



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Ανάκτηση βιοδραστικών εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς με σύγχρονες τεχνικές

Διπλωματική εργασία



Μαρία Νικολάου

Επιβλέπων: Επαμεινώνδας Βουτσάς
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μακρόχρονης διαδικασίας, πολλοί άνθρωποι συνέβαλαν καταλυτικά και θα ήθελα να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, κο Βουτσά Επαμεινώνδα, για το θέμα που μου εμπιστεύτηκε, τη βοήθεια και την καθοδήγησή του. Οι επιστημονικές γνώσεις και οι εύστοχες παρατηρήσεις του από τα αρχικά στάδια μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωσή της εργασίας αυτής υπήρξαν πολύτιμες.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη διδάκτορα Μπόλη Ελένη για την ανεκτίμητη βοήθειά της τόσο στο εργαστήριο, όσο και κατά τη συγγραφή, την υπομονή και την προθυμία της. Την ευχαριστώ επίσης για την πραγματοποίηση της ανάλυσης σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Χωρίς τη βοήθειά της, η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς και ιδιαίτερα, τους υποψήφιους διδάκτορες Πρίνο Νίκο και Πάππου Σοφία, για το φιλικό κλίμα και τις συμβουλές.

Περίληψη

Οι πράσινες τεχνικές εκχύλισης υψηλής αξίας βιοδραστικών ουσιών από φυτικά υλικά έχουν συγκεντρώσει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς, μίας άφθονης, μη βρώσιμης και ανεκμετάλλευτης πρώτης ύλης, έχει εδραιωθεί πλέον στην αγορά φαρμακευτικών προϊόντων και τροφίμων και η έρευνα έχει στραφεί σε νέους, πράσινους διαλύτες και τεχνικές που μπορούν να το βελτιώσουν ποιοτικά.

Οι Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs) είναι τέτοιοι νέοι, πράσινοι διαλύτες που σχηματίζονται από ένα ευτηκτικό μείγμα δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου. Έχουν βελτιωμένη επιλεκτικότητα, εύκολη ανάκτηση, εύκολη επαναχρησιμοποίηση και φιλική προς το περιβάλλον φύση. Οι DESs έχουν αναδειχθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία, καθώς επιτυγχάνουν μία γρήγορη και ενεργειακά αποδοτική εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων. Νέοι συνδυασμοί δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου μελετώνται συνεχώς για καινούριες εφαρμογές ή βελτιστοποίηση ήδη υπαρχόντων.

Σε αυτήν την εργασία, μελετήθηκε πειραματικά η κλασική υγρή εκχύλιση φύλλων ελιάς με διαλύτη τον DES χλωριούχος χολίνη (choline chloride)/ ουρία σε αναλογία 1:2 κατά mol (ChCl:Urea (1:2)), έναν διαλύτη που ήδη μελετάται εκτενώς για την εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων, καθώς και με έναν νέο συνδυασμό δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου, τον DES χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ (acetic acid) 1:2 κατά mol (ChCl:AA (1:2)). Ακόμη, εξετάστηκε η κλασική εκχύλιση φύλλων ελιάς με δύο συμβατικούς διαλύτες, την αιθανόλη και το νερό, για λόγους σύγκρισης. Μελετήθηκε επίσης η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE) με τον συμβατικό διαλύτη αιθανόλη, με σκοπό τη σύγκρισή της με την κλασική.

Διερευνήθηκε η επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων της εκχύλισης και συγκεκριμένα, της θερμοκρασίας (55 - 70 °C για κλασική εκχύλιση και 40 - 70 °C για MAE), της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη (1:30 - 1:10 κατά βάρος (κ.β.)), του χρόνου εκχύλισης (10 - 24 ώρες (h) για κλασική εκχύλιση και 5 - 30 λεπτά για MAE) και επιπλέον της ισχύος (500 - 750 W) για τη MAE, στην αντιοξειδωτική δράση (Antioxidant Capacity ή AC) του παραγόμενου εκχυλίσματος, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content ή TPC) και τη συγκέντρωση στις αντιοξειδωτικές ουσίες ελαιουρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη. Ακόμη, μετρήθηκαν η πυκνότητα και το ιξώδες των DESs και εξάχθηκαν εμπειρικές συσχετίσεις συναρτήσεως της θερμοκρασίας, με βάση ένα εμπειρικό γραμμικό μοντέλο και το μοντέλο Vogel - Fulcher - Tammann, για την πυκνότητα και το ιξώδες αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα ήταν πλούσια σε ελαιοευρωπεΐνη και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές της βιβλιογραφίας. Υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε για όλους τους διαλύτες εκτός του νερού. Με χρήση του ChCl:AA (1:2), λήφθηκαν εκχυλίσματα πλουσιότερα σε υδροξυτυροσόλη σε σχέση με τους ChCl:Urea (1:2) και αιθανόλη. Συνολικά, υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε σε έξι (6) και τυροσόλη σε ένα (1) από τα είκοσι τέσσερα (24) εκχυλίσματα που λήφθηκαν με κλασική εκχύλιση.

Όσον αφορά την απόδοση της κλασικής εκχύλισης, μεταξύ της αιθανόλης και του ChCl:Urea (1:2), ο ChCl:Urea (1:2) είναι πιο αποτελεσματικός, με απόδοση που ανέρχεται στο 36,8%. Όσον αφορά την επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων της κλασικής εκχύλισης στην AC και το TPC εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με τους διαλύτες αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), παρατηρήθηκε ότι, με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 - 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα. Η μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:30 – 1:10 κ.β. επέδρασε θετικά μόνο για τους αιθανόλη και ChCl:Urea (1:2), ενώ η αύξηση του χρόνου εκχύλισης στο εύρος 10 – 24 h είχε θετική επίδραση μόνο στην περίπτωση της αιθανόλης. Η ανάμειξη των αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με νερό 30% κ.β. είχε αρνητική επίδραση, ενώ με ανάμειξη των DESs με αιθανόλη 20% κ.β. λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα και για τους δύο.

Όσον αφορά την επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων της κλασικής εκχύλισης στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης, παρατηρήθηκε ότι, με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 - 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα μόνο για τους αιθανόλη και ChCl:Urea (1:2). Η μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:30 – 1:10 κ.β. και η αύξηση του χρόνου εκχύλισης στο εύρος 10 – 24 h επέδρασαν θετικά. Η ανάμειξη των αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με νερό 30% κ.β. είχε θετική επίδραση μόνο στην περίπτωση της αιθανόλης, ενώ με ανάμειξη των DESs με αιθανόλη 20% κ.β. λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα και για τους δύο.

Στη MAE, με διαλύτη την αιθανόλη, λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 40 - 70 °C, αύξηση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:30 – 1:10 κ.β., μείωση του χρόνου εκχύλισης στο εύρος 5 – 30 λεπτά, και μείωση της ισχύος στο εύρος 500 – 750 W, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η MAE κρίθηκε πιο αποτελεσματική από την κλασική εκχύλιση, καθώς λήφθηκαν εκχυλίσματα παρόμοια ή και ελαφρώς πλουσιότερα συγκριτικά με εκείνα της κλασικής υγρής εκχύλισης σε πολύ μικρότερους χρόνους.

Όσον αφορά την AC και το TPC, ο ChCl:AA (1:2) αποδείχθηκε με μικρή διαφορά καλύτερος διαλύτης από τον ChCl:Urea (1:2), ο οποίος ακολουθείται από την αιθανόλη. Η διαφορά διευρύνθηκε σημαντικά με την προσθήκη αιθανόλης. Η αιθανόλη συνολικά ήταν πιο αποτελεσματική των DESs στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Ο ChCl:AA (1:2) παρουσιάζει χαμηλότερο ιξώδες και πυκνότητα από τον ChCl:Urea (1:2).

Η επιτυχία των DESs και ειδικότερα, του ChCl:AA (1:2) είναι πολύ υποσχόμενη. Περαιτέρω βελτιστοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε μία ανταγωνιστική πράσινη τεχνολογία έναντι των κοινών πρακτικών. Ήδη στις βέλτιστες συνθήκες, με ChCl:AA (1:2), λήφθηκε εκχύλισμα με +66 % AC, +96 % TPC και +40 % συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη σε σχέση με την αιθανόλη. Αν συνδυαστούν οι βέλτιστες παράμετροι εκχύλισης της MAE με τον βέλτιστο DES, δηλαδή τον ChCl:AA (1:2), μελλοντικά μπορούν να προκύψουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: βιοδραστικές ουσίες, αντιοξειδωτικά, εκχύλιση, φύλλα ελιάς, εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες, ελαιοευρωπεΐνη

Abstract

Green extraction techniques of high value bioactive compounds from plant material have drawn the interest of the global scientific community in recent years. Olive leaf extract, a product of an abundant, inedible and unexploited raw material, has been established on the pharmaceutical and food market, and research has now focused on new, green solvents and techniques that can improve its quality.

Deep Eutectic Solvents (DESs) are such new, green solvents, formed by a hydrogen bond donor - acceptor eutectic mixture. They have improved selectivity, easy recovery, easy reuse and environmentally friendly nature. DESs have emerged in the world scientific literature, as their use can lead to a quick and energy efficient phytochemical extraction. New combinations of hydrogen bond donors and acceptors are constantly being studied for new applications or optimization of the existing ones.

In the present diploma thesis, olive leaf extraction with solid – liquid extraction (SLE) was studied, using as solvent the DES choline chloride/ urea in a 1:2 molar ratio (ChCl:Urea (1:2)), a solvent already being studied widely for the extraction of phytochemicals, along with a new combination of hydrogen bond donor and acceptor, the DES choline chloride/ acetic acid in a 1:2 molar ratio (ChCl:AA (1:2)). Furthermore, SLE with two conventional solvents, ethanol and water, was studied for comparison purposes. Microwave Assisted Extraction (MAE) with the conventional solvent ethanol was also studied, in order to compare it with the SLE.

The effect of the operating parameters of the extraction process was also examined, and specifically, that of temperature (55 - 70 °C for SLE and 40 – 70 °C for MAE), biomass to solvent ratio (1:30 – 1:10 per weight (w/w)), extraction time (10 – 24 hours for SLE and 5 – 30 min for MAE) and additionally power (500 – 750 W) for MAE, in the Antioxidant Capacity (AC) of the produced extract, the Total Phenolic Content (TPC), and the concentration in the antioxidants oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol. Furthermore, the density and viscosity of DESs were measured, and empirical correlations as a function of temperature were developed, based on a linear model and the Vogel - Fulcher - Tammann model, for the density and viscosity respectively.

Results showed that all extracts were rich in oleuropein, and in higher concentrations than those in the literature. Hydroxytyrosol was detected in all solvents except for water. Using ChCl:AA (1:2) as solvent, extracts richer in hydroxytyrosol were obtained, in relation to ChCl:Urea (1:2) and ethanol. In total, hydroxytyrosol was detected in six (6) and tyrosol in one (1) among the twenty-four (24) extracts obtained using SLE.

Regarding the yield of SLE, between ethanol and ChCl:Urea (1:2), ChCl:Urea (1:2) is more efficient, with a yield that amounts to 36.8%. Regarding the effect of the operating parameters of the SLE process on the AC and TPC of extracts obtained with the solvents ethanol, ChCl:Urea (1:2) and ChCl:AA (1:2), it was indicated that, by increasing the temperature in the range 55 - 70 °C, better results are obtained. The reduction of biomass to solvent ratio in the range 1:30 - 1:10 w/w had a positive effect only for ethanol and ChCl:Urea (1:2), while the increase of extraction time in the range 10 - 24 h had a positive effect only in the case of ethanol. Mixing ethanol, ChCl:Urea (1:2), and ChCl:AA (1:2) with water 30% w/w had a negative effect, while by mixing the DESs with ethanol 20% w/w, better results for both were obtained.

Regarding the effect of the operating parameters of the SLE process on the recovery of oleuropein, it was indicated that, by increasing the temperature in the range 55 - 70 °C, better results are obtained only for ethanol and ChCl:Urea (1:2). The reduction of biomass to solvent ratio in the range 1:30 - 1:10 w/w and the increase of extraction time in the range 10 - 24 h had a positive effect. Mixing ethanol, ChCl: Urea (1:2), and ChCl: AA (1:2) with water 30% w/w had a positive effect only in the case of ethanol, while by mixing the DESs with ethanol 20% w/w, better results for both were obtained.

In MAE, using ethanol as solvent, better results were obtained by increasing the temperature in the range 40 - 70 °C, increasing the biomass to solvent ratio in the range 1:30 - 1:10 w/w, reducing the extraction time in the range 5 - 30 min, and reducing the power in the range 500 - 750 W, both in terms of AC, TPC and oleuropein recovery. MAE was deemed to be more effective than SLE, as similar or richer extracts than those of SLE were obtained in much shorter times.

In terms of AC and TPC, ChCl:AA (1:2) proved to be slightly better than ChCl:Urea (1:2), followed by ethanol. The difference widened significantly by adding ethanol. In total, ethanol was more effective than DESs in recovering oleuropein. ChCl:AA (1:2) has lower viscosity and density than ChCl:Urea (1:2).

The success of DESs and of ChCl:AA (1:2) in particular is very promising. Further optimization can lead to a competitive green technology over common practices. Already, under the optimal conditions of those examined, using ChCl:AA (1:2), an extract with +66% AC, +96% TPC and +40% concentration in oleuropein relative to ethanol was obtained. If the optimal extraction parameters of MAE are combined with the optimal DES, i.e. ChCl:AA (1:2), even better results can be obtained in the future.

Key words: bioactive compounds, antioxidants, extraction, olive leaves, microwave assisted extraction, deep eutectic solvents, oleuropein

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη.....	4
Abstract	7
Ευρετήριο πινάκων	12
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	14
Ευρετήριο εικόνων	17
Εισαγωγή.....	18
1 Θεωρητικό μέρος	19
1.1 Φύλλα ελιάς & βιοδραστικές ουσίες	19
1.1.1 Βιοδραστικές ουσίες: προέλευση και χρήση	19
1.1.2 Αξιοποίηση φύλλων ελιάς.....	20
1.1.3 Βιοδραστικές ουσίες στα φύλλα ελιάς	21
1.1.4 Χρήση φύλλων ελιάς.....	22
1.1.5 Αντιοξειδωτική δράση.....	23
1.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών	26
1.2.1 Εκχύλιση φυτικών προϊόντων	26
1.2.2 Εκχύλιση με διαλύτες τρίτης γενιάς.....	29
1.2.2.1 Ιοντικά υγρά	29
1.2.2.2 Βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες.....	30
1.2.3 Εκχύλιση φύλλων ελιάς.....	32
1.3 Εκχύλιση στερεού - υγρού	37
1.3.1 Εισαγωγή	37
1.3.2 Παράμετροι εκχύλισης.....	38
1.3.3 Επιλογή διαλύτη.....	38
1.3.4 Εκχύλιση με υπερήχους	38
1.3.5 Εκχύλιση με μικροκύματα	39
Βιβλιογραφία	39
2 Πειραματικό μέρος.....	50
2.1 Υλικά.....	50
2.2 Επεξεργασία φύλλων ελιάς.....	50
2.3 Σύνθεση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών	50

2.4 Κλασική υγρή εκχύλιση	51
2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα	52
2.6 Ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης	52
2.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH.....	53
2.8 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu.....	54
2.9 Μέτρηση πυκνότητας βαθέων ευτηκτικών διαλυτών	55
2.10 Μέτρηση ιξώδους βαθέων ευτηκτικών διαλυτών.....	55
Βιβλιογραφία	56
3 Αποτελέσματα μετρήσεων & σχολιασμός	57
3.1 Εισαγωγή.....	57
3.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός κλασικής υγρής εκχύλισης	57
3.2.1 Απόδοση κλασικής υγρής εκχύλισης	57
3.2.2 Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης, ολικού φαινολικού περιεχομένου και υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης κλασικής υγρής εκχύλισης.....	58
3.2.3 Επίδραση χρόνου στην ποιότητα των εκχυλισμάτων	61
3.2.4 Επίδραση θερμοκρασίας στην ποιότητα των εκχυλισμάτων	63
3.2.5 Επίδραση αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στην ποιότητα των εκχυλισμάτων	66
3.2.6 Επίδραση ανάμειξης με νερό στην ποιότητα των εκχυλισμάτων.....	69
3.2.7 Επίδραση ανάμειξης με αιθανόλη στην ποιότητα των εκχυλισμάτων.....	71
3.2.8 Σύγκριση διαλυτών.....	73
3.3 Αποτελέσματα και σχολιασμός εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα.....	76
3.3.1 Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη	76
3.3.2 Επίδραση λειτουργικών παραμέτρων εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα στην ποιότητα των εκχυλισμάτων	76
3.3.3 Σύγκριση εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με την κλασική υγρή εκχύλιση με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη	79
3.4 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol & εξαγωγή εμπειρικών συσχετίσεων με τη θερμοκρασία	80
3.4.1 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων πυκνότητας και ιξώδους των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol.....	80
3.4.2 Εξαγωγή εμπειρικής γραμμικής συσχέτισης πυκνοτήτων των δύο βαθέων ευτηκτικών διαλυτών με τη θερμοκρασία	81

