτυροσόλη, επομένως η απουσία ποσότητας στα εκχυλίσματα μπορεί να σημαίνει ότι έχει ήδη υδρολυθεί.[47]



Σχήμα 10: Χημικός τύπος ελαιοευρωπεΐνης.

Χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη παρουσιάζει το εκχύλισμα με κωδικό ZL_24, 34,46 μg ole/g dry OL που είχε τη μέγιστη ποσότητα πρώτης ύλης και ισχύ, με μεσαίο χρόνο εκχύλισης. Αντιθέτως, υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη παρουσιάζει το δείγμα ZL_30, 90,64 μg ole/g dry OL, με την ελάχιστη ποσότητα πρώτης ύλης, ελάχιστο χρόνο εκχύλισης και μεσαία τιμή ισχύος.

Τα εκχυλίσματα με αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 10 (3 g NADES/ 0,30 g OL) εμφανίζουν πολύ χαμηλές τιμές ελαιοευρωπεΐνης, ενώ αυτά με αναλογία 20 (3 g NADES/ 0,150 g OL) σημειώνουν μία αύξηση στα αποτελέσματα. Σε αρκετά εκχυλίσματα δεν ανιχνεύεται ελαιοευρωπεΐνη, ειδικά σε αυτά που ανήκουν στην κατηγορία εκχυλισμάτων που εκχυλίστηκαν με αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζας πρώτης ύλης 30 (3 g NADES/ 0,10 g OL) (ZL_17, ZL_21, ZL_29), ωστόσο σε αυτή την κατηγορία ανήκει και το εκχύλισμα με την υψηλότερη τιμή ελαιοευρωπεΐνης (ZL_30). Συνεπως, φαίνεται ότι οι τιμές ελαιοευρωπεΐνης δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένη τάση όσον αφορά την αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης.

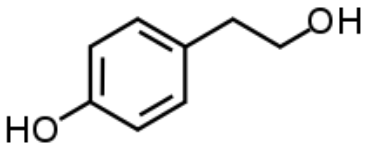
Τα εκχυλίσματα με χρόνο εκχύλισης 15 min παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές ελαιοευρωπεΐνης, με υψηλότερη του ZL_30 και το αμέσως επόμενο ZL_16 με τιμές 90,64 μg ole/g dry OL και 66,52 μg ole/g dry OL, αντίστοιχα, ενώ τα εκχυλίσματα με χρόνο εκχύλισης 30 min και 45 min τις χαμηλότερες τιμές ελαιοευρωπεΐνης, ενώ σε αρκετά δεν είναι ανιχνεύσιμη (ZL_17, ZL_19, ZL_21, ZL_28, ZL_29). Συνεπώς, ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης είναι τα 15 min.

Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από εκχύλιση με τιμή ισχύος 40% (160 W) και 20% (80 W) παρατηρούνται οι χαμηλότερες τιμές ελαιοευρωπεΐνης, ενώ σε κάποια δεν ανιχνεύεται (ZL_15, ZL_19, ZL_21, ZL_29). Αντίθετα, σε συνθήκες εκχύλισης 30% (120 W) σημειώνονται οι υψηλότερες τιμές (ZL_30, ZL_31), έτσι συμπεραίνεται ότι η βέλτιστη συνθήκη είναι στο εύρος 120 W με 160 W.

Από την ανάλυση ANOVA που διεξήχθη, φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα που δεν διαφέρουν μεταξύ τους είναι τα ζευγάρια ZL_16 & ZL_31, ZL_20 & ZL_21, ZL_24 & ZL_26. Αυτά τα ζευγάρια εκχυλισμάτων παρουσιάζουν ένα κοινό στις συνθήκες εκχύλισης, συγκεκριμένα το χρόνο εκχύλισης, συνεπώς αυτός φαίνεται να επιδρά περισσότερο στο τελικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, συνδυασμός παραμέτρων οδηγούν στο βέλτιστο αποτέλεσμα.

5.4.3 ΤΥΡΟΣΟΛΗ

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω διαπιστώνεται ότι η τυροσόλη ανιχνεύθηκε σε ελάχιστα εκχυλίσματα, συγκεκριμένα σε αυτά με κωδικό πειράματος ZL_19 και ZL_20. Καθώς η τυροσόλη εμφανίζεται σε ελάχιστα εκχυλίσματα δεν είναι δυνατό να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε αρκετά εκχυλίσματα δεν έχει δοθεί τιμή της τυροσόλης, καθώς αυτή ανιχνευόταν, αλλά δεν ήταν δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί, γιατί δεν εμφάνιζε ακριβώς κορυφή.



Σχήμα 11: Χημικός τύπος τυροσόλης.

5.5 ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας επιλέχθηκε ενδεικτικά το βέλτιστο εκχύλισμα που προέκυψε από την μελέτη του πειραματικού σχεδιασμού (ZL_20), το οποίο εκχυλίστηκε υπό συνθήκες αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης 10, χρόνο εκχύλισης 45 min και ισχύ 30% (120 W). Στο εκχύλισμα μετρήθηκε ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων 21,00 mg GAL/g, ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων 34,46 mg CAT/g, ποσότητα υδροξυτυροσόλης 160,30 μg HT/g OL, ελαιοευρωπεΐνης 44,07 μg ole/g OL.