3.4.3	Εξαγωγή εμπειρικής συσχέτισης ιξωδών των δύο βαθέων ευτηκτικών διαλυτών με τη θερμοκρασία με το μοντέλο Vogel – Fulcher – Tammann	82
	Βιβλιογραφία	83
4	Συμπεράσματα & προτάσεις για το μέλλον.....	86
4.1	Συμπεράσματα	86
4.2	Προτάσεις για το μέλλον.....	88
	Παράρτημα Α: Χημικοί τύποι συστατικών φύλλων ελιάς & αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της ελαιοευρωπεΐνης.....	90
	Παράρτημα Β: Χημικοί τύποι μερικών δοτών και δεκτών δεσμού υδρογόνου για σύνθεση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, σημεία τήξης και ιξώδη.....	95
	Παράρτημα Γ: Χρωματισμός των δειγμάτων κατά την ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου, τυπικές καμπύλες αναφοράς υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης & τυπικά παραδείγματα χρωματογραφημάτων	97

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1.1: Αντιοξειδωτική δράση σύμφωνα με τους Phongraichit et al.....	25
Πίνακας 1.2: Αντιοξειδωτική δράση σε ισοδύναμα Trolox (TEAC) του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (OLE) και ορισμένων εκ των ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς.....	26
Πίνακας 1.3: Πειραματικές συνθήκες για διάφορες μεθόδους εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από φυτικά υλικά.....	28
Πίνακας 1.4: Τύποι ευτηκτικών διαλυτών.....	31
Πίνακας 1.5: Συνδυασμοί βαθέων ευτηκτικών διαλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση ξηρών φύλλων ελιάς, το χρώμα και η μορφολογία, το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου και η απόδοσή τους σε ελαιοευρωπεΐνη.....	34
Πίνακας 2.1: Λίστα υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Σημειώνονται ο αριθμός CAS, ο προμηθευτής και η καθαρότητα.....	50
Πίνακας 2.2: Πρόγραμμα έκλουσης στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.....	52
Πίνακας 3.1: Απόδοση κλασικής εκχύλισης για τρία συστήματα διαλυτών: (α) αιθανόλη – νερό (70 – 30 % κ.β.), (β) ChCl:Urea (1:2) και (γ) ChCl:Urea (1:2) – αιθανόλη (80% - 20% κ.β.), T = 55 °C, Mass Ratio 1:20 κ.β., t = 24 h.....	57
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) κλασικής εκχύλισης. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση (STDEV) για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β.....	58
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα ανάλυσης σε χρωματογραφία υψηλής πίεσης κλασικής εκχύλισης. wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β.....	59
Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση (STDEV) για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β.....	76
Πίνακας 3.5: Μετρήσεις πυκνότητας των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) σε θερμοκρασία 20 – 95 °C.....	80
Πίνακας 3.6: Μετρήσεις ιξώδους των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) σε θερμοκρασία 20 – 90 °C. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση	81
Πίνακας 3.7: Παράμετροι γραμμικού μοντέλου $\rho = aT + b$ για τους DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2). Σημειώνεται η απόλυτη μέση σχετική απόκλιση.....	81
Πίνακας 3.8: Παράμετροι μοντέλου VFT για τους DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2). Σημειώνεται η απόλυτη μέση σχετική απόκλιση.....	83

Πίνακας Β.1: Συνδυασμοί βαθέων ευτηκτικών διαλυτών με τις καλύτερες αποδόσεις σε ελαιοευρωπεΐνη κατά ελαττούμενη σειρά, τα σημεία τήξης του δέκτη δεσμού υδρογόνου, του δότη και του βαθύ ευτηκτικού μείγματος και το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου.....96

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 2.1: Καμπύλη αναφοράς Trolox σε αιθανόλη με πρωτόκολλο DPPH*	53
Διάγραμμα 2.2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος σε απιονισμένο νερό με πρωτόκολλο Folin - Ciocalteu.....	55
Διάγραμμα 2.3: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος σε απιονισμένο νερό με πρωτόκολλο Folin – Ciocalteu προσαρμοσμένη για βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες.....	55
Διάγραμμα 3.1: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.....	61
Διάγραμμα 3.2: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.....	62
Διάγραμμα 3.3: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.....	62
Διάγραμμα 3.4: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β, γ και δ, ε.....	63
Διάγραμμα 3.5: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.....	65
Διάγραμμα 3.6: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....	65
Διάγραμμα 3.7: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ, ε.....	66
Διάγραμμα 3.8: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea	

(1:2) με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά.....67

Διάγραμμα 3.9: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά.....68

Διάγραμμα 3.10: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.....69

Διάγραμμα 3.11: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....70

Διάγραμμα 3.12: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....70

Διάγραμμα 3.13: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με αιθανόλη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.....72

Διάγραμμα 3.14: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με αιθανόλη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.....72

Διάγραμμα 3.15: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.....73

Διάγραμμα 3.16: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.....74

Διάγραμμα 3.17: Σύγκριση συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.....75

Διάγραμμα 3.18: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από τον χρόνο. Η θερμοκρασία, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και η ισχύς παραμένουν σταθερές.....77

Διάγραμμα 3.19: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και η ισχύς παραμένουν σταθερά.....	77
Διάγραμμα 3.20: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η ισχύς παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....	78
Διάγραμμα 3.21: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από την ισχύ. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....	78
Διάγραμμα 3.22: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα της αιθανόλης στην ίδια αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και θερμοκρασία. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.....	79
Διάγραμμα 3.23: Γραμμική συσχέτιση της πυκνότητας των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με τη θερμοκρασία. Με τελείες απεικονίζονται τα πειραματικά σημεία.....	82
Διάγραμμα 3.24: Εμπειρική συσχέτιση με το μοντέλο VFT του ιξώδους των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με τη θερμοκρασία. Με τελείες απεικονίζονται τα πειραματικά σημεία.....	83
Διάγραμμα Γ.1: Τυπική καμπύλη αναφοράς ελαιοευρωπεΐνης.....	98
Διάγραμμα Γ.2: Τυπική καμπύλη αναφοράς υδροξυτυροσόλης.....	98
Διάγραμμα Γ.3: Τυπική καμπύλη αναφοράς τυροσόλης.....	98

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1.1: Οπτική αναπαράσταση διαγράμματος φάσεων βαθύ ευτηκτικού διαλύτη δύο συστατικών (δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου). Ο κάθετος είναι ο άξονας της θερμοκρασίας και ο οριζόντιος ο άξονας της μολαρικής αναλογίας ως προς το συστατικό Β. Το ευτηκτικό σημείο είναι χαμηλότερο των σημείων τήξης του δότη και του δέκτη. mp(A): melting point/ σημείο τήξης του Α, mp(B): σημείο τήξης του Β, Eutectic Temperature: Χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία τήξης για όλες τις αναλογίες ανάμιξης των συστατικών, Eutectic Point: Ευτηκτικό Σημείο, Eutectic Composition: Μολαρική Αναλογία για την οποία το μείγμα των δύο συστατικών έχει το χαμηλότερο σημείο τήξης.....	30
Εικόνα 2.1: Δύο διατάξεις κλασικής εκχύλισης συνδεδεμένες σε σειρά.....	51
Εικόνα Α.1: Χημικός τύπος ελαιοευρωπεΐνης (oleuropein).....	90
Εικόνα Α.2: Αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της ελαιοευρωπεΐνης.....	90
Εικόνα Α.3: Σχετικές δομές συστατικών φύλλων ελιάς. Από αριστερά προς τα δεξιά: χημικός τύπος της ελαιοευρωπεΐνης, της διμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνης, του μεθυλεστέρα ελαιοσίδης, της λιγκοτροσίδης, του διμεθυλεστέρα της ολεοσίδης και της ελαιοροσίδης.....	91
Εικόνα Α.4: Αναλυτικά οι χημικοί τύποι των ουσιών που περιέχονται στα φύλλα καθώς και σε όλο το δέντρο της ελιάς σε αλφαβητική σειρά.....	91
Εικόνα Β.1: Χημικοί τύποι μερικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών.....	95
Εικόνα Γ.1: Αριστερά: Μωβ χρώμα διαλύματος DPPH*. Κέντρο: φαίνεται ο αποχρωματισμός από το μωβ χρώμα του διαλύματος DPPH* σε κίτρινο των εκχυλισμάτων με ChCl:Urea (1:2) (αριστερά) και με ανάμειξη ChCl:Urea (1:2) με νερό 30% κ.β. (δεξιά), T = 55 °C, Mass Ratio 1:30, t = 24 h, σε κυψελίδες, μετά το πέρας της ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης. Το πιο έντονα αποχρωματισμένο δείγμα (αριστερά) αντιστοιχεί σε υψηλότερα ισοδύναμα Trolox. Δεξιά: φαίνεται ο μπλε χρωματισμός από αριστερά προς τα δεξιά: των εκχυλισμάτων με ανάμειξη ChCl:Urea (1:2) με νερό 30% κ.β. και με ChCl:Urea (1:2), T = 55 °C, Mass Ratio 1:30, t = 24 h και του τυφλού δείγματος μετά την παραμονή σε υδατόλουτρο, για την ανάλυση ολικού φαινολικού περιεχομένου. Το πιο έντονα χρωματισμένο δείγμα (μεσαίο) αντιστοιχεί σε υψηλότερα ισοδύναμα γαλλικού οξέος.....	97
Εικόνα Γ.2: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με ChCl:Urea (1:2), T = 55 °C, Mass Ratio 1:30, t = 24 h. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά	99
Εικόνα Γ.3: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με ChCl:AA (1:2), T = 55 °C, Mass Ratio 1:30, t = 24 h. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά.....	99
Εικόνα Γ.4: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με ChCl:AA (1:2) – Ethanol (80 – 20 %), T = 55 °C, Mass Ratio 1:30, t = 24 h. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά. Απεικονίζεται με ευθεία γραμμή το διάστημα ολοκλήρωσης για υπολογισμό της συγκέντρωσης ελαιοευρωπεΐνης.....	100

Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει ενταθεί η συζήτηση γύρω από την επίδραση που έχουν οι τροφές που καταναλώνουμε στην υγεία μας. Η σε βάθος επιστημονική έρευνα έχει αναδείξει πολλαπλές ιδιότητες ενώσεων που απαντώνται σε τρόφιμα και στρέψει το καταναλωτικό κοινό προς έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής. Υπερτροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά, τρόφιμα εμπλουτισμένα με βιταμίνες, πρωτεΐνη και φυτικές ίνες και μία τεράστια ποικιλία συμπληρωμάτων διατροφής έχουν εδραιωθεί στην αγορά και αποτελούν πλέον καθημερινότητα.

Παράλληλα, οι σοβαρές επιπτώσεις της συνεχούς υποβάθμισης του περιβάλλοντος επιτάσσουν όχι μόνο την υιοθέτηση καθημερινών φιλικών προς το περιβάλλον πρακτικών, αλλά και πράσινων τεχνολογιών από τις βιομηχανίες και τις λοιπές επιχειρήσεις. Ρυθμίσεις και νομοθεσίες για την επεξεργασία και απόρριψη επικίνδυνων αποβλήτων ή αερίων του θερμοκηπίου είναι κρίσιμες αλλά όχι αρκετές. Οι επιχειρήσεις καλούνται να κάνουν σωστή διαχείριση νερού και πρώτων υλών, ανάκτηση υλικών, να σέβονται τον περιβάλλοντα χώρο και την τοπική κοινωνία και γενικότερα, να λειτουργούν με τρόπο ηθικό, οικονομικά και περιβαλλοντικά βιώσιμο.

Στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, η επιστημονική κοινότητα αναζητά συνεχώς τρόπους αξιοποίησης ανεκμετάλλευτων αποβλήτων και παραπροϊόντων βιομηχανικών ή αγροτικών διεργασιών, μεταξύ άλλων. Σε αυτήν την κατεύθυνση, εξετάζεται η ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από φύλλα ελιάς, αντί για την ταφή ή την καύση τους. Πρόκειται για άφθονο, μη βρώσιμο απόβλητο, που περιέχει έναν μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών ουσιών.

Σε αυτήν την εργασία, μελετάται η εκχύλιση φύλλων ελιάς με κλασική υγρή εκχύλιση και μία σύγχρονη μέθοδο, την εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα. Ακόμη, μελετώνται νέα συστήματα διαλυτών, οι Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs), οι οποίοι έχουν βελτιωμένη επιλεκτικότητα, εύκολη ανάκτηση, εύκολη επαναχρησιμοποίηση και φιλική προς το περιβάλλον φύση και επιτυγχάνουν μία γρήγορη και ενεργειακά αποδοτική εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων.

Συγκεκριμένα, μελετώνται οι παράμετροι κάθε μεθόδου εκχύλισης, δηλαδή η θερμοκρασία, η ισχύς, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης, και η επίδρασή τους στην ποιότητα του παραγόμενου εκχυλίσματος ως προς το περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικές ουσίες, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro*, για τους συμβατικούς διαλύτες νερό και αιθανόλη και τους βαθείς ευτηκτικούς χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol. Ακόμη, μετρούνται δύο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs, η πυκνότητα και το ιξώδες, και εξάγονται εμπειρικές συσχετίσεις συναρτήσεως της θερμοκρασίας.

1 Θεωρητικό μέρος

1.1 Φύλλα ελιάς & βιοδραστικές ουσίες

1.1.1 Βιοδραστικές ουσίες: προέλευση και χρήση

Οι βιοδραστικές ουσίες είναι «υπέρ-θρεπτικά» συστατικά που συνήθως απαντώνται σε μικρές ποσότητες σε φυτικά προϊόντα και πλούσια σε λιπίδια τρόφιμα^[1]. Διαφέρουν από τα θρεπτικά συστατικά, λόγω του ότι δεν κρίνονται απαραίτητες και του ότι επί του παρόντος, δεν υπάρχουν συνιστώμενες τιμές ημερήσιας πρόσληψης^[2,3]. Στις βιοδραστικές ουσίες, περιλαμβάνονται τα γνωστά μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, λιπαρά οξέα κ.α.), οι φυτοχημικές ουσίες, τα καροτενοειδή που δεν αποτελούν προβιταμίνη Α, οι πολυφαινόλες, οι φυτοστερόλες, τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες και τα πεπτίδια.

Τα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων προκαλούν φυσιολογικές, συμπεριφορικές και ανοσολογικές επιδράσεις^[1]. Από ένα πλήθος μελετών σε ζώα, κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες, αποδεικνύεται επαρκώς ότι έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, μέσω της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών ή της βελτίωσης της λειτουργίας των συστημάτων του οργανισμού.

Οι μηχανισμοί δράσης για τις διάφορες ενώσεις, ειδικά σε σχέση με τον μειωμένο κίνδυνο ασθένειας σε άτομα, δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Μερικές δρουν ως αντιοξειδωτικά, ενώ άλλες ως αντικαρκινογόνα, αντιμικροβιακά, διεγείρουν αμυντικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ενισχύουν την απόκριση στο οξειδωτικό στρες, αποτρέποντας εκτεταμένες βλάβες ή ενισχύοντας την επούλωση^[4], μειώνουν την προφλεγμονώδη κατάσταση ή τις μεταβολικές διαταραχές^[5], προστατεύουν από καρδιαγγειακές παθήσεις.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνολογίες απομόνωσης και ενσωμάτωσης πολλών βιοενεργών συστατικών κάποιων τροφίμων εντός άλλων στα οποία δε βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό, εξελίσσεται ραγδαία η βιομηχανική παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με βιοενεργά συστατικά, όπως χυμοί με ω-3 και βιταμίνες, τρόφιμα με β-γλυκάνες και σνακ με αντιοξειδωτικά^[4].

Εκτός από τα τρόφιμα και φάρμακα, οι βιοδραστικές ουσίες αξιοποιούνται ευρέως σε εξελιγμένα βιοτεχνολογικά καλλυντικά. Τέτοια προϊόντα είναι όσα περιέχουν σε μικρή ή μεγάλη συγκέντρωση συνθετικό άμορφο διοξείδιο του πυριτίου (NM), βιοσυνθετικά παραγόμενη ελαστίνη και κολλαγόνο, κυτταρικά βιολογικά εκχυλίσματα, βιοσυνθετικά παραγόμενη λεκιθίνη και αμινοξέα, κεραμίδη, οροί καλλυντικών DMS L-καρνιτίνης^[6]. Άλλα συστατικά είναι φίλτρα UV, άλφα και βήτα υδροξυοξέα, ρετινοειδή, φωσφορολιπίδια, βιταμίνες, κεραμίδια, απολεπιστικά συστατικά, αντιοξειδωτικά,

ενυδατικές ουσίες, αμινοξέα, πεπτίδια/ πρωτεΐνες, παράγοντες ανάπτυξης και αποχρωματιστικά μέσα.

1.1.2 Αξιοποίηση φύλλων ελιάς

Το φύλλο της ελιάς είναι απλό, παχύ και δερματώδες, λογχοειδές έως ανεστραμμένο ωοειδές, μήκους 30 - 50 mm και πλάτους 10 - 15 mm, με μία μύτη στην κορυφή. Η άνω επιφάνεια είναι γκριζοπράσινη, λεία και λαμπερή, ενώ η κάτω επιφάνεια είναι πιο ανοιχτή και χνουδωτή^[7].

Ο κύκλος της ελαιοκαλλιέργειας έχει ως κύρια προϊόντα ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές, ως βασικά υποπροϊόντα πυρήνα και ξύλο ελιάς και πολλά απόβλητα, όπως τα φύλλα ελιάς που πέφτουν κατά τη συγκομιδή, Κλαδέματα Ελιάς ή Olive Tree Prunings (ΟΤΡ), δηλαδή όλα τα μικρά και μεγάλα κλαδιά και φύλλα από την ελιά που παράγονται από το κλάδεμά της, καθώς και το Λύμα Ελαιοτριβείου ή Olive Mill Wastewater (ΟΜW), που παράγεται από τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων. Τα περισσότερα απόβλητα δεν εκμεταλλεύονται, αλλά αντίθετα προκαλούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως εξάντληση πόρων, υποβάθμιση εδάφους και δημιουργία αποβλήτων^[8].

Μόνο στην Ελλάδα, ο αριθμός των κλαδεμάτων ελιάς (ΟΤΡ) αγγίζει τα τρία (3) εκατομμύρια τόνους. Καθώς τα περισσότερα καλλιεργούνται από μικρές επιχειρήσεις, δεν υπάρχει η δυνατότητα ή/ και η τεχνογνωσία να επεξεργαστούν με έναν τρόπο φιλικό προς το περιβάλλον. Τα περισσότερα παραμένουν μέσα στους αγρούς, ή καταλήγουν σε χωματερές, ή καίγονται αμέσως μετά τη συγκομιδή, οδηγώντας σε απώλεια τεράστιας ποσότητας ενέργειας και ανάκτησης υλικών και την ταυτόχρονη εκπομπή υπολογίσιμων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα, μεταξύ άλλων αερίων του θερμοκηπίου, που ανέρχονται σε 2,7 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Με τη θερμιδική αξία των ΟΤΡ να ανέρχεται στα 8 MJ/ kg, αυτές οι ποσότητες θα μπορούσαν να παράξουν 6,67 TWh θερμικής ενέργειας ή ισοδύναμα, 2,33 TWh ηλεκτρισμού, καλύπτοντας με αυτόν τον τρόπο έως και το 4,8% των συνολικών ενεργειακών απαιτήσεων της χώρας^[9,10].

Οι προοπτικές αξιοποίησης των ΟΤΡ περιλαμβάνουν την κομποστοποίηση προς παραγωγή εδαφοβελτιωτικού^[11,12], την παραγωγή ζωοτροφής^[13], την παραγωγή θερμικής ενέργειας^[14] και την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών. Ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών μέσω υγρής εκχύλισης.

Οι ουσίες που ανακτώνται από τα φύλλα της ελιάς, με όλο και περισσότερες ανακαλυπτόμενες βιοενεργές ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φάρμακα, φαρμακευτικά καλλυντικά, τα λεγόμενα *cosmeceuticals*, τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής, ροφήματα κ.α. Η αναγκαία μετάβαση σε μία όλο και πιο κυκλική οικονομία και οι ολοένα αυξανόμενες ανάγκες και απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού επιτάσσουν την καλύτερη δυνατή αξιοποίησή των φύλλων προς παραγωγή ωφέλιμων

προϊόντων για τον άνθρωπο με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος, συνεπώς και την ανατίμησή τους.

1.1.3 Βιοδραστικές ουσίες στα φύλλα ελιάς

Η ελιά (*olea europaea*) είναι ένα δέντρο ανθεκτικό και αιωνόβιο, χάρη στην ύπαρξη πολυφαινόλων σε όλα τα μέρη του. Οι σημαντικότερες από τις ενώσεις αυτές είναι η ελαιοευρωπεΐνη (*oleuropein*) και η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη). Μεταξύ άλλων, στο εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς, έχουν απομονωθεί επίσης και άλλοι 3,4-διυδροξυφαινυλεστέρες και γλυκοζίδια φλαβονοειδών, κυρίως της ρουτίνης και λουτεολίνης^[15,16]. Αρκετά από τα συστατικά του φύλλου της ελιάς και ειδικότερα, η ελαιοευρωπεΐνη, η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και οι εστέρες τους, καθώς και ορισμένα φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό και το βανιλικό, υπάρχουν στον καρπό και το λάδι της ελιάς^[17].

Οι ιδιότητες των φύλλων της ελιάς έχουν αποδοθεί κατά κύριο λόγο στα ιριδοειδή του φύλλου της ελιάς και ειδικότερα, στα σεκοϊριδοειδή ελαιοευρωπεΐνη και υδροξυτυροσόλη^[15,16]. Η ελαιοευρωπεΐνη βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και τα προστατεύει από τις ασθένειες και τις δύσκολες συνθήκες, κυρίως τον χειμώνα, καθώς και από παθογόνους μύκητες και κεντρίσματα εντόμων, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης αλλά και της πικρής της γεύσης. Οι δύο αυτές ουσίες είναι γνωστές και για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες^[18], ενώ το συνολικό εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δύο αυτά συστατικά^[16].

Η ελαιοευρωπεΐνη είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης (*secoiridoid glucoside*), χαρακτηριστικός των ολεασών (*oleaceae*). Ανακαλύφθηκε ως ξεχωριστή ουσία το 1908 από τους Bourquelot και VintileSCO στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (*elenolic acid*). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιόκαρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (*Veer WLC, U.S. Patent 3,033,877*)^[19,20,21].

Η ελαιοευρωπεΐνη βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς και τον ελαιόκαρπο. Η περιεκτικότητά σε ελαιοευρωπεΐνη είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους ελαιόκαρπους και στην ουσία αυτή, οφείλεται κυρίως η έντονα πικρή γεύση τους. Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells, σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης, επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της (Παράρτημα Α, Εικόνα Α.1). Οι συγγραφείς παρέχουν επίσης τις υδρολυτικές αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της (Παράρτημα Α, Εικόνα Α.2). Στην ίδια εργασία, περιγράφουν μια μέθοδο απομόνωσής της από τις ελιές. Χρησιμοποίησαν την τεχνική

της εκχύλισης κατ' αντιρροή (counter-current extraction) και απομόνωσαν 7,2 g σχεδόν καθαρής ουσίας από 500 g καρπών μιας ποικιλίας ελιάς (Manzanillo)^[22].

Τα συστατικά των φύλλων της ελιάς είναι αναλυτικά: (α) **φαινολικά**: 3,4-διυδροξυφαινυλεστέρες/ σεκοϊριδοειδείς γλυκοζίτες/ ιριδοειδή μονοτερπένια/ φαινόλες (ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτοροσόλη (3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη), τυροσόλη, διμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνη, μεθυλεστέρας ελαιοσίδης (γλυκοσίδα του ελενολικού οξέος), 7,11-διμεθυλεστέρας της ολεοσίδης (γλυκοσίδα του μεθυλεστέρα του ελεανολικού οξέος), ελαιοροσίδα, λιγκτροσίδα (p-HPEA), αγλυκόνιο της λιγκτροσίδης (p-HPEA-EA), βερμπασκοσίδα, δι-αλδεΐδες του αγλυκόνου της ελαιοευρωπεΐνης (4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA, 4-DHPEA-EA)), φαινολικά οξέα (καφεϊκό, βανιλικό, κουμαρικό, πρωτοκατεχικό, συριγικό, γαλλικό, φερουλικό), (β) **τριτερπένια**: ελενολικό οξύ, ολεανολικό οξύ, μασλινικό οξύ, β-αμυρίνη, (γ) **χαλκόνες**: ολιβίνη, ολιβίνη-4'-Ο-διγλυκοζίτης, (δ) **κουμαρίνες**: σκοπολεΐνη, αισκουλίνη, (ε) **αλκαλοειδή**: παράγωγα κινγχοΐνης, παράγωγα κινγχοΐδινης, (ζ) **φλαβονοειδή/ γλυκοζίδια φλαβονοειδών**: ρουΐνη, λουτεολίνη, γλυκοζίδια λουτεολίνης, κατεχίνη, κουερσεΐνη, καμφερόλη, ολεασίνη, ολεοκανθάλη, χρυσοερίολη, απιγενίνη και παράγωγα. Αναλυτικά, οι χημικοί τύποι των ουσιών που περιέχονται στα φύλλα καθώς και σε όλο το δέντρο της ελιάς απεικονίζονται στην Εικόνα Α.4 του Παραρτήματος Α^[23].

Δύο από τα υποπροϊόντα της ελαιοευρωπεΐνης είναι επίσης παρόντα στα φύλλα της ελιάς. Πρόκειται για τη διμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνη, η οποία διαφέρει από την ελαιοευρωπεΐνη κατά μία ελεύθερη ομάδα καρβοξυλίου στον δακτύλιο πυρανόζης, και τον μεθυλεστέρα ελαιοσίδης, γνωστό επίσης ως γλυκοσίδα του ελενολικού οξέος. Οι δύο αυτές όξινες ενώσεις αποτελούν δείκτες ωρίμανσης της ελιάς. Η σχετική ποσότητα τους, όσον αφορά την ελαιοευρωπεΐνη, αυξάνεται στην πραγματικότητα μόλις η ωρίμανση προχωρά, ενώ η ποσότητα της ελαιοευρωπεΐνης μειώνεται. Αυτό συνδέεται με την αύξηση της δραστηριότητας των υδρολυτικών ενζύμων με την πρόοδο της ωρίμανσης, ιδιαίτερα της δραστηριότητας των εστερασών, υπεύθυνη για την υδρόλυση των δύο εστερικών δεσμών της ελαιοευρωπεΐνης.

1.1.4 Χρήση φύλλων ελιάς

Η πρώτη επίσημη αναφορά για τη χρήση των φύλλων της ελιάς στην ιατρική χρονολογείται από το 1854, όταν ο Hanbury ανέφερε στη Pharmaceutical Journal μια απλή συνταγή για τη χρήση του υδατικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς ως αντιπυρετικό. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για τη σύσταση και δράση των φύλλων της ελιάς^[24]. Ειδικότερα, αναφέρονται αντιοξειδωτική^[15,16,18], αντιμικροβιακή^[15,25], αντιυπερτασική^[15,17,26,27], αγγειοδιασταλτική^[28] και υπογλυκαιμική^[29] δράση για το εκχύλισμα των φύλλων ή για μεμονωμένα συστατικά του.

Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες, όπως και διάφορα παράγωγά τους, έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της «συγκόλλησης» των αιμοπεταλίων (blood platelet aggregation)^[30]. Ακόμη, η ελαιοευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη είναι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, αντινεοπλασματικοί παράγοντες, αναστολείς της NF-kappaB και επαγωγείς απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)^[31,32,33].

Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς (Olive Leaf Extract ή OLE) χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής. Η συνιστώμενη χρήση του είναι ως αντιμικροβιακό και ενισχυτικό του ανοσοποιητικού συστήματος. Ειδικότερα, η κατανάλωση του εκχυλίσματος του φύλλου ελιάς συνιστάται για ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, ή ως φυσικό αντιμικροβιακό σε μυκητιάσεις και σε ιώσεις όπως η γρίπη, τον έρπη και σε λοιμώξεις ματιών όπως η επιπεφυκίτιδα, ή για τη χρόνια κόπωση. Οι περιεχόμενες ουσίες είναι εξαιρετικά βιοδιαθέσιμες, με την απορρόφηση του αγλυκόνου της λιγκστροσίδης, της υδροξυτυροσόλης, της τυροσόλης και του αγλυκόνου της ελαιοευρωπεΐνης να είναι 55 - 60% σε ανθρώπους^[23].

Τα φύλλα ελιάς αποτελούν μια άφθονη και φθηνή πρώτη ύλη για την παραλαβή δραστικών συστατικών με φαρμακευτική δράση. Ορισμένες από τις ουσίες αυτές, όπως η ελαιοευρωπεΐνη και η υδροξυτυροσόλη, υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες και στο ελαιόλαδο, το οποίο όμως, λόγω της διατροφικής και οικονομικής του αξίας, δεν προσφέρεται για την παραλαβή ουσιών. Οι πρώτες ενδείξεις για τη δυνατότητα χρήσης των συστατικών των φύλλων της ελιάς για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές.

1.1.5 Αντιοξειδωτική δράση

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν κυτταρική βλάβη και ιστική καταστροφή στον οργανισμό, μέσω της οξειδωσης. Πρόκειται για άτομα ή μόρια με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η σπουδαιότερη ομάδα ελεύθερων ριζών στους οργανισμούς είναι αυτές που παράγονται από το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species ή ROS). Παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα είτε ως οξειδωτικά είτε ως αναγωγικά^[34] και ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο, ασκούν ευεργετικές επιδράσεις, όπως στη μεταγραφή γονιδίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και την κυτταρική απόσταση, σε υψηλές συγκεντρώσεις, αποσπών ηλεκτρόνια από τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και προοδευτικά, οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία, γήρανση, καρκίνο και θάνατο^[35,36]. Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν δίνοντας ηλεκτρόνια σε ελεύθερες ρίζες, χωρίς να μετατραπούν τα ίδια σε ουσίες σάρωσης ηλεκτρονίων, καθυστερώντας έτσι ή εμποδίζοντας την οξειδωση. Συμμετέχουν επίσης σε μηχανισμούς που επιδιορθώνουν

το DNA και διατηρούν την υγεία των κυττάρων, διατηρώντας την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Από τα συστατικά των φύλλων της ελιάς, αυτά με αντιοξειδωτική δράση είναι: (α) **φαινολικά**: 3,4-διυδροξυφαινουλεστέρες/ σεκοϊριδοειδείς γλυκοζίτες/ ιριδοειδή μονοτερπένια/ φαινόλες (ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτοροσόλη (3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη), τυροσόλη, 7,11-διμεθυλεστέρας της ολεοσίδης (γλυκοσίδη του μεθυλεστέρα του ελεανολικού οξέος), λιγκτροσίδη (p-HPEA), αγλυκόνιο της λιγκτροσίδης (p-HPEA-EA), βερμπασκοσίδη, δι-αλδεΐδες του αγλυκόνου της ελαιοευρωπεΐνης (4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA, 4-DHPEA-EA)), φαινολικά οξέα (καφεϊκό, βανιλικό, κουμαρικό, πρωτοκατεχικό, συριγγικό, γαλλικό, φερουλικό), (β) **τριτερπένια**: ολεανολικό οξύ, μασλινικό οξύ, β-αμυρίνη, (γ) **κουμαρίνες**: σκοπολετίνη, αισκουλίνη, (δ) **αλκαλοειδή**: παράγωγα κινγχονίνης, παράγωγα κινγχονιδίνης, (ε) **φλαβονοειδή/ γλυκοζίδια φλαβονοειδών**: ρουτίνη, λουτεολίνη, γλυκοζίδια λουτεολίνης, κατεχίνη, κουερσετίνη, καμφερόλη, ολεασίνη, ολεοκανθάλη, χρυσοεριόλη, απιγενίνη και παράγωγα^[7,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54].

Η ελαιοευρωπεΐνη αναστέλλει δραστικά και ανάλογα τη δόση την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) που προκαλείται από θειικό χαλκό. Αυξάνει την ικανότητα της LDL να αντιστέκεται στην οξείδωση και ταυτόχρονα, μειώνει τα επίπεδα στο πλάσμα της ολικής, ελεύθερης και εστεροποιημένης χοληστερόλης. Έχει τόσο την ικανότητα να εξουδετερώνει το νιτρικό οξείδιο, όσο και να προκαλέσει αύξηση της επαγωγίσιμης έκφρασης συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS) στο κύτταρο. Ακόμη, εξουδετερώνει το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), μία οξειδωτική ουσία που παράγεται in vivo από ουδετερόφιλη μυελοϋπεροξειδάση σε σημείο που εμφανίζεται κάποια φλεγμονή και μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων^[23].

Οι ελεύθερες ρίζες, όπως το ABTS^{•+} (2,2'-αζινοδις- (3-αιθυλβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)) και DPPH[•] (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ) χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων. Τεχνικές για την αξιολόγηση της δραστηριότητας σάρωσης έναντι αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου που παράγονται in vivo, για παράδειγμα, υποχλωριώδες οξύ (HOCl), υπεροξείδιο ανιόν (O₂⁻) και νιτρικό οξείδιο (NO[•]), χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη αντιοξειδωτικών επιδράσεων στις βιοχημικές διεργασίες.

Επιπλέον, οι ρίζες υπεροξυλίου, οι οποίες είναι κοινά προϊόντα αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδωτικών διεργασιών σε βιολογικά συστήματα, μπορούν να παραχθούν in vitro με θερμική αποσύνθεση του AAPH (2,2-αζόβι (2-αμιδινοπρόπιο) διϋδροχλωρίδιο), μιας υδατοδιαλυτής αζο-ένωσης. Αυτή η γεννήτρια ριζών χρησιμοποιείται για την επαλήθευση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ενός δείγματος έναντι της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από υπεροξυλική ρίζα σε συστήματα κυτταρικών μοντέλων, όπως ερυθροκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα, επίσης γνωστά ως

ερυθρά αιμοσφαίρια, έχουν απλή δομή και είναι ευαίσθητα σε οξειδωτική βλάβη, όπως οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών και αιμόλυση^[55,56,57,58].