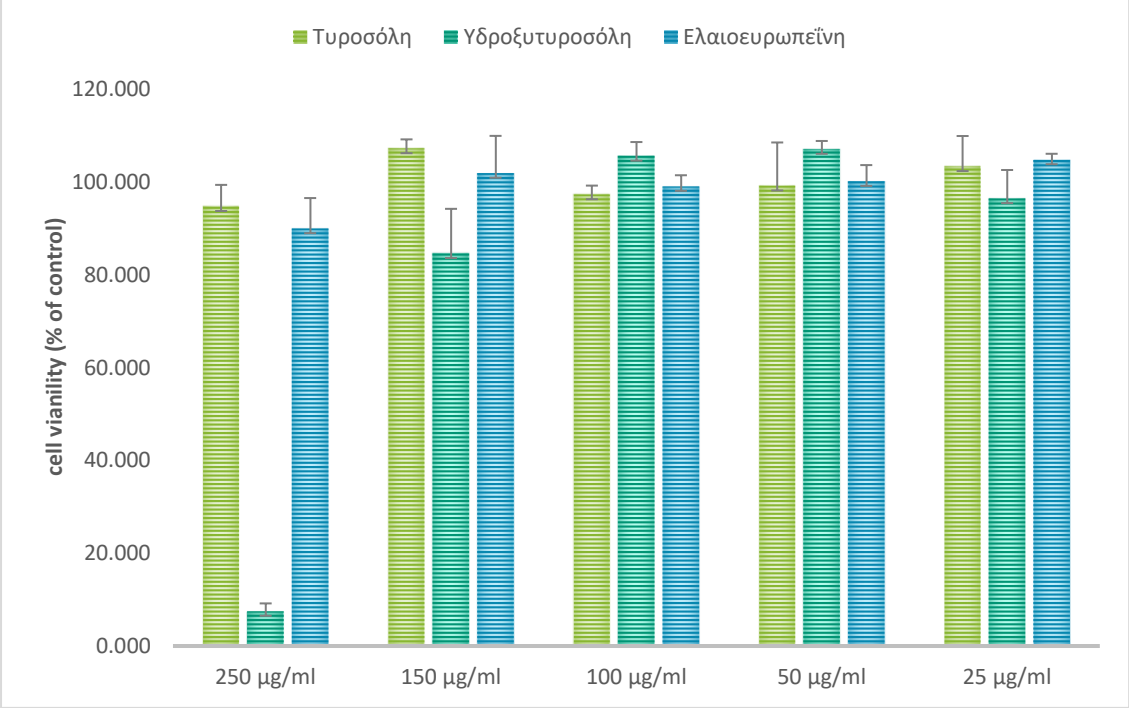
Επιπλέον, μελετήθηκαν οι πρότυπες ενώσεις, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και ελαιοευρωπεΐνη, οι οποίες και προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε όλα τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού. Ο διαλύτης που μελετάται είναι ο φυσικά βαθέως ευτηκτικός διαλύτης D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, ο οποίος θεωρήθηκε καταλληλότερος για τη διεργασία εκχύλισης.

Αρχικά, για μία πρώτη ποιοτική ανάλυση, παρατίθεται ενδεικτικά η εικόνα του πλακιδίου 96-θέσεων, πριν την τελευταία προσθήκη του DMSO για τη διαλυτοποίηση της φορμαζάνης.

Εικόνα 13: : Πλακίδιο 96-θέσεων πριν την προσθήκη DMSO.

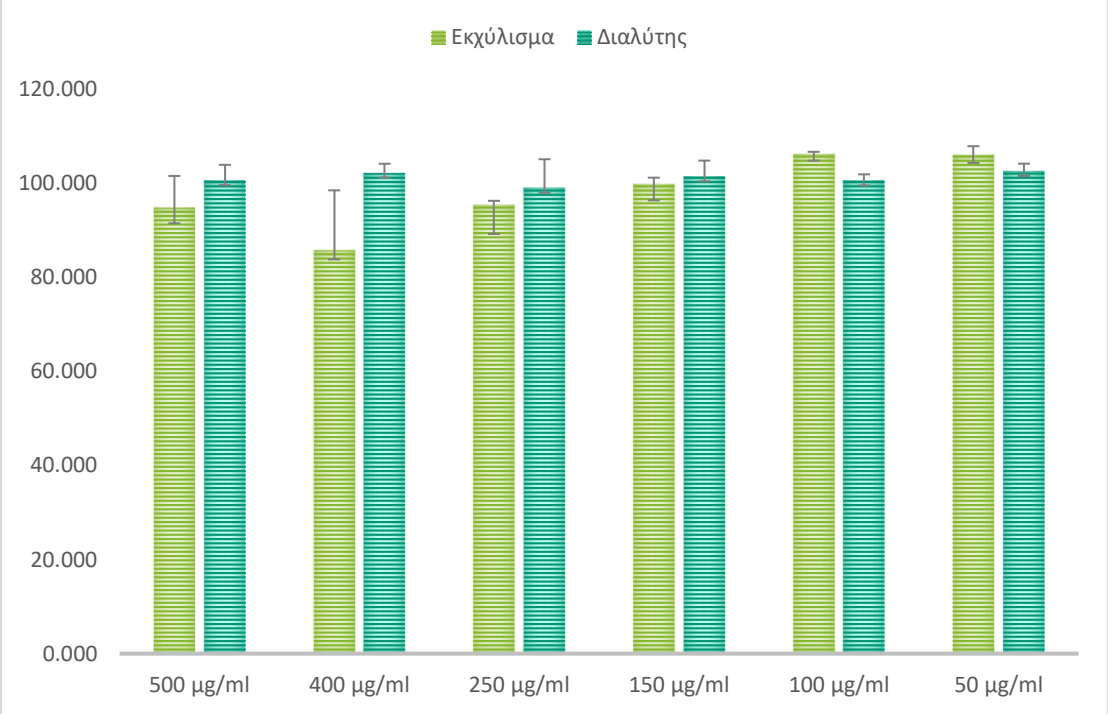
Στην εικόνα φαίνονται οι κρύσταλλοι φορμαζάνης, η πυκνότητα των οποίων είναι ενδεικτική για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Παρατηρείται, ότι μεγάλο μέρος των κυττάρων είναι ζωντανό, ενώ πολύ λίγα είναι τα πηγάδια όπου δεν έχει απομείνει κανένα ζωντανό κύτταρο. Φαίνεται ότι σε αρκετά πηγάδια υπάρχουν μεγάλα κενά που δεν παρουσιάζουν κύτταρα, ενώ στα πηγάδια A1,B1,C1 δεν ανιχνεύεται με το μάτι σχεδόν κανένα ζωντανό. Αυτές οι παρατηρήσεις θα επιβεβαιωθούν παρακάτω, βάσει των υπολογισμών βιωσιμότητας.

Στα Διαγράμματα 20 και 21 παρουσιάζονται τα συνολικά ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων για κάθε μία καθαρή ένωση, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελαιοευρωπεΐνη, για το εκχύλισμα και για το διαλύτη.



Διάγραμμα 20: Ποσοστά βιωσιμότητας υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 υπό την επίδραση της υδροξυτυροσόλης, της ελαιοευρωπεΐνης και της τυροσόλης.

Στο Διάγραμμα 20 παρουσιάζονται συνολικά τα ποσοστά βιωσιμότητας των υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3, αφού έχουν επωαστεί με τις ενώσεις υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και ελαιοευρωπεΐνη. Στις συγκέντρωσεις 100, 50 και 25 μg/ml δεν παρατηρείται επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, αφού για όλες τις ενώσεις είναι κοντά στο 100% με πολύ μικρές αποκλίσεις. Στη συγκέντρωση 150 μg/ml, παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας της τάξης του 15%, αλλά μόνο για την υδροξυτυροσόλη, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις δεν φαίνεται να επιδρούν στα κύτταρα. Στη συγκέντρωση 250 μg/ml, φαίνεται ότι η τυροσόλη και η ελαιοευρωπεΐνη προκαλούν μικρή μείωση της βιωσιμότητας κατά 5% και 10% αντίστοιχα, ενώ η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει πολύ σημαντική μείωση με τελική τιμή βιωσιμότητας των κυττάρων μόλις 8%. Συνεπώς, η πιο αξιοσημείωτη επίδραση κυτταροτοξικότητας στους υγιείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικιού 3T3 είναι αυτή της υδροξυτυροσόλης στην υψηλότερή της συγκέντρωση, με τις υπόλοιπες ενώσεις να μην επιδρούν στα υγιή κύτταρα.



Διάγραμμα 21: Ποσοστά βιωσιμότητας υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος και του διαλύτη.

Στο Διάγραμμα 21 παρουσιάζονται συνολικά τα ποσοστά βιωσιμότητας των υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3. Στις συγκέντρωσεις 150, 100 και 50 μg/ml δεν παρατηρείται καμία κυτταροτοξική συμπεριφορά είτε του εκχυλίσματος, είτε του διαλύτη ως προς τα υγιή κύτταρα, αφού το ποσοστό βιωσιμότητας είναι στο 100%. Στις συγκεντρώσεις 250 μg/ml και 500 μg/ml, το εκχύλισμα φαίνεται να μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά ένα μικρό ποσοστό (5%), ενώ στη συγκέντρωση 400 μg/ml σημειώνεται σημαντική μείωση της τάξης του 20%. Αντίθετα, ο διαλύτης διατηρεί τη μη κυτταροτοξική του συμπεριφορά, ακόμη και στις υψηλές συγκεντρώσεις, σημειώνοντας ποσοστό βιωσιμότητας 100%. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη μέγιστη συγκέντρωση του εκχυλίσματος περιέχονται 19,41 μg/ml υδροξυτυροσόλης και 5,43 μg/ml ελαιοευρωπεΐνης, κάτι που υποδεικνύει ότι πιθανόν η κυτταροτοξικότητά του εκχυλίσματος στις συγκεντρώσεις 400,500 μg/ml να μην οφείλεται σε αυτές τις ενώσεις, εφ' όσον αυτές βρίσκονται κάτω από το όριο που διερευνήθηκε, όπου και φάνηκαν μη κυτταροτοξικές. Εν ολίγοις, το εκχύλισμα φαίνεται να μειώνει τη βιωσιμότητα των υγιών εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικιού 3T3 σε μικρό ποσοστό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 250 μg/ml, ενώ ο διαλύτης που έχει επιλεχθεί φαίνεται να μην είναι καθόλου τοξικός.