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται συνήθως σε IC50, δηλαδή τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειώσει την αρχική συγκέντρωση της εκάστοτε προστιθέμενης ρίζας κατά 50%. Ένα μέτρο σύγκρισης παρέχουν ουσίες που ονομάζονται positive controls, για τις οποίες επαναλαμβάνεται η μέτρηση. Τέτοιες ουσίες είναι η α-τοκοφερόλη, η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το ασκορβικό οξύ. Το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης σε σχέση με τα controls δίνεται από τη σχέση:

$$\% \text{ radical scavenging activity} = \frac{(\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}) \times 100}{\text{control absorbance}} \quad [55] \quad (1)$$

Σύμφωνα με τους Phongraichit και συνεργάτες, ουσίες που έχουν τιμές IC50 σε ένα εύρος από 50 έως 100 µg/ ml θεωρείται πως παρουσιάζουν μεσαία αντιοξειδωτική δράση, ενώ ουσίες που έχουν τιμές από 10 έως 50 µg/ ml θεωρείται πως παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση^[56,59]. Η κατηγοριοποίηση φαίνεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1: Αντιοξειδωτική δράση σύμφωνα με τους Phongraichit et al^[56].

IC50 (µg/ ml)	Χαρακτηρισμός αντιοξειδωτικής δράσης
10 – 50	Ισχυρή
50 - 100	Μεσαία
>100	Αδύναμη

Μία άλλη μέθοδος μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης βασίζεται στο Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμανικό-2-καρβοξυλικό οξύ). Πρόκειται για την Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ή TEAC, με μονάδες μέτρησης τα ισοδύναμα Trolox (TE) π.χ. mg TE/ 100 g ξηρού βάρους (dry weight).

Σε μία μελέτη, η ανάλυση FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power, μετράει την αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της αναγωγής τρισθενούς σιδήρου (Fe³⁺) σε δισθενή(Fe²⁺)) έδωσε 281,8 ± 22,8 mg ισοδύναμα Trolox/ g dw και το εκχύλισμα (OLE) ανέστειλε το ABTS^{•+} (IC50 = 16,1 ± 1,2 µg/ mL) και το DPPH[•] (IC50 = 13,8 ± 0,8 µg/ mL). Ακόμη, το OLE επέδειξε αποτελεσματική ικανότητα απομάκρυνσης O₂^{•-} (IC50 = 52,6 ± 2,1 µg/ mL), NO[•] (IC50 = 48,4 ± 6,8 µg/ mL) και HOCl (IC50 = 714,1 ± 31,4 µg/ mL), ανέστειλε την αιμόλυση που προκαλείται από υπεροξυλική ρίζα (IC50 = 11,5 ± 1,5 µg/ mL), σχημάτισε TBARS (IC50 = 38,0 ± 11,7 µg/ mL) και οξείδωσε αιμοσφαιρίνη (IC50 = 186,3 ± 29,7 µg/ mL) σε ερυθροκύτταρα^[58]. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως το OLE έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση in vitro και μεσαία προς ισχυρή in vivo.

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (OLE) και ορισμένων εκ των ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς καταγράφεται στον Πίνακα 1.2 σε ισοδύναμα Trolox (TEAC). Είναι εμφανές πως τα πιο αποτελεσματικά είναι τα

φλαβονοειδή ρουτίνη, λουτεολίνη και κατεχίνη. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν τη σπουδαιότητα της δομής Β-δαχτυλίου της κατεχόλης (ρουτίνη, λουτεολίνη, κατεχίνη), της παρουσίας της ομάδας ελεύθερου 3-καρβοξυλίου (ρουτίνη και κατεχίνη) και του 2,3-διπλού δεσμού συζευγμένου με τη λειτουργία 4-οξο ή 4-οξο function (ρουτίνη και λουτεολίνη) στην ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης. Η τιμή TEAC για το OLE δείχνει πως οι περιεχόμενες ενώσεις δρουν συνεργιστικά στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών όταν αναμειγνύονται, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του OLE^[60].

Πίνακας 1.2: Η αντιοξειδωτική δράση σε ισοδύναμα Trolox (TEAC) του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (OLE) και ορισμένων εκ των ενώσεων που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς.

Ένωση	TEAC (mg/ l)
OLE	395 ± 15,0
Oleuropein	220 ± 22,5
Tyrosol	87,6 ± 12,5
Hydroxytyrosol	393 ± 30,0
Verbascoside	255 ± 17,5
Apigenin-7-glucoside	105 ± 7,51
Luteolin-7-glucoside	178 ± 10,0
Diosmetin-7-glucoside	160 ± 22,5
Luteolin	563 ± 27,5
Diosmetin	355 ± 17,5
Rutin	688 ± 12,5
Catechin	571 ± 10,0
Vanillin	32,5 ± 2,50
Vanillic acid	168 ± 22,5
Caffeic acid	343 ± 20,0

1.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών

1.2.1 Εκχύλιση φυτικών προϊόντων

Οι βιοδραστικές ενώσεις εξελίσσονται για πάνω από ένα δισεκατομμύριο χρόνια και έχουν αποκτήσει μία εξαιρετική δομική ποικιλότητα και λειτουργική αξία. Παράγονται φυσικά, από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, με στόχο να καλύψουν τις ανάγκες τους, και από τότε που οι άνθρωποι αντιλήφθηκαν τα οφέλη που μερικές από αυτές μπορούν να έχουν στην υγεία τους, όπως για παράδειγμα, στη θεραπεία ασθενειών, η ανάγκη για αυτές αυξήθηκε πάνω από το όριο διαθεσιμότητάς τους στη φύση. Η συνθετική εκδοχή τέτοιων ουσιών είναι διαθέσιμη για ανθρώπινη κατανάλωση ήδη από τη δεκαετία του 1940, αλλά δεν κάλυψε τη ζήτηση παρά μέχρι τις τελευταίες δεκαετίες.

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική έρευνα και η συζήτηση μεταξύ των καταναλωτών έχουν ενταθεί γύρω από το κατά πόσο τα συνθετικά θρεπτικά συστατικά,

όπως για παράδειγμα, οι βιταμίνες, είναι ισάξια με αυτά που προέρχονται απευθείας από τα φυτά ή άλλες πρώτες ύλες. Ένα επιχείρημα είναι πως μια φυσική πηγή περιέχει συμπαραγόντες που συνοδεύουν τη θρεπτική ουσία στη φύση. Για παράδειγμα, ορισμένοι συμπαραγόντες που συνήθως απαντώνται στη βιταμίνη C είναι διάφορα βιοφλαβονοειδή, τα οποία είναι απαραίτητα για καλύτερη απορρόφηση, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα κατά 30%. Φυσικοχημικές διαφορές μεταξύ ορισμένων φυσικών και συνθετικών βιταμινών, καθώς και αποδεδειγμένα κλινικά πλεονεκτήματα των φυσικών βιταμινών συνηγορούν στο ότι οι φυσικές βιταμίνες υπερέχουν των συνθετικών^[61]. Ακόμη, τα φυσικά προϊόντα από φαρμακευτικά φυτά, είτε ως καθαρές ενώσεις είτε ως τυποποιημένα εκχυλίσματα, παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για νέα φάρμακα, λόγω της απaráμιλλης διαθεσιμότητας χημικής ποικιλομορφίας^[62].

Το ενδιαφέρον για φυσικά αντιοξειδωτικά καθορίζεται από την καθολικότητα της δράσης τους σε διάφορα συστήματα οξειδοαναγωγής και κατά συνέπεια, σε ένα ευρύ φάσμα πιθανών εφαρμογών: αντιοξειδωτικά φυτοχημικά θεωρούνται λειτουργικά συστατικά για φαρμακευτικά προϊόντα, λειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής, ζωοτροφές, καλλυντικά κ.α.. Για παράδειγμα, το ενδιαφέρον για χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών για τη σταθεροποίηση τροφίμων που περιέχουν λιπίδια έχει αυξηθεί θεαματικά, λόγω της πιθανής τοξικότητας των συνθετικών αντιοξειδωτικών, αλλά και της προτίμησης των καταναλωτών στα φυσικά πρόσθετα τροφίμων.

Τα φυτοχημικά βιοσυντίθενται ως δευτερεύοντες μεταβολίτες από τα χιλιάδες είδη του φυτικού βασιλείου. Πρέπει να απομονωθούν, κλασματωθούν, διαχωριστούν και καθαριστούν και στη συνέχεια, να προσδιοριστούν οι χημικές δομές και να χαρακτηριστούν οι ιδιότητές τους *in vitro*, *in vivo* και *in situ*, αλλά και οι τρόποι εφαρμογής τους στην παραγωγή προϊόντων^[63].

Το πιο σημαντικό βήμα στην ανάλυση των συστατικών που υπάρχουν σε βοτανικά και φυτικά παρασκευάσματα είναι η εκχύλιση. Τα φυτικά υλικά πλένονται, ξηραίνονται με θέρμανση ή κατάψυξη και αλέθονται για τη λήψη ομοιογενούς δείγματος, βελτίωση της κινητικής της αναλυτικής εκχύλισης και αύξηση της επιφάνειας επαφής του δείγματος με το σύστημα διαλυτών. Η επιλογή του συστήματος διαλυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση της βιοδραστικής ένωσης που στοχεύεται. Η εκχύλιση υδρόφιλων ενώσεων απαιτεί πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη ή ο οξικός αιθυλεστέρας. Για εκχύλιση περισσότερο λιπόφιλων ενώσεων, χρησιμοποιείται διχλωρομεθάνιο ή μείγμα διχλωρομεθανίου/ μεθανόλης σε αναλογία 1:1. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εκχύλιση με εξάνιο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση της χλωροφύλλης. Σε κάθε περίπτωση, αν το εκχύλισμα προορίζεται για ανθρώπινη χρήση, το σύστημα διαλυτών πρέπει να χαρακτηρίζεται ως κατάλληλο για τρόφιμα (food grade solvent).

Καθώς οι στοχευόμενες ενώσεις μπορεί να είναι μη πολικές έως πολικές και θερμικά ασταθείς, πρέπει να εξεταστεί η καταλληλότητα των μεθόδων εκχύλισης^[62].

Οι κλασικές τεχνικές βασίζονται στην ικανότητα εκχύλισης των διαφορετικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται, καθώς και την εφαρμογή θερμότητας ή/ και ανάμιξης. Για την απόκτηση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά, οι υπάρχουσες κλασικές τεχνικές είναι:

- Εκχύλιση Soxhlet,
- Διαβροχή με κατάλληλο διαλύτη
- Υδροαπόσταξη^[2,4].

Άλλες μέθοδοι είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους ή μικροκύματα και η θέρμανση υπό κάθετο ψυκτήρα. Μια σύντομη περίληψη των πειραματικών συνθηκών για τις διάφορες μεθόδους εκχύλισης παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.3^[62].

Πίνακας 1.3: Πειραματικές συνθήκες για διάφορες μεθόδους εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από φυτικά υλικά.

	Εκχύλιση Soxhlet	Εκχύλιση με υπερήχους	Εκχύλιση με διαβροχή
Συνήθεις χρησιμοποιούμενοι διαλύτες	Μεθανόλη, Αιθανόλη ή Μείγμα Αλκοόλης - Νερού	Μεθανόλη, Αιθανόλη ή Μείγμα Αλκοόλης - Νερού	Μεθανόλη, Αιθανόλη ή Μείγμα Αλκοόλης - Νερού
Θερμοκρασία (°C)	Εξαρτάται από τον διαλύτη	Μπορεί να θερμανθεί	Θερμοκρασία δωματίου
Επιβαλλόμενη πίεση	Δεν εφαρμόζεται	Δεν εφαρμόζεται	Δεν εφαρμόζεται
Απαιτούμενος χρόνος	3 – 18 h	1 h	3 – 4 μέρες
Απαιτούμενος όγκος διαλύτη (ml)	150 - 200	50 - 100	Εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος

Οι κύριες προκλήσεις της συμβατικής εκχύλισης είναι ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης, η απαίτηση δαπανηρού και υψηλής καθαρότητας διαλύτη, η απομάκρυνση της τεράστιας ποσότητας διαλύτη, η χαμηλή εκλεκτικότητα εκχύλισης και η θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης, εισάγονται νέες και πολλά υποσχόμενες τεχνικές. Αυτές οι τεχνικές αναφέρονται ως μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.

Μερικές από τις πιο πολύ υποσχόμενες τεχνικές είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από ηλεκτρικό πεδίο, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό και η υγρή εκχύλιση υπό πίεση. Ορισμένες από αυτές τις τεχνικές θεωρούνται «πράσινες», καθώς περιλαμβάνουν λιγότερο επικίνδυνη χημική σύνθεση, σχεδιασμό ασφαλέστερων χημικών ουσιών και διαλυτών, σχεδιασμό για ενεργειακή απόδοση, χρήση ανανεώσιμης πρώτης ύλης, μείωση παραγώγων, κατάλυση, σχεδιασμό για πρόληψη της υποβάθμισης, οικονομία ατόμου και ανάλυση χρόνου για την πρόληψη της ρύπανσης και εγγενώς ασφαλέστερη χημεία για την πρόληψη ατυχημάτων^[64].

Οι άλλες σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης περιλαμβάνουν εκχύλιση στερεάς φάσης^[62], χρήση μεμβρανών^[65] και τεχνικές μεσολάβησης επιφανειοδραστικών ενώσεων, οι οποίες διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα. Αυτά είναι η μείωση στην κατανάλωση διαλύτη και στην υποβάθμιση του δείγματος, η εξάλειψη του επιπρόσθετου σταδίου καθαρισμού και συμπύκνωσης του δείγματος πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, η βελτίωση της αποτελεσματικότητας εκχύλισης, της επιλεκτικότητας ή/ και της κινητικής της εκχύλισης. Η ευκολία αυτοματισμού αυτών των τεχνικών ευνοεί επίσης τη χρήση τους για την εκχύλιση φυτικών υλικών^[62].

Είναι ζωτικής σημασίας να αναπτυχθεί ένας κοινός, ακριβής τρόπος που θα επιτρέψει την εκχύλιση όλων των ενεργών συστατικών ανεξάρτητα από την προέλευσή τους και τη θέση τους στην πρώτη ύλη. Εκτός αυτού, η νέα μέθοδος θα πρέπει να έχει την υψηλότερη οικονομική αξία σε σύγκριση με τις παρούσες εφαρμογές, πράγμα που σημαίνει ότι η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης πρέπει να είναι αποδεκτή και σε βιομηχανική κλίμακα. Παρόλο που μέχρι στιγμής έχουν βελτιωθεί πολλές μέθοδοι, μέχρι τώρα, φαίνεται απίθανο να επιτευχθεί μια τυποποιημένη λύση με υψηλή αξιοποίηση για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτά^[66].

1.2.2 Εκχύλιση με διαλύτες τρίτης γενιάς

Όπως προαναφέρθηκε, η ανάπτυξη μίας τεχνικά και οικονομικά εφικτής οδού για την απομόνωση ενώσεων προστιθέμενης αξίας από φυτικά υλικά είναι η τρέχουσα αναγκαιότητα. Εκχυλίσματα που χρησιμοποιούν νεωτερικούς διαλύτες (τρίτης γενιάς), όπως επιφανειοδραστικά, υδρότροπα και ιοντικά υγρά, είναι τέτοιες πράσινες διαδρομές διαθέσιμες για μία επιλεκτική, γρήγορη, ενεργειακά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων. Αυτοί οι διαλύτες έχουν βελτιωμένη επιλεκτικότητα, εύκολη ανάκτηση, εύκολη επαναχρησιμοποίηση και φιλική προς το περιβάλλον φύση. Η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Επιπλέον, η τεχνική εκχύλισης με διαλύτη μπορεί να συνδυαστεί με εκχύλιση με μικροκύματα ή υπερήχους^[67].

1.2.2.1 Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά (ΙΥ) είναι άλατα σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασίες κάτω των 100 °C και αποτελούνται συνήθως από μεγάλα και ασύμμετρα οργανικά κατιόντα και οργανικά ή ανόργανα ανιόντα. Πέρα από την εξαιρετική χημική, θερμική και ηλεκτροχημική σταθερότητα, μη ευφλεκτότητα και αμελητέα πτητικότητα, που χαρακτηρίζουν τα περισσότερα απρωτικά ΙΥ, τα ΙΥ έχουν εξαιρετική ικανότητα διάλυσης για ένα ευρύ φάσμα ενώσεων.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα ΙΥ έχουν εξελιχθεί από πιθανούς διαλύτες για την επεξεργασία/ πλήρη διάλυση της βιομάζας, σε επιλεκτικούς διαλύτες για την εκχύλιση και τον καθαρισμό φυσικά προερχόμενων ενώσεων. Εκτός από την εξαιρετική

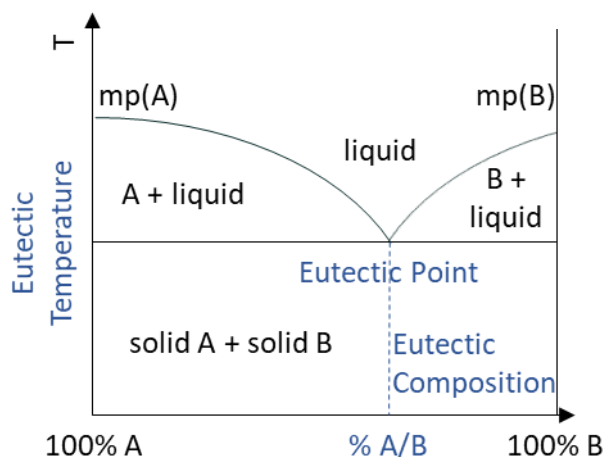
ικανότητα διάλυσης, δεδομένου ότι τα ΙΥ μπορούν να διογκώσουν ή να διαλύσουν τις υδρόφιλες μικροίνες κυτταρίνης σε ένα ευρύ φάσμα μητρών βιομάζας, επιτρέποντας έτσι ευκολότερη πρόσβαση στις ενώσεις στόχους, τα υδατικά διαλύματά τους εμφανίζουν επίσης βελτιωμένη και μοναδική απόδοση διαλυτοποίησης, όπως αποδεικνύεται από την εξαιρετική υδροτροπική τους φύση και την επιφανειοδραστικότητά τους, που επιτρέπει βελτιωμένες εκχυλίσεις.