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση, χαρακτηρισμός και σύγκριση των επτά φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NADES) Βεταΐνη:D,L- Γαλακτικό οξύ, L-Προλίνη:D,L-Γαλακτικό οξύ, β-Αλανίνη:D,L- Γαλακτικό οξύ, L-Προλίνη:Οξαλικό οξύ, Βεταΐνη:Λεβουλινικό οξύ, D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ και Βεταΐνη:Γλυκερόλη. Οι επτά διαλύτες μελετήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα για τις βιοδραστικές ενώσεις από τα φύλλα της ελιάς ποικιλίας Καλαμών και επιλέχθηκε ως καταλληλότερος από αυτούς για περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση της διεργασίας ο διαλύτης D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ.

Η διεργασία βελτιστοποιήθηκε με χρήση πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken. Τα 15 εκχυλίσματα που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό, χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και φαινολικών ενώσεων, καθώς επίσης μετρήθηκε η περιεκτικότητα ελαιοευρωπεΐνης, τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στα εκχυλίσματα με τη μέθοδο HPLC-MS. Επιπλέον, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH και πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPHστα αποτελέσματα της μεθόδου. Τέλος, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα του βέλτιστου εκχυλίσματος, από τον πειραματικό σχεδιασμο, του διαλύτη εκχύλισης D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, της ελαιοευρωπεΐνης, της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης με τη δοκιμασία MTT.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής οδήγησαν σε σημαντικές παρατηρήσεις και συμπεράσματα. Συνοπτικά:

- Συντέθηκαν επτά NADES από ασφαλείς και φιλικές προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο πρώτες ύλες. Οι NADES χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), όπου και διαπιστώθηκε η σύνθεσή τους βάσει της απουσίας εμφάνισης του πιο αποπροστατευμένου πρωτονίου των οξέων.
- Μετά τη διερεύνηση των NADES ως εκχυλιστικών μέσων προσδιορίστηκε ο καταλληλότερος διαλύτης με τον οποίο το εκχύλισμα έδωσε τις υψηλότερες τιμές ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσων, την περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη, σε τυροσόλη και σε υδροξυτυροσόλη, ο οποίος είναι ο NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ. Το εκχύλισμα με αυτόν τον διαλύτη παρουσίασε το υψηλότερο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη. Ο διαλύτης επιλέχθηκε, επίσης, βάσει της εύκολης διαχείρισής του ως προς το ιξώδες, το χρόνο παρασκευής του, αλλά και το κόστος των πρώτων υλών.

- Με τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken προέκυψαν δύο μοντέλα που περιγράφουν ικανοποιητικά το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Σε κάθε μοντέλο, η συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο με τις πραγματικές τιμές, είναι πολύ καλή. Τελικά, προέκυψαν εξισώσεις για την περιγραφή κάθε απόκρισης.
- Πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των τιμών TPC και TFC με βέλτιστες τιμές παραμέτρων να είναι για το χρόνο εκχύλισης 15,25 min, για την αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς 29,86 g DES/g OL, για την ισχύ 126,89 W και με βέλτιστες τιμές αποκρίσεων TFC 30,08 mg CAT/g και TPC 36,39 mg GAL/g.
- Από τα 3D διαγράμματα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, προέκυψε ότι ο χρόνος εκχύλισης δεν είναι ο παράγοντας που επιδρά πιο σημαντικά στη διεργασία συγκριτικά με τους άλλους δύο υπό εξέταση παράγοντες. Παρατηρείται πως με ταυτόχρονη αύξηση της αναλογίας μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς και ισχύος, λαμβάνεται η μέγιστη τιμή TFC και TPC.
- Το μοντέλο που προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό επιβεβαιώθηκε με τη χρήση ενός επιπλέον πειράματος ελέγχου, του οποίου οι τιμές TFC και TPC ήταν εντός επιτρεπτών ορίων, άρα το μοντέλο κρίνεται σημαντικό.
- Διεξήχθη ένα ακόμη πείραμα με χρήση διαφορετικής ποικιλίας ελιάς Αμφίσσης, έναντι της Καλαμών και διαπιστώθηκε ότι η τιμή TPC ήταν εντός ορίων, ενώ η τιμή TFC όχι, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάθε ποικιλία ελιάς, πιθανό, απαιτεί διαφορετικό πειραματικό σχεδιασμό για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των επιθυμητών βιοδραστικών ενώσεων.
- Από τη μελέτη του DPPH συμπεραίνεται ότι οι παράμετροι επιδρούν συνεργιστικά και δεν ξεχωρίζει κάποια, ενώ από τη μελέτη επίδρασης του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPHφαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH. Αυτή αποτελεί μία σημαντική πρώτη ένδειξη πως ο διαλύτης δρα προστατευτικά για τις εκχυλιζόμενες ενώσεις και γι' αυτό το λόγο στα πρώτα λεπτά του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPHδεν παρουσιάζεται σημαντική αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH. Με την πάροδο του χρόνου τα εκχυλισμένα βιοδραστικά μόρια απελευθερώνονται από το πλέγμα δεσμών υδρογόνου του NADES και η αλληλεπίδραση με το DPPH είναι ισχυρότερη.
- Βάσει της αξιολόγησης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC-MS ως προς την ελαιοευρωπεΐνη, την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη προέκυψε ότι στην

ελαιοευρωπεΐνη οι παράμετροι λειτουργούν συνδυαστικά, ώστε να διακριθεί το εκχύλισμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αυτή, στην τυροσόλη δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα λόγω μη ποσοτικοποίησής της στα περισσότερα εκχυλίσματα, ενώ στην υδροξυτυροσόλη η ισχύς των υπερήχων φαίνεται να επιδρά σημαντικά σε αντίθεση με το χρόνο εκχύλισης και την αναλογία μάζας διαλύτη προς μάζα φύλλων ελιάς.

- Από τη μελέτη κυτταροτοξικότητας ως προς υγιείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικιού 3T3 του εκχυλίσματος, του διαλύτη D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ, της ελαιοευρωπεΐνης, της τυροσόλης και της υδροξυτυρσόλης προκύπτει ότι η υδροξυτυροσόλη μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε συγκέντρωσεις 250 μg/ml και 150 μg/ml κατά 92% και 20% αντίστοιχα, η ελαιοευρωπεΐνη και η τυροσόλη κατά 5-10%, το εκχύλισμα κατά 5% σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 250 μg/ml, ενώ ο διαλύτης δεν παρουσιάζει καθόλου κυτταροτοξική συμπεριφορά. Συμπεραίνεται, επομένως, ότι το εκχύλισμα φύλλων ελιάς με τον NADES D-γλυκόζη:D,L-γαλακτικό οξύ είναι μη κυτταροτοξικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια ως συστατικό σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα σε συγκεντρώσεις έως 250 μg/ml.

7 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από την παραπάνω μελέτη διαφαίνεται ότι υπάρχουν ενδιαφέρουσες εναλλακτικές προοπτικές στην εκχύλιση φύλλων ελιάς με χρήση υπερήχων και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα οδηγούν σε νέα ερευνητικά μονοπάτια, προτείνονται λοιπόν παρακάτω κάποιες δυνατότητες συνέχισης και εξέλιξης της έρευνας στον τομέα αυτό.

1. Η δοκιμή διαφορετικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης, ώστε να αναδειχθούν νέα ικανά NADES ως εκχυλιστικά μέσα των βιοδραστικών ενώσεων των φύλλων ελιάς.
2. Εξέταση της επίδρασης διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας πριν την εκχύλιση (ξήρανση, άλεση, διαβροχή, ομογενοποίηση, κ.α.) στην απόδοση και εκλεκτικότητα των μεθόδων.
3. Εξέταση, ανάπτυξη και σύγκριση άλλων υψηλής απόδοσης πράσινων διεργασιών εκχύλισης, όπως η υπερκρίσιμη και η υποκρίσιμη εκχύλιση.
4. Μελέτη εκχύλισης διαφορετικών ποικιλιών ελιάς και διερεύνηση νέου πειραματικού σχεδιασμού.
5. Μελέτη πολλαπλών δειγμάτων συλλεγμένα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και σε διαφορετικές περιόδους συγκομιδής, ώστε να διακριθεί η βέλτιστη περιοχή και περίοδος συλλογής για τη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, ελαιοευρωπεΐνης, τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης.
6. Εξέταση και σύγκριση εναλλακτικών μεθόδων μέτρησης ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων.
7. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους, εκτός από τη δοκιμή DPPH.
8. Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε μη υγιή κύτταρα, ώστε να διεξαχθεί συμπέρασμα ως προς τις φαρμακολογικές τους δράσεις.
9. Ανάπτυξη τελικών προϊόντων τροφίμων ή καλλυντικών, στα όποια θα περιέχονται εκχυλίσματα φύλλων ελιάς προερχόμενα από πράσινες μεθόδους εκχύλισης με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, αφού είναι ασφαλή στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.
10. Μελέτη της διάρκειας ζωής των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, τόσο μικροβιακά, όσο και ως προς τη διατήρηση της βιοδραστικότητας τους ως προς το χρόνο.
11. Μελέτη της βιομηχανικής εφαρμογής της εκχύλισης φύλλων ελιάς εξετάζοντας την αποδοτικότητα και την περιβαλλοντική τους επίδοση.

12. Τεχνικοοικονομική μελέτη πιλοτικής μονάδας επεξεργασίας, ικανής να χειριστεί μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων της ελαιουργίας, ώστε να παράγει σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών συστατικών. Ειδικότερα, μελέτη της οικονομικής βιωσιμότητας με βάση τόσο το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των γραμμών παραγωγής όσο και την ποιότητα των τελικών εκχυλισμάτων.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Macário, I. P. E., Oliveira, H., Menezes, A. C., Ventura, S. P. M., Pereira, J. L., Gonçalves, A. M. M., ... & Gonçalves, F. J. M. (2019). Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Scientific reports*, *9*(1), 1-9.
2. Tzani, A., Vaitsis, C., Kritsi, E., Smiljkovic, M., Sokovic, M., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2020). Green synthesis of bis-(β-dicarbonyl)-methane derivatives and biological evaluation as putative anticandidial agents. *Journal of Molecular Structure*, *1216*, 128276.
3. Abbattista, R., Losito, I., Calvano, C. D., & Cataldi, T. R. (2021). Exploring the Isomeric Precursors of Olive Oil Major Secoiridoids: An Insight into Olive Leaves and Drupes by Liquid-Chromatography and Fourier-Transform Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, *10*(9), 2050.
4. Acar-Tek, N., & Ağagündüz, D. (2020). Olive leaf (Olea europaea L. folium): potential effects on Glycemia and Lipidemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *76*(1), 10-15.
5. Ahmad, A., Rehman, M. U., Wali, A. F., El-Serehy, H. A., Al-Misned, F. A., Maodaa, S. N., ... & Ahmad, P. (2020). Box–Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from Rhododendron arboreum and the Evaluation of Its Antioxidant Potential. *Molecules*, *25*(17), 3835.
6. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents–solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *2*(5), 1063-1071.
7. Apostolakis, A., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2014). Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (Olea europaea) using heated water/glycerol mixtures. *Separation and Purification Technology*, *128*, 89-95.
8. Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.). Journal of agricultural and food chemistry, 54(2), 434-440.
9. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., ... & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology, 50(6), 1817-1825.
10. Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. Molecules, 24(10), 2001.
11. Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., ... & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (Olea europaea L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules, 12(5), 1153-1162.
12. Škulcová, A., & Jablonský, M. (2018). PROPERTIES AND THERMAL BEHAVIOR OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS BASED LACTIC ACID. Journal of Hygienic Engineering and Design, 25, 75-80.
13. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chemical communications, (1), 70-71.
14. Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., & Tananaki, C. (2012). Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (Olea europaea L.) and their relationship to antioxidant activity. Environmental and Experimental Botany, 79, 37-43.
15. Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. International journal of molecular sciences, 15(10), 18508-18524.
16. Martin-Garcia, B., Pimentel-Moral, S., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Box-Behnken experimental design for a green extraction method of phenolic compounds from olive leaves. Industrial Crops and Products, 154, 112741.