Επιπλέον, τα ΙΥ έχουν αναγνωρισθεί ως διαλύτες σχεδιασμού, αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού συνδυασμών ιόντων και της δυνατότητας σχεδιασμού ΙΥ με συγκεκριμένες ιδιότητες. Αυτό το χαρακτηριστικό ξεπερνά την περιορισμένη επιλεκτικότητα των κοινών πτητικών οργανικών διαλυτών και με αυτόν τον τρόπο, επιτρέπει την ανάπτυξη περισσότερο αποτελεσματικών συστημάτων διαλυτών. Η αντικατάσταση των πτητικών οργανικών διαλυτών από μη πτητικά ΙΥ εξαλείφουν επίσης τις απώλειες διαλύτη στην ατμόσφαιρα, μειώνοντας τόσο το περιβαλλοντικό αποτύπωμα, όσο και το κόστος της διαδικασίας^[68].

Η πρώτη γενιά των ιοντικών υγρών περιελάμβανε ΙΥ με μοναδικές φυσικές ιδιότητες. Η δεύτερη ΙΥ με στοχευμένες χημικές και επιλεγμένες φυσικές ιδιότητες. Η νέα, τρίτη, γενιά περιλαμβάνει ΙΥ με στοχευμένες βιολογικές ιδιότητες, συνδυασμένες με επιλεγμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες^[69].

1.2.2.2 Βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες

Οι Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs) είναι συστήματα που σχηματίζονται από ένα ευτηκτικό μείγμα Lewis ή Brønsted οξέων και βάσεων, τα οποία μπορούν να περιέχουν μια ποικιλία ανιόντων ή/ και κατιόντων. Κατατάσσονται ως τύποι ιοντικών διαλυτών με ειδικές ιδιότητες. Ενσωματώνουν μία ή περισσότερες ενώσεις σε μορφή μείγματος, για να δώσουν ένα ευτηκτικό μείγμα με σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από οποιοδήποτε από τα μεμονωμένα συστατικά^[70], όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1: Οπτική αναπαράσταση διαγράμματος φάσεων βαθύ ευτηκτικού διαλύτη δύο συστατικών (δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου). Ο κάθετος είναι ο άξονας της θερμοκρασίας και ο οριζόντιος ο άξονας της μολαρικής αναλογίας ως προς το συστατικό Β. Το ευτηκτικό σημείο είναι χαμηλότερο των σημείων τήξης του δότη και του δέκτη. $m_p(A)$: melting point/ σημείο τήξης του Α, $m_p(B)$: σημείο τήξης του Β, Eutectic Temperature: Χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία τήξης για όλες τις αναλογίες ανάμιξης των συστατικών, Eutectic Point: Ευτηκτικό Σημείο, Eutectic Composition: Μολαρική Αναλογία για την οποία το μείγμα των δύο συστατικών έχει το χαμηλότερο σημείο τήξης.

Οι ευτηκτικοί διαλύτες πρώτης γενιάς βασίστηκαν σε μείγματα αλάτων τεταρτοταγούς αμμωνίου με δότες δεσμών υδρογόνου όπως αμίνες και καρβοξυλικά οξέα. Υπάρχουν τέσσερις τύποι ευτηκτικών διαλυτών^[71], που καταγράφονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4: Τύποι ευτηκτικών διαλυτών.

Τύπος I	Άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου + χλωριούχο μέταλλο
Τύπος II	Άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου + ένυδρο χλωριούχο μέταλλο
Τύπος III	Τεταρτοταγές άλας αμμωνίου + δότης δεσμού υδρογόνου
Τύπος IV	Ένυδρο χλωριούχο μέταλλο + δότης δεσμού υδρογόνου

Σε αντίθεση με τους συνηθισμένους διαλύτες, όπως οι πτητικές οργανικές ενώσεις (Volatile Organic Compounds ή VOCs), οι DESs έχουν πολύ χαμηλή τάση ατμών και, ως εκ τούτου, δεν είναι εύφλεκτοι^[72] και δεν εισέρχονται στην ατμόσφαιρα, δεν οξειδώνονται και δε δεσμεύουν όζον. Επίσης, έχουν σχετικά υψηλά ιξώδη, που μπορεί να εμποδίσουν τις βιομηχανικές εφαρμογές τους, ευνοϊκά χαμηλές πυκνότητες και μπορούν να είναι υγροί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών^[73]. Σε σύγκριση με τα σύγχρονα ιοντικά υγρά, που βασίζονται σε διακριτά ανιόντα και αποτελούν ιοντικές ενώσεις, όπως το διτριφλιμίδιο, οι DESs είναι φθηνότεροι και μερικές φορές, βιοαποικοδομήσιμοι. Επομένως, οι DESs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ασφαλείς, αποδοτικοί, απλοί και χαμηλού κόστους διαλύτες. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν πολλές εφαρμογές που έχουν μελετηθεί για DESs. Μεταβάλλοντας τα συστατικά των DESs και τη σχετική αναλογία δότη/ δέκτη δεσμού υδρογόνου, μπορούν να παραχθούν νέοι DESs. Για τον λόγο αυτό, πολλές νέες εφαρμογές παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία κάθε χρόνο.

Μερικές από τις πρώτες εφαρμογές των DESs ήταν η ηλεκτροφύτευση μετάλλων, χρησιμοποιώντας DESs ως ηλεκτρολύτες^[74]. Οργανικές ενώσεις όπως το βενζοϊκό οξύ ή η κυτταρίνη έχουν μεγάλη διαλυτότητα στους DESs^[75]. Μελετήθηκαν επίσης για την εφαρμογή τους στην παραγωγή και τον καθαρισμό του βιοντίζελ^[76,77] και την ικανότητά τους να εξαγουν μέταλλα^[78]. Η ενσωμάτωση θέρμανσης μικροκυμάτων με βαθύ ευτηκτικό διαλύτη μπορεί να αυξήσει αποτελεσματικά την ισχύ διαλυτότητας του DES

και να μειώσει τον χρόνο που απαιτείται για την πλήρη διάλυση βιολογικών δειγμάτων σε ατμοσφαιρική πίεση^[79].

1.2.3 Εκχύλιση φύλλων ελιάς

Οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση βιομορίων από φύλλα ελιάς είναι οι συμβατικές και οι μη συμβατικές που παρουσιάστηκαν στην Παράγραφο 1.2.1. για την εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων. Τα φύλλα της *olea europaea* L. περιέχουν ποσότητα φαινολικών ενώσεων υψηλότερη από εκείνη που υπάρχει στα φρούτα ή το παρθένο ελαιόλαδο: 1450 mg συνολικών φαινολών/ 100 g φρέσκων φύλλων έναντι 110 mg/ 100 g καρπών και 23 mg/ 100 ml έξτρα παρθένου ελαιολάδου^[80]. Η ελαιοευρωπεΐνη είναι η κυρίαρχη φαινολική ένωση στα φύλλα ελιάς καθώς αποτελεί το 5 - 19% w/w σε υγρή βάση, με τη συγκέντρωση της να φτάνει τα 60 – 90 mg/ g φύλλου σε ξηρή βάση^[23,7]. Τα φλαβονοειδή αποτελούν το 1,8% w/w, το 0,8% των οποίων είναι λουτεολίνη-7-γλυκοσίδη^[23].

Στην εκχύλιση Soxhlet, ο συνδυασμός διαλυτών με νερό δίνει τη μεγαλύτερη απόδοση. Συγκεκριμένα, σύστημα αιθανόλης - νερού 80:20 ανακτά περίπου 13 mg ελαιοευρωπεΐνης/ g ξηρού φύλλου. Συστήνεται επίσης η αύξηση της θερμοκρασίας και η μείωση του pH. Η Soxhlet είναι η πιο δημοφιλής μεταξύ των συμβατικών τεχνικών, προσφέροντας τη μεγαλύτερη ανάκτηση, 62%. Στη διαβροχή, η οποία μπορεί να γίνει με νερό ή αλκοολούχους διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας, ακετόνη), η μεθανόλη είναι ο καλύτερος διαλύτης, αν και πιθανά τοξικός. Η θέρμανση υπό κάθετο ψυκτήρα δείχνει μία σημαντική γραμμική ανοδική πορεία στη συγκέντρωση της ελαιοευρωπεΐνης σε σύγκριση με τις άμεσες τεχνικές εκχύλισης, καθώς προκαλεί δομικές αλλαγές του φυτικού ιστού, υπεύθυνες για τη χαλάρωση των κυτταρινικών δικτύων. Οι μη συμβατικές μέθοδοι, ωστόσο, δίνουν ανάκτηση που κυμαίνεται μεταξύ 80 και 95%^[65].

Σε μία μελέτη, 5 γραμμάρια ξηρών και κονιοποιημένων φύλλων της ποικιλίας Kilis Yaglik εκχυλίστηκαν σε 50 ml μεθανόλης για 4 ώρες, υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Η περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη έφτασε το ποσοστό 6,81% w/w κατά μέσο όρο δειγμάτων νεαρών και ηλικιωμένων δέντρων από όλο το ημερολογιακό έτος. Με άλλες μεθόδους, προέκυψαν 105,30 mg/ g φαινολικών ενώσεων και 73,71 mg/ g φλαβονοειδών σε ξηρή βάση κατά μέσο όρο^[81]. Σε μία δεύτερη μελέτη^[58], 10 γραμμάρια αποξηραμένων/ κονιοποιημένων φύλλων ελιάς υποβλήθηκαν σε απομάκρυνση διαλυτών σε n-εξάνιο ενώσεων χρησιμοποιώντας έναν εκχυλιστή Soxhlet. Το δείγμα υποβλήθηκε σε εκχύλιση με 200 ml μεθανόλης/ νερού (80:20, v/v), υπό ανάδευση στα 170 rpm, προστατευμένο από το φως, στους 25 °C για 24 ώρες. Η περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη ήταν $25,5 \pm 5,2$ mg/ g dw. Με άλλες μεθόδους, προέκυψε συνολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών στα $131,7 \pm 9,4$ mg

ισοδυνάμων γαλλικού οξέος/ g ξηρού βάρους (dw) και $19,4 \pm 1,3$ mg ισοδυνάμων κερκετίνης/ g dw, αντίστοιχα^[58].

Σε μία τρίτη μελέτη, από εκχύλιση με διαλύτη αιθανόλη - νερό (70 - 30) υποβοηθούμενη από υπερήχους ανακτήθηκαν $38,1 \pm 1,8$ mg ελαιοευρωπεΐνης/ g ξηρού φύλλου^[82]. Τέλος, σε μία τέταρτη, τα φύλλα ξηράθηκαν και κονιοποιήθηκαν και 5 g αυτών εκχυλίστηκαν με 50 ml διαφορετικών διαλυτών (80% αιθανόλη, 20% ακετονιτρίλιο, απιονισμένο νερό) με συμβατική εκχύλιση και με υπερήχους. Οι διαλύτες με τα καλύτερα αποτελέσματα από κάθε μέθοδο (80% αιθανόλη, απιονισμένο νερό) συνδυάστηκαν για να προκύψει η καλύτερη μέθοδος, η συμβατική εκχύλιση σε δύο βήματα με αιθανόλη και απιονισμένο νερό.

Πέντε (5) γραμμάρια εκχυλίστηκαν συμβατικά με 50 ml καθαρή αιθανόλη για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το εκχύλισμα ανακτήθηκε και το στερεό υπόλειμμα εκχυλίστηκε ξανά με 50 ml απιονισμένου νερού για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δύο εκχυλίσματα αναμείχθηκαν και ξηράθηκαν σε χαμηλή πίεση. Το εκχύλισμα είχε τις περισσότερες φαινολικές ουσίες και φλαβονοειδή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, καθώς και την ισχυρότερη αντιβακτηριδιακή δράση. Αναλυτικά, προέκυψαν $80,67 \pm 0,47$ mg ελαιοευρωπεΐνης/ g, $169,10 \pm 0,57$ mg φαινολικών/ g και $98,15 \pm 0,7$ mg φλαβονοειδών/ g. Καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν επίσης για ξηρά από ότι για φρέσκα φύλλα. Η ξήρανση αφαιρεί το νερό που περιέχεται στα φύλλα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση των φαινολικών ενώσεων, ειδικά της ελαιοευρωπεΐνης, με ενζυματικές δράσεις.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η χρήση νερού ως συνδιαλύτη με οργανικούς διαλύτες αυξάνει την ποσότητα της εκχυλισμένης ελαιοευρωπεΐνης^[83] και ότι τα μείγματα διαλυτών είναι ικανά να απενεργοποιήσουν τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της ελαιοευρωπεΐνης σε άλλα μόρια^[84]. Επιπλέον, η χρήση νερού σε συνδυασμό με αλκοόλες οδηγεί σε αύξηση της διόγκωσης των φυτικών υλικών και της επιφάνειας επαφής μεταξύ της μήτρας των φυτών και του διαλύτη που βελτιώνει τελικά την απόδοση της εκχύλισης^[83]. Η αναλογία βιομάζας – διαλύτη στη βιβλιογραφία έχει ένα εύρος από 1:10 έως 1:40 κατά βάρος. Αύξηση κατά 10 της αναλογίας του διαλύτη αυξάνει περίπου κατά 2% την απόδοση της εκχύλισης όταν γίνεται από 1:10 στο 1:20 με το ποσοστό αυτό να μειώνεται όσο κινούμαστε προς υψηλότερες αναλογίες. Καλύτερη απόδοση για την ελαιοευρωπεΐνη φαίνεται να έχει η 1:30^[85,86].

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στρέφεται προς τους βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες. Επιπλέον, ορισμένα ζωντανά όντα (σκαθάρια, βάτραχοι, γαιοσκώληκες, πεταλούδες, κλπ.) είναι σε θέση να επιβιώσουν από τις τεράστιες αποκλίσεις θερμοκρασίας μερικών από τα πιο ακραία οικοσυστήματα του πλανήτη μας, επειδή παράγουν μεταβολίτες που, μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως υαλοποίησης, αποτρέπουν την κρυστάλλωση του νερού, η οποία θα οδηγούσε στην καταστροφή των κυττάρων. Αυτές οι ενώσεις, κυρίως σάκχαρα, οργανικά οξέα, παράγωγα χολίνης ή

ουρία, όταν συνδυάζονται σε μια συγκεκριμένη σύνθεση, σχηματίζουν νέα ευτηκτικά μείγματα, που αναφέρονται ως Φυσικοί Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents ή NADESs).

Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλές δομικές δυνατότητες των NADESs και τη δυνατότητα σχεδιασμού των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους, για να προσαρμοστούν σε διαφορετικούς σκοπούς, μπορούν χωρίς καμία αμφιβολία να χαρακτηριστούν «διαλύτες σχεδιασμού». Επί του παρόντος, η χρήση των DESs ως διαλύτες εκχύλισης για φαινολικές ενώσεις και γενικότερα, για την εκχύλιση φυσικών προϊόντων για φαρμακευτικές εφαρμογές είναι μακράν η πιο μελετημένη εφαρμογή. Ένας μεγάλος αριθμός NADESs που βασίζεται σε φυσικές ενώσεις, ιδίως πρωτογενείς μεταβολίτες όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, ουρία και άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου όπως η χλωριούχος χολίνη, έχουν αναφερθεί και δοκιμαστεί^[80]. Οι χημικοί τύποι μερικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση Φυσικών Βαθών Ευτηκτικών Διαλυτών απεικονίζονται στην Εικόνα Β.1 του Παραρτήματος Β.

Οι χλωριούχος χολίνη, L-προλίνη, κιτρικό οξύ, γλυκερόλη, αιθυλιμιδαζόλη και μεθυλιμιδαζόλη χρησιμοποιούνται ως δέκτες δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor), σε συνδυασμό με διάφορους δότες δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor), όπως πολυαλκοόλες (γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη), οργανικά οξέα (γαλακτικό), σάκχαρα (D-σορβιτόλη), αμίδια^[80], ουρία και διμεθυλοουρία.