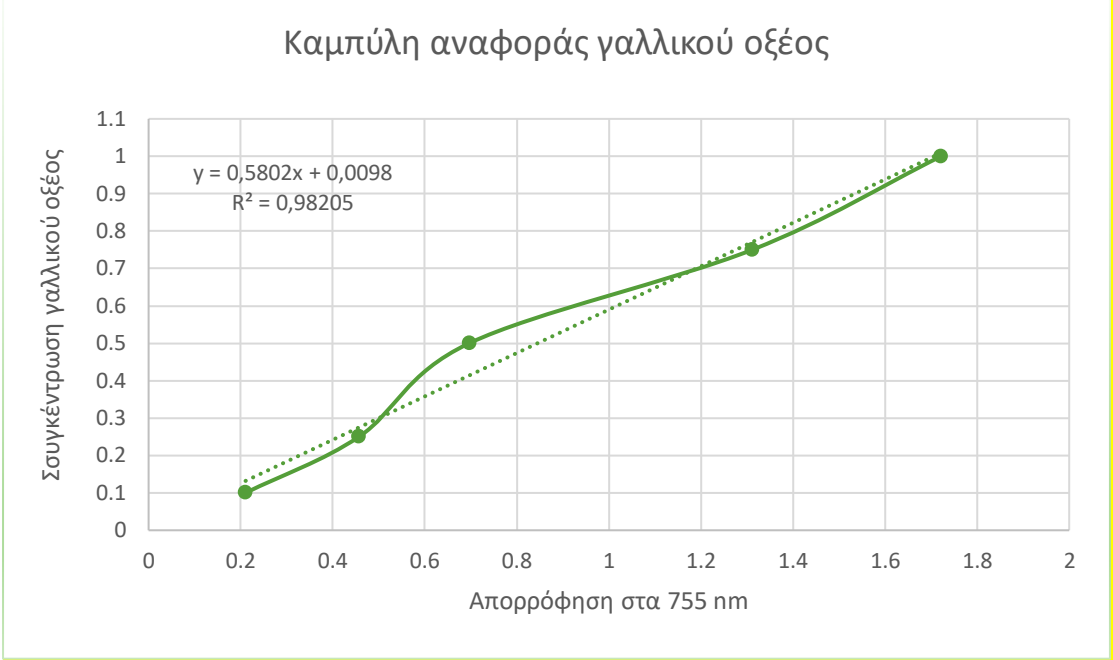
17. González, C. G., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. Flavour and Fragrance Journal, 33(1), 91-96.
18. Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of agricultural and food chemistry, 43(1), 27-32.
19. Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. Current topics in medicinal chemistry, 1(6), 569-590.
20. Funari, C. S., Sutton, A. T., Carneiro, R. L., Fraige, K., Cavalheiro, A. J., da Silva Bolzani, V., ... & Arrua, R. D. (2019). Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. Food Research International, 125, 108559.
21. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), 1841-1856.
22. Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources. Applied Sciences, 9(19), 4169.
23. Odiatou, E. M., Skaltsounis, A. L., & Constantinou, A. I. (2013). Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. Cancer letters, 330(1), 113-121.
24. Zurob, E., Cabezas, R., Villarroel, E., Rosas, N., Merlet, G., Quijada-Maldonado, E., ... & Plaza, A. (2020). Design of natural deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from olive leaves supported by COSMO-RS. Separation and Purification Technology, 248, 117054.
25. Silva, E. D. O., Borges, L. L., Conceição, E. C. D., & Bara, M. T. F. (2017). Box–Behnken experimental design for extraction of artemisinin from Artemisia annua and validation of the assay method. Revista Brasileira de Farmacognosia, 27, 519-524.
26. Le Floch, F., Tena, M. T., Ríos, A., & Valcárcel, M. (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. Talanta, 46(5), 1123-1130.
27. Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. International journal of molecular sciences, 13(7), 8615-8627.
28. FDA, U. (2010). Overview of food ingredients, additives & colors.
29. Markhali, F. S., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. (2020). Olive tree leaves—A source of valuable active compounds. Processes, 8(9), 1177.
30. Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J. A., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Micol, V., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. Analytical and bioanalytical chemistry, 397(2), 643-654.
31. Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. Trends in Food Science & Technology, 49, 96-109.
32. da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (Olea europaea L.). Innovative Food Science & Emerging Technologies, 58, 102234.
33. Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V. M., Ranieri, M., Pasqualone, A., ... & Caponio, F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. Journal of Functional Foods, 31, 63-70.
34. Al-Azzawie, H. F., & Alhamdani, M. S. S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life sciences, 78(12), 1371-1377.
35. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. Chemico-biological interactions, 176(2-3), 88-98.
36. Khemakhem, I., Abdelhedi, O., Trigui, I., Ayadi, M. A., & Bouaziz, M. (2018). Structural, antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides extracted from olive leaves. International journal of biological macromolecules, 106, 425-432.
37. Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., ... & Kremastinos, D. T. (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. The journal of nutrition, 136(8), 2213-2219.

38. Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. In Water extraction of bioactive compounds(pp. 291-316). Elsevier.
39. Hayat, J., Akodad, M., Moumen, A., Baghour, M., Skalli, A., Ezrari, S., & Belmalha, S. (2020). Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of Marrubium vulgare L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. Heliyon, 6(11), e05609.
40. Rostagno, M. A., & Prado, J. M. (Eds.). (2013). Natural product extraction: principles and applications (No. 21). Royal Society of Chemistry.
41. Anter, J., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Demyda-Peyras, S., Moreno-Millán, M., Alonso-Moraga, Á., ... & de Castro, M. D. L. (2011). A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 723(2), 165-170.
42. Yuan, J. J., Wang, C. Z., Ye, J. Z., Tao, R., & Zhang, Y. S. (2015). Enzymatic hydrolysis of oleuropein from Olea europea (olive) leaf extract and antioxidant activities. Molecules, 20(2), 2903-2921.
43. Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Rodríguez, L., & Riera, E. (2010). Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. Physics Procedia, 3(1), 147-152.
44. Yetilmezsoy, K., Demirel, S., & Vanderbei, R. J. (2009). Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by Pistacia vera L.: Box–Behnken experimental design. Journal of hazardous materials, 171(1-3), 551-562.
45. El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (Olea europaea) leaves: potential beneficial effects on human health. Nutrition reviews, 67(11), 632-638.
46. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food composition and analysis, 19(6-7), 669-675.
47. Pang, K., Hou, Y., Wu, W., Guo, W., Peng, W., & Marsh, K. N. (2012). Efficient separation of phenols from oils via forming deep eutectic solvents. Green Chemistry, 14(9), 2398-2401.
48. Lee, O. H., Kim, Y. C., Kim, K. J., Kim, Y. C., & Lee, B. Y. (2007). The effects of bioactive compounds and fatty acid compositions on the oxidative stability of extra virgin olive oil varieties. Food Science and Biotechnology, 16(3), 415-420.
49. Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). Olive tree (Olea europeae L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. Antioxidants, 4(4), 682-698.
50. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P. I., Lazurca, D., & Mason, T. J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. Ultrasonics sonochemistry, 4(2), 135-139.
51. Yokohira, M., Yamakawa, K., Saoo, K., Matsuda, Y., Hosokawa, K., Hashimoto, N., ... & Imaida, K. (2008). Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin, and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay. Journal of food science, 73(7), C561-C568.
52. Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. Arabian Journal of Chemistry, 13(1), 1685-1701.
53. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76(5), 965-977.
54. Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 17, 120-129.
55. Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. Industrial Crops and Products, 124, 382-388.