Στον Πίνακα 1.5, παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνδυασμοί DESs που έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση ξηρών φύλλων ελιάς υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) για 20 min με χλωριούχο χολίνη ως δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA) ή υπό ανάδευση (Homogenizer-Aided Extraction – HAE) για 30 min με άλλους δέκτες, το χρώμα και η μορφολογία, το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου και η απόδοση τους σε ελαιουρωπείνη (Oleuropein). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα ποσοστό νερού μέχρι περίπου 50% κατά βάρος (w/w) μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά το ιξώδες των DESs διατηρώντας ταυτόχρονα το δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Υψηλότερο ποσοστό νερού θα αποδυνάμωνε σταδιακά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του DES.

Πίνακας 1.5: Συνδυασμοί βαθών ευτηκτικών διαλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση ξηρών φύλλων ελιάς, το χρώμα και η μορφολογία, το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου και η απόδοσή τους σε ελαιουρωπείνη^[80,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95].

Σύσταση HBA - HBD	Γραμμομοριακή Αναλογία	Ποσοστό νερού (% w/w)	Χρώμα & Μορφολογία	Ιξώδες (cp)	Oleuropein (mg/ g dw)
ChCl - Ουρία	1:2	0	Άχρωμο διαφανές λάδι	1372,0	ND*

ChCl - Ουρία	1:2	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	113,8	9,79 ± 0,58
ChCl - Γλυκερόλη	1:1	0	Άχρωμο διαφανές λάδι	29,5	1,66 ± 0,0006
ChCl - Αιθυλενογλυκόλη	1:1	0	Άχρωμο διαφανές λάδι	34	0,29 ± 0,0002
ChCl - Αιθυλενογλυκόλη	1:2	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	<26,5	12,06 ± 0,58
ChCl - Αιθυλενογλυκόλη	1:2	43,3	Άχρωμο διαφανές λάδι	<26,5	10,58
ChCl - Γαλακτικό οξύ	1:1	0	Άχρωμο διαφανές λάδι	47,5	0,51 ± 0,0004
ChCl - Γαλακτικό οξύ	1:2	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	14	8,20 ± 1,20
ChCl - Κιτρικό οξύ	1:1	0	Υποκίτρινο ημιστερεό	448,1	ND
ChCl - Οξαλικό οξύ	1:1	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	<120	0,65 ± 0,13
ChCl - Τρυγικό οξύ	2:1	25	-	-	1,92 ± 0,29
ChCl - 1,4- Βουτανοδιόλη	1:6	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	<47	7,85 ± 0,31
ChCl - Ξυλιτόλη	2:1	25	-	-	7,33 ± 0,40
ChCl - 1,2- Προπανοδιόλη	1:1	25	Άχρωμο διαφανές λάδι	37,1	9,88 ± 0,43
ChCl - 1,2- Μαλτόζη	3:1	25	-	-	6,22 ± 0,39
L – προλίνη - Γλυκερόλη	1:4	0	-	-	7,6
L – προλίνη – Αιθυλενογλυκόλη	1:4	0	-	-	8,8

L – προλίνη – Γαλακτικό οξύ	1:8	0	-	-	10,4
Κιτρικό οξύ - Γλυκερόλη	1:4	0	-	-	8,4
Κιτρικό οξύ - Αιθυλενογλυκόλη	1:4	0	-	-	10,0
Κιτρικό οξύ - Γαλακτικό οξύ	1:4	0	-	-	10,79
Κιτρικό οξύ - Γαλακτικό οξύ	1:4	48,9	-	-	15,50
Γλυκερόλη – Ουρία	2:1	0	-	-	7,7
Γλυκερόλη – Διμεθυλοουρία	2:1	0	-	-	6,45
Γλυκερόλη – D- σορβιτόλη	8:1	0	-	-	8,7
Αιθυλιμιδαζόλη – Γλυκερόλη	1:4	0	-	-	6,9
Μεθυλιμιδαζόλη - Γλυκερόλη	1:4	0	-	-	8,0

*ND: Not Detected

Η προσθήκη νερού στο σύστημα διαλυτών αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης με αξιοσημείωτη διαφορά (45%). Στον Πίνακα Β.1 του Παραρτήματος Β, συγκεντρώνονται οι συνδυασμοί που έχουν σχετικά καλή απόδοση σε ελαιοευρωπείνη, τα σημεία τήξης του δέκτη δεσμού υδρογόνου, του δότη και του βαθύ ευτηκτικού μείγματος και το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου^[97,98,99,100,101]. Για δέκτη χλωριούχο χολίνη, ο καλύτερος δότης είναι η αιθυλενογλυκόλη, ακολουθούμενη από την 1,2-προπανοδιόλη και την ουρία. Από τους υπόλοιπους, εξαιρετικά αποτελέσματα έδωσε ο DES κιτρικό οξύ – γαλακτικό οξύ, ακολουθούμενος από τον L-προλίνη – γαλακτικό οξύ και τον κιτρικό οξύ – αιθυλενογλυκόλη. Ένα παράδειγμα άλλων συνδυασμών είναι L-γαλακτικό οξύ – οξικό αμμώνιο (DES) με β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD)^[96].

Η γλυκερόλη είναι ένας πράσινος, μη τοξικός, βιοαποικοδομήσιμος και επαναχρησιμοποιήσιμος διαλύτης που παράγεται από ανανεώσιμες πηγές (συνήθως ως υποπροϊόν της μετεστεροποίησης ενός τριγλυκεριδίου κατά την παραγωγή παραγώγων φυσικών λιπαρών οξέων) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα^[102]. Το υγρό οξικό οξύ είναι ένας υδρόφιλος, πολικός, πρωτικός διαλύτης, παρόμοιος με την αιθανόλη και το νερό. Με μέτρια σχετική στατική διαπερατότητα (διηλεκτρική σταθερά) 6,2, διαλύει όχι μόνο πολικές ενώσεις, όπως ανόργανα άλατα και σάκχαρα, αλλά και μη πολικές ενώσεις, όπως έλαια. Είναι

αναμείξιμος με πολικούς και μη πολικούς διαλύτες, όπως νερό, χλωροφόρμιο και εξάνιο^[103].

Από εκχυλίσματα (OLE) από ξηρά φύλλα της αγοράς, εκτός από ελαιοευρωπεΐνη ($80,67 \pm 0,47$ mg/ g dw), υδροξυτυροσόλη ($0,34 \pm 0,00$ mg/ g dw)^[83,104] και τυροσόλη ($1,95 \pm 0,07$ mg/ g dw) έχουν απομονωθεί επίσης τα κουμαρικό οξύ ($16,5 \pm 1,77$ mg/ g ww), πρωτοκατεχικό οξύ ($3,23 \pm 0,26$ mg/ g ww)^[83], συριγικό οξύ ($0,09 \pm 0,01$ mg/ g dw), κουερσεΐνη ($0,37 \pm 0,04$ mg/ g dw), γαλλικό οξύ ($11,17 \pm 1,65$ mg/ g ww)^[83], φερουλικό οξύ ($0,10 \pm 0,00$ mg/ g dw), καφεϊκό οξύ (23 mg/ g dw)^[86], λουτεολίνη ($0,40 \pm 0,28$ mg/ g dw), ρουΐνη ($1,15 \pm 0,21$ mg/ g dw), ολεασΐνη ($0,099 - 0,305$ mg/ ml OLE), η ολεοκανθάλη (p-HPEA-EDA), το μασλινικό οξύ ($0,012 - 0,262$ mg/ ml OLE), το ολεανολικό οξύ ($0,037 - 0,336$ mg/ ml OLE)^[105], η δι-αλδεΐδη του αγλυκόνου της ελαιοευρωπεΐνης (3,4-DHPEA-EDA) και η διμεθυλοελαιοευρωπεΐνη^[80] η βερμπασκοΐδη ($0,966 \pm 0,018$ mg/ g dw)^[106], η λουτεολΐνη-7-γλυκοΐδη ($4,2 \pm 0,099$ mg/ g dw), η λουτεολΐνη-4-γλυκοΐδη ($1,36 \pm 0,076$ mg/ g dw) και η απιγενΐνη-7-γλυκοΐδη ($2,33 \pm 0,075$ mg/ g dw)^[107].

1.3 Εκχύλιση στερεού - υγρού

1.3.1 Εισαγωγή

Η εκχύλιση στερεού – υγρού ανήκει στις φυσικές διεργασίες και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση ουσιών από στερεά με τη βοήθεια ενός υγρού διαλύτη. Στηρίζεται στη διαφορά διαλυτότητας μίας ουσίας σε δοσμένη θερμοκρασία και πίεση σε διάφορους διαλύτες. Ο διαχωρισμός επέρχεται όταν οι ουσίες περνούν από τη στερεή στην υγρή φάση του διαλύτη.

Το κύριο φαινόμενο που διέπει τα στάδια της εκχύλισης είναι η μεταφορά μάζας με διάχυση. Αρχικά, το στερεό διαβρέχεται από τον διαλύτη και στη συνέχεια, ο διαλύτης διεισδύει στο εσωτερικό. Ο ρυθμός και ο βαθμός διείσδυσης του διαλύτη καθορίζονται από τις διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στο στερεό και τον διαλύτη. Αφού διεισδύσει, διαλυτοποιεί όποια συστατικά μπορεί μέσα στους κόκκους του στερεού. Έτσι, έχουμε μέγιστη συγκέντρωση των συστατικών στο διάλυμα μέσα στο στερεό και σε ιδανική κατάσταση, μηδενική στο διάλυμα εκτός του στερεού. Αυτή η διαφορά συγκέντρωσης κινεί τα συστατικά από το εσωτερικό των στερεών προς το υπόλοιπο διάλυμα, σύμφωνα με τον νόμο του Fick:

$$J = -D\nabla C \quad (2)$$

, όπου J είναι η γραμμομοριακή ροή της ουσίας που διαχέεται, D ο συντελεστής διάχυσης αυτής στο περιβάλλον που βρίσκεται και C η μοριακή συγκέντρωση^[108].

1.3.2 Παράμετροι εκχύλισης

Πολλές είναι οι λειτουργικές παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης στερεού – υγρού. Ο χρόνος, η θερμοκρασία, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και ο ρυθμός ανάδευσης διέπουν την κλασική εκχύλιση, ενώ σε αυτά, έρχονται να προστεθούν και η ισχύς ή η συχνότητα όταν έχουμε εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ή υπερήχους αντίστοιχα. Η θερμοκρασία, η πίεση και ο ρυθμός ανάδευσης πρέπει να διατηρούνται σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια. Άλλοι παράγοντες είναι η φύση και η μορφολογία της προς εκχύλιση ουσίας, η υγρασία της, η κοκκομετρία των σωματιδίων και η φύση του διαλύτη.

1.3.3 Επιλογή διαλύτη

Η επιλογή διαλύτη είναι κρίσιμη για την απόδοση της εκχύλισης στερεού – υγρού. Οι ουσίες – στόχοι πρέπει να έχουν υψηλή διαλυτότητα στον επιλεγμένο διαλύτη καθώς και ο τελευταίος υψηλή εκλεκτικότητα στις ουσίες – στόχους. Ο διαλύτης πρέπει να είναι καθόλου ή μερικώς αναμείξιμος με το στερεό και να έχει χαμηλή επιφανειακή τάση, ώστε να μπορεί να ανακτηθεί, και ιδανικά, χαμηλό ιξώδες, ώστε να γίνεται ταχύτερα η διάχυση στη φάση του. Ακόμη, πρέπει να είναι μη τοξικός, μη αναφλέξιμος, μη επικίνδυνος, μη διαβρωτικός, να μην αντιδρά με το στερεό και αν το εκχύλισμα προορίζεται για ανθρώπινη χρήση, ο διαλύτης πρέπει να χαρακτηρίζεται ως κατάλληλος για τρόφιμα (food grade solvent).

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στους βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες, λόγω των πολύ υποσχόμενων αποτελεσμάτων που δίνουν στην ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από φυτικές πρώτες ύλες, αλλά και την αμελητέα τάση ατμών, που τους καθιστά φιλικότερους προς το περιβάλλον και μειώνει το κόστος της διεργασίας, καθώς δεν υπάρχουν απώλειες. Στα μειονεκτήματά τους, αναφέρονται το υψηλότερο κόστος σε σχέση με τους κλασικούς, οργανικούς διαλύτες, το υψηλότερο ιξώδες και το υψηλότερο κόστος ανάκτησης^[109,110].

1.3.4 Εκχύλιση με υπερήχους

Στην εκχύλιση με υπερήχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπερήχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς^[111,112].

1.3.5 Εκχύλιση με μικροκύματα

Η αρχή της εκχύλισης με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE) βασίζεται στην άμεση επίδρασή τους σε πολικά υλικά ή διαλύτες (π.χ. νερό) και διέπεται από δύο παράλληλα φαινόμενα, την ηλεκτροφορητική μετανάστευση των ιόντων υπό την επίδραση του μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (φαινόμενα τριβής) καθώς και την ευθυγράμμιση των διπόλων των μορίων με το συνεχώς μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο ($4,9 \times 10^4$ μεταβολές ανά δευτερόλεπτο). Εφόσον τα μόρια του διαλύτη αποτυγχάνουν να ακολουθήσουν τις μεταβολές αυτές, με αποτέλεσμα να έχουμε φαινόμενα δόνησης και παραγωγή θερμότητας, μόνο διηλεκτρικά υλικά και διαλύτες που φέρουν μόνιμα δίπολα μπορούν να παράγουν θερμότητα με μικροκύματα^[113,114].

Γενικά, το δείγμα τοποθετείται σε ένα ανοικτό ή κλειστό περιέκτη και θερμαίνεται με ενέργεια μικροκυμάτων, προκαλώντας έτσι εκχύλιση της επιθυμητής ουσίας σε έναν διαλύτη^[115]. Με τα μικροκύματα, υπάρχει σημαντική μείωση στον χρόνο εκχύλισης σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους, ενώ υπάρχει επίσης και σημαντική μείωση στον όγκο δείγματος και διαλύτη σε σχέση με την κλασική, λόγω της αποδοτικότερης εκχύλισης.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εκχύλισης με μικροκύματα αποτελεί η μέθοδος Solvent Free Microwave Extraction (SFME), που συνδυάζει την ακτινοβολία των μικροκυμάτων και την ξηρή απόσταξη. Με την τεχνική αυτή, η προς εκχύλιση πρώτη ύλη τοποθετείται σε δοχείο σε φούρνο μικροκυμάτων χωρίς την προσθήκη νερού ή κάποιου οργανικού διαλύτη. Τα μικροκύματα αλληλεπιδρούν με το εγκλωβισμένο εσωτερικά νερό που υπάρχει στην πρώτη ύλη, προκαλώντας τη θέρμανσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαστολή των κυττάρων του φυτού, τη ρήξη των αδένων των ελαιοφόρων υποδοχέων και τελικά, την απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο και η υδατική φάση στη συνέχεια εξατμίζονται και παραλαμβάνονται μετά από συμπύκνωση^[116].

Βιβλιογραφία

[1] Kitts DD. 1994. Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Can J Physiol Pharmacol*, 72, 423–424.

[2] Gibney, Michael J., Lanham-New, Susan A., Cassidy, Aedin, Vorster, Hester H. (Eds.). 2009. *Introduction to Human Nutrition, The Nutrition Society Textbook*, second ed. Wiley-Blackwell.

[3] Lanham-New, Susan A., Macdonald, Ian A., Roche, Helen M. (Eds.). 2010. *Nutrition and Metabolism, The Nutrition Society Textbook*, second ed. Wiley-Blackwell.

- [4] Halliwell, Barry, Gutteridge, John. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. OUP, Oxford, UK.
- [5] Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S., Cekanova, M., LeMieux, M., Greer, B., & Moustaid-Moussa, N. 2013. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(4), 613–623.
- [6] Συξέρης, Δ. 1998. Βιοτεχνολογία & Καλλυντικά. Χρονικό Δημιουργών Κοσμητολογίας Αθήνα: Zymel.
- [7] I. Chinou. 2017. Assessment report on *Olea europaea L., folium.*, EMA/HMPC/359236/2016, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), European Medicines Agency, Science Medicines Health, 16(1), 4-6.
- [8] Salomone, R., Loppolo, G.. 2012. Environmental impacts of olive oil production: A Life Cycle Assessment case study in the province of Messina (Sicily). *Journal of Cleaner Production*, 28(5), 88-100.
- [9] Khayer A, Chowdhury MB, Akrotos CS, Vayenas DV, Pavlou S. 2013. Olive mill waste composting: A review. *Int. Biodeter. Biodegr*, 85, 108-119.
- [10] Manios T. 2004. The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete, *Environ. Int.* 29, 1079-1089.
- [11] Paraskeva, C.A., Papadakis, V.G., Tsarouhi, E., Kanellopoulou, D.G., Koutsoukos, P.G.. 2006. Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination Journal*, 213, 218- 229.
- [12] Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Mondelli, D.. 2007. Evolution of the fulvic acid fractions during co-composting of olive oil mill wastewater sludge and tree cuttings. *Bioresource Technology*, 98, 1964–1971.
- [13] Molina Alcaide E., Nefzaoui A.. 1996. Recycling of olive oil by-products: Possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 227-235.
- [14] Skoulou V., Zabaniotou A., Stauroopoulos G., Sakelaropoulos G.. 2008. Syngas production from olive tree cuttings and olive kernels in a downdraft fixed-bed gasifier. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1185-1194.
- [15] Ghisalberti EL. 1998. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine* 5(2), 147-163.
- [16] Le Tutour B and Guedon D. 1992. Antioxidative activities of *Olea Europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 31(4), 1173-1178.