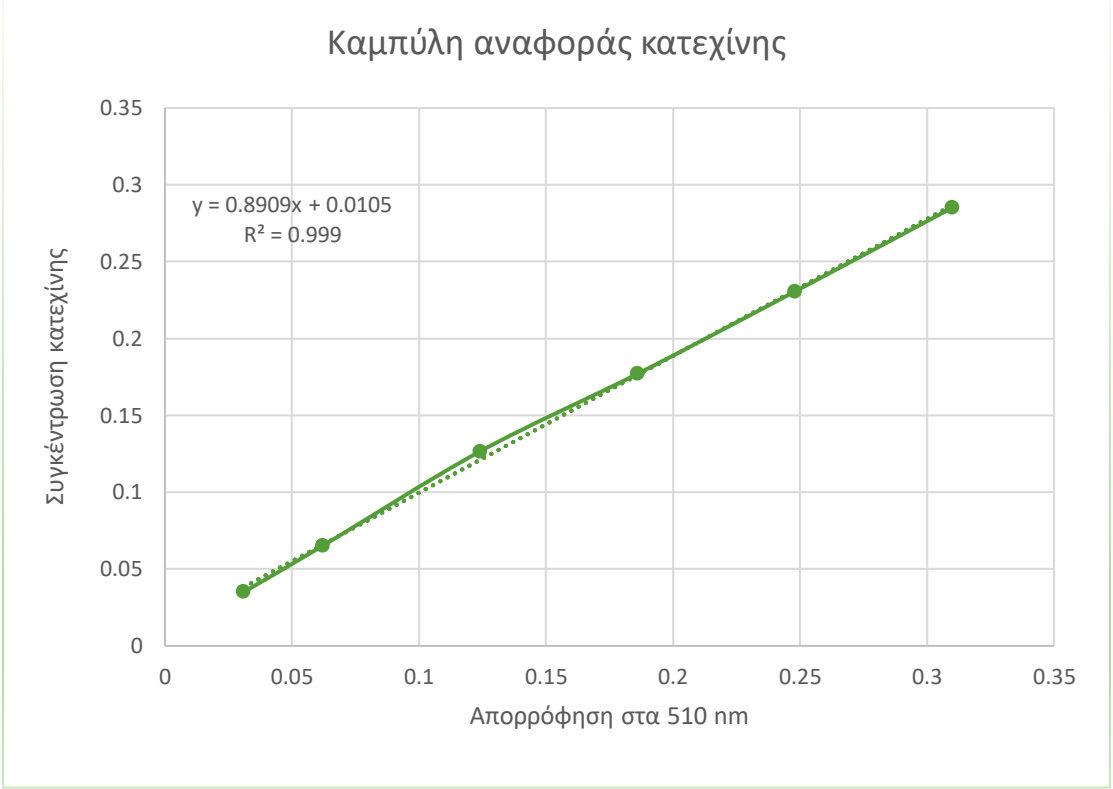
56. Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(18), 3591-3601.
57. Faggian, M., Sut, S., Perissutti, B., Baldan, V., Grabnar, I., & Dall'Acqua, S. (2016). Natural deep eutectic solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: possible application in nutraceuticals. Molecules, 21(11), 1531.
58. McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2002). Βασικές Διεργασίες Χημικής Μηχανικής. μ. τ. φ. Πολυματίδου Σ., 6η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
59. Laguerre, M., & Lavaud, A. (2016). The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. Naturex., 45-47.
60. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, 65(1-2), 55-63.
61. Rahmanian, N., Jafari, S. M., & Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. Trends in Food Science & Technology, 42(2), 150-172.
62. Benavente-Garcıa, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A. D. R. J., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food chemistry, 68(4), 457-462.
63. Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., ... & Kim, Y. C. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. Bioresource technology, 100(23), 6107-6113.
64. Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Kaitouni, L. B. D., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. Biotechnology Reports, 23, e00347.
65. Lins, P. G., Pugine, S. M. P., Scatolini, A. M., & de Melo, M. P. (2018). In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (Olea europaea L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. Heliyon, 4(9), e00805.
66. Goldschmidt Lins, P., Marina Piccoli Pugine, S., Márcio Scatolini, A., & Pires de Melo, M. (2020). Antioxidant actions of olive leaf extract (Olea europaea L.) on reactive species scavengers. J. Anal. Pharm. Res, 9, 68-71.
67. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. Chemical Society Reviews, 39(1), 301-312.
68. Erythropel, H. C., Zimmerman, J. B., de Winter, T. M., Petitjean, L., Melnikov, F., Lam, C. H., ... & Anastas, P. T. (2018). The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. Green chemistry, 20(9), 1929-1961.
69. Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. Analytical Methods, 5(17), 4288-4295.
70. Pisano, P. L., Espino, M., de los Ángeles Fernández, M., Silva, M. F., & Olivieri, A. C. (2018). Structural analysis of natural deep eutectic solvents. Theoretical and experimental study. Microchemical Journal, 143, 252-258.
71. Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese medicine, 13(1), 1-26.
72. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International journal of food sciences and nutrition, 57(5-6), 292-304.
73. Cruz, R. M., Brito, R., Smirniotis, P., Nikolaidou, Z., & Vieira, M. C. (2017). Extraction of bioactive compounds from olive leaves using emerging technologies. In Ingredients extraction by physicochemical methods in food (pp. 441-461). Academic Press.
74. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., ... & Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. Analytica chimica acta, 597(2), 179-186.
75. Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. Journal of Cleaner Production, 241, 118384.
76. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for

simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in enzymology, 299, 15-27.
77. Suslick, K. S. (1989). The chemical effects of ultrasound. Scientific American, 260(2), 80-87.
78. Yancheva, S., Mavromatis, P., & Georgieva, L. (2016). Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from olive leaves. Journal of Central European Agriculture.
79. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. BioMed research international, 2013.
80. Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British journal of cancer, 56(3), 279-285.
81. Process Validation: General Principles and Practices. (2021). Retrieved from https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/process-validation-general-principles-and-practices
82. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics sonochemistry, 8(3), 303-313.
83. Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific.
84. Tchabo, W., Ma, Y., Kwaw, E., Xiao, L., Wu, M., & T. Apaliya, M. (2018). Impact of extraction parameters and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of aqueous extract mulberry leaf. International Journal of Food Properties, 21(1), 717-732.
85. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?, Plant physiology, 156(4), 1701-1705.
86. Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in Carthamus tinctorius L. Analytical chemistry, 85(13), 6272-6278.
87. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. Analytica chimica acta, 766, 61-68.
88. EUR-Lex - 32006D0257 - EN - EUR-Lex. (2021). Retrieved from https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006D0257
89. ICH Official web site : ICH. (2021). Retrieved from https://www.ich.org/page/quality-guidelines
90. Levulinic acid. (2021). Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levulinic-acid
91. Proline. (2021). Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proline
92. beta-Alanine. (2021). Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Alanine
93. D-Glucose. (2021). Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose
94. Oxalic acid. (2021). Retrieved from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxalic-acid

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Διάγραμμα 22: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος για τη μέθοδο προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).



Διάγραμμα 23: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης για τη μέθοδο προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).