- [17] Visioli F and Galli C. 1998. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings *Nutr Rev* 56(5 Pt 1), 142-147.
- [18] Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil *Eur J Cancer*, 36, 1235-1247.
- [19] Bourquelot E, Vintilesco JCR. 1908. Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retire de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Cmpt. Rend. Herbd. Acad. Sci*, 147, 533-535.
- [20] Guiso M, Marra C. 2005. Highlights in oleuropein aglycone structure. *Natural Product Res*, 19(2), 105-109.
- [21] Panizzi LM, Scarpati JM, Oriente EG. 2000. Costituzione della oleuropeina, glucoside, glicoside amaro e ad azione ipotensiva dell' olivo. *Org. Prep. Proc. Int.* 4, 97-104.
- [22] Fleming HP, Walter WM, Etchells JL. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl. Microbiol*, 26, 773-776.
- [23] Haris Omar, S. 2010. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133–154.
- [24] Bourquelot E, Vintilesco J. 1938. "Oleuropein", a new glucoside from *Olea Europaea* L. *J Pharm Chim*, 28, 303-314.
- [25] Walter Jr WM, Fleming HP and Etchells JL. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology*, 26(5), 773-776.
- [26] Visioli F and Galli C. 1994. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55(24), 1965-1971.
- [27] Ziyat A, Leggsyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco *J Ethnopharmacol*, 58, 45-54.
- [28] Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, Gonzales M and Utrilla P. 1991. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica*, 57, 417-419.
- [29] Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ Utrilla MP, Jimenez J and Osuna I. 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*, 58, 513-515.
- [30] Singh, I., Mok, M., Christensen, A.-M., Turner, A. H., & Hawley, J. A. 2008. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(2), 127–132.

- [31] Qabaha, K., AL-Rimawi, F., Qasem, A., & Naser, S. A. 2018. Oleuropein Is Responsible for the Major Anti-Inflammatory Effects of Olive Leaf Extract. *Journal of Medicinal Food*, 21(3), 302–305.
- [32] Shamsoum, H., Vlacheski, F., & Tsiani, E. 2017. Anticancer effects of oleuropein. *BioFactors*, 43(4), 517–528.
- [33] Liu, L., Ahn, K. S., Shanmugam, M. K., Wang, H., Shen, H., Arfuso, F., Tang, F. R. 2018. Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), 4504 - 4513.
- [34] Cheeseman KH, Slater TF. 1993. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*, 49, 481–93.
- [35] Bagchi K, Puri S. 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr.*, 4, 350–60.
- [36] Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176–86.
- [37] Ouyang, X.-L.; Wei, L.-X.; Wang, H.-S.; Pan, Y.-M. 2015. Antioxidant activity and phytochemical composition of *Osmanthus fragrans*' pulps. *South African Journal of Botany*, 98, 162–166.
- [38] M. Servili; S. Esposto; R. Fabiani; S. Urbani; A. Taticchi; F. Mariucci; R. Selvaggini; G. F. Montedoro. 2009. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. , 17(2), 76–84.
- [39] Negro, Carmine; Aprile, Alessio; Luvisi, Andrea; Nicolì, Francesca; Nutricati, Eliana; Vergine, Marzia; Miceli, Antonio; Blando, Federica; Sabella, Erika; De Bellis, Luigi. 2019. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Italian Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 8(6), 161.
- [40] Cardinali, Angela; Pati, Sandra; Minervini, Fiorenza; D'Antuono, Isabella; Linsalata, Vito; Lattanzio, Vincenzo. 2012. Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1822–1829.
- [41] Xican Li, Xiaozhen Wang, Dongfeng Chen, Shuzhi Chen. 2011. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro, *Functional Foods in Health & Disease*, 7.
- [42] Badhani, Bharti; Sharma, Neha; Kakkar, Rita. 2015. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.*, 5(35), 27540–27557.

- [43] Nuruddin Mohammed Nur, SaadAbd. Mohammad Al-Jasabi. 2017. Antioxidant Properties of Maslinic Acid Extracted From *Plumeria Rubra* Leaves, *International Journal of Contemporary Research and Review*, 8(7), 20178-20183.
- [44] Sunil, Christudas; Irudayaraj, Santiago Stephen; Duraipandiyan, Veeramuthu; Al-Dhabi, Naif Abdullah; Agastian, Paul; Ignacimuthu, Savarimuthu. 2014. Antioxidant and free radical scavenging effects of β -amyrin isolated from *S. cochinchinensis* Moore. leaves. *Industrial Crops and Products*, 61, 510–516.
- [45] Witaicenis, Aline; Seito, Leonardo Noboru; da Silveira Chagas, Alexandre; de Almeida, Luiz Domingues; Luchini, Ana Carolina; Rodrigues-Orsi, Patrícia; Cestari, Silvia Helena; Di Stasi, Luiz Claudio. 2014. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*, 21(3), 240–246.
- [46] Chin-Ying Shaw; Chen-Hui Chen; Chih-Chieh Hsu; Chien-Chih Chen; Ying-Chieh Tsai. 2003. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum.*, 17(7), 823–825.
- [47] Antioxidant activity of *Cinchona officinalis* stem bark extracts. 2003. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. Kyung Hee Oriental Medicine Research Center, 3(4), 205–211.
- [48] Jianxiong Yang; Juan Guo; Jiangfeng Yuan. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin., *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 0–1066.
- [49] Zheng, Yan-Zhen; Deng, Geng; Liang, Qin; Chen, Da-Fu; Guo, Rui; Lai, Rong-Cai. 2017. Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Scientific Reports*, 7(1), 7543.
- [50] U. Özgen, A. Mavi, Z. Terzi, C. Kazaz, A. Asçi, Y. Kaya, H. Seçen. 2010. Relationship between chemical structure and antioxidant activity of luteolin and its glycosides isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*, *Planta Medica*, 76.
- [51] Wang, Jingqiu; Fang, Xianying; Ge, Lin; Cao, Fuliang; Zhao, Linguo; Wang, Zhenzhong; Xiao, Wei; Pizzo, Salvatore V. 2018. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLOS ONE*, 13(5), e0197563–.
- [52] Farooqui, Akhlaq A. 2018. Role of the Mediterranean Diet in the Brain and Neurodegenerative Diseases: Effects of Mediterranean Diet Components on Neurodegenerative Diseases., 1–16.
- [53] Beena Mishra; K.Indira Priyadarsini; M.Sudheer Kumar; M.K. Unnikrishnan; Hari Mohan. 2003. Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol., 11(13), 2677–2685.

- [54] Pápay, Zsofia & Antal, Istvan. 2014. Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient. *European Scientific Journal*, 3, 1857-7881.
- [55] Birasuren, Bayarmaa, Kim, Na Yeon, Jeon, Hye Lyun, Kim, Mee Ree. 2013. Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Agriophyllum pungens* Seed Extracts from Mongolia. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18(3), 188–195.
- [56] S. Phongpaichit, J. Nikom, N. Rungjindamai, J. Sakayaroj, N. Hutadilok-Towatana, V. Rukachaisirikul and K. Kirtikara. 2007. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 51(3), 517-525.
- [57] Nurul Jadid, Dewi Hidayati, Sylviana Rosyda Hartanti, Byan Arasyi Arraniry, Rizka Yuanita Rachman and Wiwi Wikanta. 2017. *AIP Conference Proceedings* 1854, 020019.
- [58] Lins, P. G., Marina Piccoli Pugine, S., 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.
- [59] Jadid, N., Hidayati, D., Hartanti, S. R., Arraniry, B. A., Rachman, R. Y., & Wikanta, W. 2017. Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay, 7.
- [60] Castillo, J. Julián. 2010. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention || Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract., 102, 951–958.
- [61] Thiel, R. J. 2000. Natural vitamins may be superior to synthetic ones. *Medical Hypotheses*, 55(6), 461–469.
- [62] Achilonu, M. C., & Umesiobi, D. O. 2015. Bioactive Phytochemicals: Bioactivity, Sources, Preparations, and/or Modifications via Silver Tetrafluoroborate Mediation. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–22.
- [63] Augustyniak, A., Bartosz, G., Čipak, A., Duburs, G., Horáková, L., Łuczaj, W., Žarković, N. 2010. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research*, 44(10), 1216–1262.
- [64] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- [65] Otero Murowaniecki Deborah, Oliveira, Fernanda Moreira, Lorini, Alexandre, Antunes, Bruna da Fonseca, Oliveira, Raquel Moreira, & Zambiasi, Rui Carlos. 2020. Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Revista Ceres*, 67(4), 315-329.

- [66] Erinç Koçak, Fikret Pazır. 2018. Effect of Extraction Methods on Bioactive Compounds of Plant Origin. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(6): 663-675.
- [67] Miral R. Thakker, M. A. Desai and J. K. Parikh. 2014. Extraction of Phytochemicals using Neoteric Solvents. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*, 1(3), 153-158.
- [68] Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Quental, M. V., Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. 2017. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chemical Reviews*, 117(10), 6984–7052.
- [69] Hough, W. L., Smiglak, M., Rodríguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., Rogers, R. D. 2007. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 31(8), 1429.
- [70] Emma L. Smith; Andrew P. Abbott; Karl S. Ryder. 2014. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082.
- [71] Andrew Abbott, John Barron, Karl Ryder, David Wilson. 2007. Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations. *Chem. Eur. J.*, 13(22), 6495–6501.
- [72] Gregorio García, Santiago Aparicio, Ruh Ullah, Mert Atilhan. 2015. Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. *Energy & Fuels*, 29(4), 2616–2644.
- [73] Mukhtar A. Kareem, Farouq S. Mjalli, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. 2010. Phosphonium-Based Ionic Liquids Analogues and Their Physical Properties. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(11), 4632–4637.
- [74] Abbott, Andrew P., McKenzie, Katy J., Ryder, Karl S. 2007. Ionic Liquids IV. *ACS Symposium Series*, 975, 186–197.
- [75] Emma L. Smith; Andrew P. Abbott; Karl S. Ryder. 2014. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082.
- [76] Maan Hayyan, Farouq S. Mjalli, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. 2010. A Novel Technique For Separating Glycerine From Palm Oil-Based Biodiesel Using Ionic Liquids. *Fuel Processing Technology*, 91, 116–120.
- [77] Adeeb Hayyan, Mohd Ali Hashim, Maan Hayyan, Farouq S. Mjalli, Inas M. AlNashef. 2013. A Novel Ammonium Based Eutectic Solvent for Pre-treatment of Low Grade Crude Palm Oil and Synthesis High Quality Biodiesel Fuel. *Industrial Crops and Products*, 46, 392–398.

- [78] Habibi, Emadaldin. 2013. A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples. *Analytica Chimica Acta*, 762, 61–67.
- [79] Ghanemi, Kamal, Navidi, Mohammad-Amin, Fallah-Mehrjardi, Mehdi, Dadolahi-Sohrab, Ali. 2014. Ultra-fast microwave-assisted digestion in choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, Ni and Zn in marine biological samples. *Anal. Methods*, 6 (6), 1774–1781.
- [80] Bonacci, S., Di Gioia, M. L., Costanzo, P., Maiuolo, L., Tallarico, S., & Nardi, M. 2020. Natural Deep Eutectic Solvent as Extraction Media for the Main Phenolic Compounds from Olive Oil Processing Wastes. *Antioxidants*, 9(6), 513.
- [81] Hakan Çetinkaya, Muhittin Kulak. 2016. Relationship between total phenolic, total flavonoid and oleuropein in different aged olive (*Olea europaea* L.) Cultivar leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(2), 81.
- [82] Cifá, D., Skrt, M., Pittia, P., Di Mattia, C., & Poklar Ulrih, N. 2018. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 1128–1137.
- [83] Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., 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.
- [84] F. Ortega-García, S. Blanco, M.A. Peinado, J. Peragón. 2008. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiol.*, 28 (1), 45-54.
- [85] Ramirez Niño, Miguel Ángel; Jiménez Forero, Javier Alexander; Bernal Salazar, Jessica Paola; Osorio Dueñas, María Daniela. 2018. Characterization of oil extracted from the kernel of the fruit of cumare's palm (*Astrocaryum chambira* Barret). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 71(1), 8415–8422.
- [86] Elboughdiri, Nouredine. 2018. Effect of Time, Solvent-Solid Ratio, Ethanol Concentration and Temperature on Extraction Yield of Phenolic Compounds From Olive Leaves, 8(2), 2805–2808.
- [87] Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. 2018. 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.

- [88] Yadav, A., & Pandey, S. 2014. Densities and Viscosities of (Choline Chloride + Urea) Deep Eutectic Solvent and Its Aqueous Mixtures in the Temperature Range 293.15 K to 363.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(7), 2221–2229.
- [89] Xie, Y., Dong, H., Zhang, S., Lu, X., & Ji, X. 2014. Effect of Water on the Density, Viscosity, and CO₂ Solubility in Choline Chloride/Urea. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59(11), 3344–3352.
- [90] Manurung, R., Simanjuntak, G. C., Perez, R. N., Syahputra, A., Alhamdi, M. A., Siregar, H., & Syahputri Zuhri, R. R. 2019. Production of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvent with Hydrogen Bond Donor D-Glucose and Ethylene Glycol. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 505, 012134.
- [91] Francisco, M., González, A. S. B., García de Dios, S. L., Weggemans, W., & Kroon, M. C. 2013. Comparison of a low transition temperature mixture (LTTM) formed by lactic acid and choline chloride with choline lactate ionic liquid and the choline chloride salt: physical properties and vapour–liquid equilibria of mixtures containing water and ethanol. *RSC Advances*, 3(45), 23553.
- [92] A.-M. Popescu, C. Donath, V. Constantin. 2014. Density, viscosity and electrical conductivity of three choline chloride based ionic liquids. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(3), 452-457.
- [93] Zhao, B.-Y., Xu, P., Yang, F.-X., Wu, H., Zong, M.-H., & Lou, W.-Y. 2015. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(11), 2746–2755.
- [94] Kamarza Mulia, Farah Fauzia, Elsa Anisa Krisanti. 2019. Polyalcohols as Hydrogen-Bonding Donors in Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents for Extraction of Xanthenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* L. *Molecules*, 24(3), 636.
- [95] Åahin, Selin; KurtulbaÅ, Ebru; Bilgin, Mehmet. 2020. Special designed deep eutectic solvents for the recovery of high added-value products from olive leaf: a sustainable environment for bioactive materials. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(5), 422-429.
- [96] Şahin, S., Kurtulbaş, E., & Bilgin, M. 2020. Special designed deep eutectic solvents for the recovery of high added-value products from olive leaf: a sustainable environment for bioactive materials. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(5), 422-429.
- [97] Chakroun, D., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Makris, D. P. 2019. Enhanced-performance extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols using L-lactic acid/ammonium acetate deep eutectic solvent combined with β -cyclodextrin: screening,

optimisation, temperature effects and stability. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(4).

[98] Zhang, H., Lang, J., Lan, P., Yang, H., Lu, J., & Wang, Z. 2020. Study on the Dissolution Mechanism of Cellulose by ChCl-Based Deep Eutectic Solvents. *Materials*, 13(2), 278.

[99] Torres, P., Balcells, M., Cequier, E., & Canela-Garayoa, R. 2020. Effect of Four Novel Bio-Based DES (Deep Eutectic Solvents) on Hardwood Fractionation. *Molecules*, 25(9), 2157.

[100] Kuehn, Kaila M.; Massmann, Camille M.; and Sovell, Natalie R. 2017. Choline Chloride Eutectics: Low Temperature Applications. *The Journal of Undergraduate Research*, 15(5).

[101] Longo Jr., L., & Craveiro, M. 2018. Deep Eutectic Solvents as Unconventional Media for Multicomponent Reactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(10).

[102] Wolfson, A., Dlugy, C. & Shotland, Y. 2007. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ Chem Lett* 5, 67–71.

[103] Cheung, Hosea. Robin S. Tanke, G. Paul Torrence. 2000. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* | | Acetic Acid., Vol. I, 1 -34.

[104] Alzweiri, Muhammed & Al-Hiari, Yusuf. 2013. Analysis and Evaluation of Hydroxytyrosol in Olive Leaf Extract. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 314-322.

[105] Breakspear, I., & Guillaume, C. 2020. A Quantitative Phytochemical Comparison of Olive Leaf Extracts on the Australian Market. *Molecules*, 25(18), 4099.

[106] Cedola, A., Palermo, C., Centonze, D., Del Nobile, M. A., & Conte, A. 2020. Characterization and Bio-Accessibility Evaluation of Olive Leaf Extract-Enriched “Taralli.” *Foods*, 9(9), 1268.

[107] Pereira, Ana Paula; Ferreira, Isabel CFR; Marcelino, Filipa; Valentão, Patricia; Andrade, Paula B; Seabra, Rosa; Estevinho, Leticia; Bento, Albino; Pereira, José Alberto. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12(5), 1153–1162.

[108] Atkins, Peter, de Paula, Julio. 2006. *Physical Chemistry for the Life Science*, Oxford University Press, 297.

[109] Aguilera J.M. 2003. *Extraction Optimization in Food Engineering*. Marcel Dekker, New York, 35–55.

[110] Prabhudesai R. 1997. Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers. McGraw-Hill, New York, 3–19.

[111] K. Ghafoor, Y. H. Choi, J. Y. Jeon, and I. H. Jo. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988–4994.

[112] T. Zou, Q. Jia, H. Li, C. Wang, and H. Wu. 2013. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *haematococcus pluvialis*. *Marine Drugs*, 11(5), 1644–1655.

[113] Raman, G., & Gaikar, V. G. 2002. Microwave-Assisted Extraction of Piperine from *Piper nigrum*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(10), 2521–2528.

[114] Letellier, M., & Budzinski, H. 1999. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259–270.

[115] Sparr Eskilsson, C., & Björklund, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227–250.

[116] Caverio, A.A., Matos, F.J.A., Alena, J.W., and Plumel. M.M.. 1989. *Flavor and Fragrance J.*, 4, 43-44.

2 Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά

Στον Πίνακα 2.1, παρουσιάζονται όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, ο αριθμός CAS, ο προμηθευτής και η καθαρότητα.

Πίνακας 2.1: Λίστα υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Σημειώνονται ο αριθμός CAS, ο προμηθευτής και η καθαρότητα.

Χημική Ονομασία	Αριθμός CAS	Προμηθευτής	Καθαρότητα %
Ethanol	64-17-5	Fisher Chemical	≥99,8
Water (HPLC Gradient Grade)	7732-18-5	Fisher Chemical	≥99,9
Choline Chloride	67-48-1	Acros Organics	99
Urea	57-13-6	Fisher Bioreagents	≥99
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (free radical)	1896-66-4	Alfa Aesar	95
Folin Ciocalteu's Reagent		Carlo Erba Reagents	
Na ₂ CO ₃	497-19-8	Fisher Bioreagents	≥99,5
Acetic Acid Glacial	64-19-7	Fisher Chemical	>99
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)	52188-07-1	Acros Organics	97
Gallic Acid	149-91-7	Acros Organics	98

2.2 Επεξεργασία φύλλων ελιάς

Τα φύλλα ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από την πόλη Κυπαρισσία του Νομού Μεσσηνίας. Αφού αφαιρέθηκαν τα κλαδιά και οι λοιπές ακαθαρσίες (π.χ. χώμα), εκπλύθηκαν με νερό βρύσης και στη συνέχεια, με απιονισμένο νερό και αφέθηκαν προς φυσική ξήρανση για τρεις (3) μέρες. Η ξήρανση σε φούρνο ή στον ήλιο δε συνίσταται καθώς ποσοστό των πτητικών συστατικών τους (Volatile Organic Compounds ή VOCs) μπορεί να απομακρυνθούν. Ακολούθησε η άλεση των φύλλων ελιάς με τη βοήθεια μύλου άλεσης και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κοσκίνισμα σε τάρακτο με πρότυπα κόσκινα μέχρι την επίτευξη κοκκομετρίας <425 μm. Τέλος, η σκόνη αποθηκεύτηκε σε στεγνό και σκιερό μέρος, μέχρι την τελική χρήση.

2.3 Σύνθεση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών

Για την παρασκευή των Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών (Deep Eutectic Solvents ή DESs) χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol, έλαβε χώρα απλή ανάμειξη των επιμέρους συστατικών με ταυτόχρονη θέρμανση στους 80 °C. Προηγήθηκε ξήρανση υπό κενό στους 40 °C των συστατικών χλωριούχος χολίνη και ουρία, λόγω της υγροσκοπικής τους φύσης. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε αδρανείς συνθήκες με διοχέτευση αζώτου και ολοκληρώθηκε όταν προέκυψε ένα

ομοιογενές, διαυγές υγρό. Οι DESs αφέθηκαν να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλα δοχεία και τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα.

2.4 Κλασική υγρή εκχύλιση

Τα πειράματα υγρής εκχύλισης διεξήχθησαν σε δοχείο διπλού τοιχώματος, όπου βιομάζα και διαλύτης αναμειγνύονται στην επιθυμητή αναλογία με χρήση μαγνητικής πλάκας. Η θέρμανση του μείγματος επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του κυκλοφορητή Julabo F12, όπου το μέσο θέρμανσης είναι νερό και η ακρίβεια μέτρησης θερμοκρασίας είναι ± 0.01 °C. Τη διάταξη συμπληρώνει ψυκτήρας προς αποφυγή των φαινομένων εξάτμισης, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2.1. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το μείγμα διηθήθηκε υπό κενό και το εκχύλισμα φυλάχθηκε στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή του.



Εικόνα 2.1: Δύο διατάξεις κλασικής εκχύλισης συνδεδεμένες σε σειρά.

Για να βρεθεί η ποσότητα βιομάζας που εκχυλίστηκε και κατά συνέπεια και η απόδοση της εκχύλισης, στην περίπτωση κλασικών διαλυτών, το εκχύλισμα οδηγήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, όπου απομακρύνθηκε ο διαλύτης. Για περαιτέρω ξήρανση, το στερεό τοποθετήθηκε σε φούρνο υπό κενό για 2 ώρες (h).

Οι DESs είναι αδύνατο να απομακρυνθούν με εξάτμιση, λόγω της αμελητέας τάσης ατμών τους. Για αυτό, το μείγμα εκχυλίσματος – μη εκχυλισμένου στερεού οδηγήθηκε προς φυγοκέντρηση και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό. Το υπόλειμμα (μείγμα μη εκχυλισμένου στερεού - διαλύτη) που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση εκπλύθηκε με νερό, ώστε να απομακρυνθεί ο DES, και στη συνέχεια ξηράθηκε, ώστε να βρεθεί η ποσότητα βιομάζας που εκχυλίστηκε και κατά συνέπεια και η απόδοση της εκχύλισης.

2.5 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Τα πειράματα υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα διεξήχθησαν σε δοχείο διπλού τοιχώματος, όπου βιομάζα και διαλύτης αναμειγνύονται στην επιθυμητή αναλογία με χρήση μαγνήτη. Η θέρμανση του μείγματος επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του κυκλοφορητή Julabo F12, όπου το μέσο θέρμανσης είναι νερό και η ακρίβεια μέτρησης θερμοκρασίας είναι ± 0.01 °C. Τη διάταξη συμπληρώνει ψυκτήρας προς αποφυγή των φαινομένων εξάτμισης. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το μείγμα διηθήθηκε υπό κενό και το εκχύλισμα φυλάχθηκε στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή του.

2.6 Ανάλυση εκχυλισμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography ή HPLC). Η διάταξη αποτελείται από αντλία Jasco PU-1500, ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A (diode array detector), ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 280 και 230 nm, και στήλη μ Bondapak C18 αντίστροφης φάσης της εταιρείας Waters, διαστάσεων 3.9 mm x 300 mm και μέγεθος σωματιδίων πληρωτικού υλικού 10 μ m.

Ο φέρων διαλύτης ήταν σύστημα δύο διαλυτών, του διαλύτη A (ακετονιτρίλιο) και του διαλύτη B (νερό με οξικό οξύ 1% v/v). οι οποίοι συνδυάστηκαν με το πρόγραμμα έκλουσης του Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Πρόγραμμα έκλουσης στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Χρόνος (λεπτά)	% Διαλύτης A	% Διαλύτης B
0	5	95
20	25	75
40	50	50
50	80	20
60	5	96

Ο ρυθμός ροής του διαλύτη τέθηκε στα 1 ml/ min και η απαερίωση του έγινε με αέριο ήλιο. Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε τρεις

αντιοξειδωτικές ουσίες, την ελαιοευρωπεΐνη, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη. Για τις ενώσεις αυτές, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε διάφορες συγκεντρώσεις και κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς. Τυπικές καμπύλες αναφοράς παρουσιάζονται στο Παράρτημα Γ.

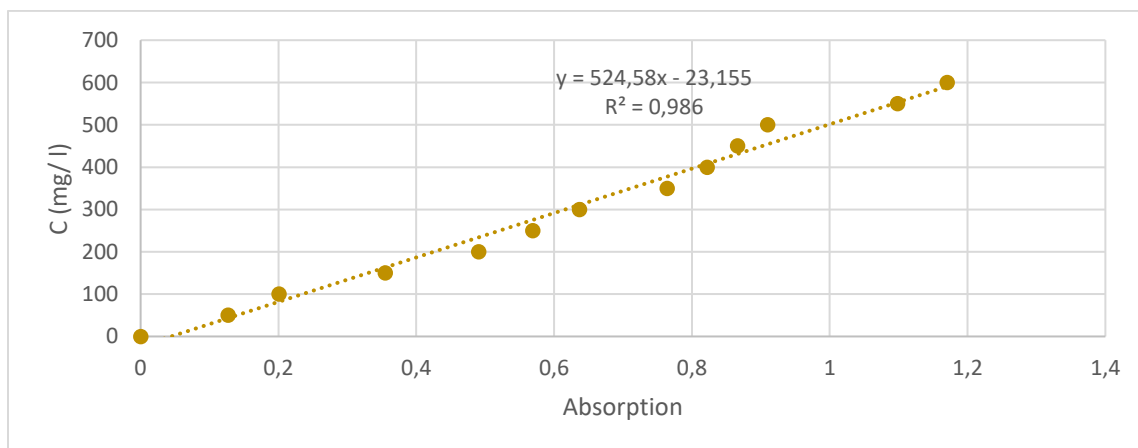
2.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ή DPPH[•]) με την αλληλεπίδρασή της με τα αντιοξειδωτικά μόρια.

Η διαδικασία προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων που ακολουθήθηκε έχει ως εξής: 1,6 mg ελεύθερης ρίζας DPPH[•] ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 50 ml αιθανόλης^[4,2]. Στη συνέχεια, αναδεύθηκαν για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυλάχθηκαν σε ειδικό σκουρόχρωμο μπουκάλι, λόγω της φωτοευαισθησίας της ρίζας DPPH[•]. Το διάλυμα είχε έντονο μωβ χρώμα.

Παρασκευάστηκαν δύο (2) διαφορετικές συγκεντρώσεις υγρού εκχυλίσματος με αραιώση με αιθανόλη. Στο φασματοφωτόμετρο (UV-Vis Bel Photonics UV-M51), έγινε μηδενισμός (Zero) με αιθανόλη στα 515 nm και μετρήθηκε η απορρόφηση της ρίζας DPPH[•]. Στη συνέχεια, στα 3 ml δ/τος DPPH[•] της κάθε κυψελίδας, προστέθηκαν 0,075 ml από την κάθε συγκέντρωση εκχυλίσματος, αναδεύθηκαν σε vortex και μετρήθηκε η απορρόφηση του μείγματος DPPH[•] και εκχυλίσματος στη μία (1) ώρα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση των εκχυλισμάτων στην περίπτωση σκουρόχρωμων εκχυλισμάτων, η οποία και αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση.

Για την άμεση σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των διαφόρων εκχυλισμάτων, ανάχθηκε η αντιοξειδωτική δράση αυτών σε ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ή TAEC σε mg/ l). Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων Trolox συγκέντρωσης (C) 0 – 600 mg/ l και έγινε ανάλυση με πρωτόκολλο DPPH[•]. Η καμπύλη που προέκυψε απεικονίζεται στο Διάγραμμα 2.1.



Διάγραμμα 2.1: Καμπύλη αναφοράς Trolox σε αιθανόλη με πρωτόκολλο DPPH*.

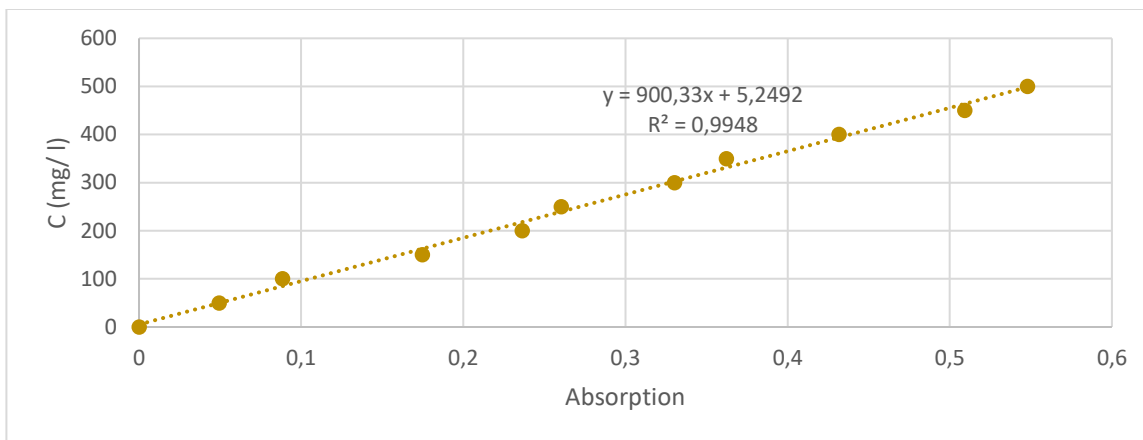
2.8 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του συνόλου των πολυφαινολικών συστατικών σε εκχυλίσματα βιομάζας και βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση παρουσία πολυφαινολικών ομάδων. Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδενικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων και το προϊόν που λαμβάνεται είναι ένα σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φως (765nm). Αναγκαία είναι η προσθήκη κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου για τη ρύθμιση της αλκαλικότητας.

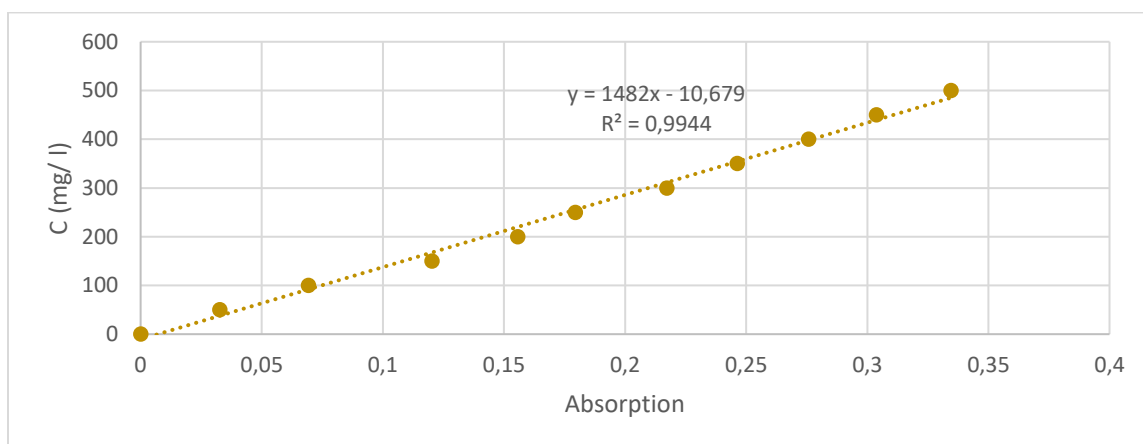
Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν βάσει του πρωτοκόλλου μέτρησης είναι τα εξής: σε 0,1 ml αραιωμένου εκχυλίσματος, προστέθηκαν 7,9 ml απιονισμένου νερού και αναδεύθηκαν σε vortex. Σε αυτά, προστέθηκαν 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu's Reagent και 1,5 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 1 M, αναδεύθηκαν ξανά σε vortex και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 30 min. Σε εκχυλίσματα DES, προστέθηκαν και 3 ml διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 1 M πριν το διάλυμα ανθρακικού νατρίου, καθώς το μείγμα θολώνει μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin. Το τυφλό δείγμα παρασκευάστηκε ομοίως, με 8 ml απιονισμένο νερό. Η φωτομέτρηση έγινε στα 765 nm (μηδενισμός με απιονισμένο νερό). Για κάθε δείγμα, λήφθηκαν τρεις (3) μετρήσεις.

Το διάλυμα ανθρακικού νατρίου παρασκευάστηκε ως εξής: 20 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου διαλύθηκαν σε 80 ml απιονισμένο νερό και το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού υπό ανάδευση σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα και αφέθηκε να ψυχθεί μέχρι σχηματισμού κρυστάλλων. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύθηκε μέχρι διάλυσης των σχηματισμένων κρυστάλλων και μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή, και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος (Gallic Acid ή GA). Οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν με πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 0 - 500 mg/ l. Η ανάλυση έγινε όπως παραπάνω, με πρωτόκολλο Folin Ciocalteu. Οι καμπύλες που προέκυψαν με γραμμική παλινδρόμηση απεικονίζονται στα Διαγράμματα 2.2 και 2.3 και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για να εκφραστεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg GA/ l) για κλασικούς και βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες^[1,2,3].



Διάγραμμα 2.2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος σε απιονισμένο νερό με πρωτόκολλο Folin - Ciocalteu.



Διάγραμμα 2.3: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος σε απιονισμένο νερό με πρωτόκολλο Folin – Ciocalteu προσαρμοσμένη για βαθείς ευτηκτικούς διαλυτές.

2.9 Μέτρηση πυκνότητας βαθένων ευτηκτικών διαλυτών

Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας των δύο βαθένων ευτηκτικών διαλυτών, χρησιμοποιήθηκε το πυκνόμετρο Density/ Specific Gravity Meter DA-640B της εταιρείας Kyoto - KEM. Το δείγμα εισήλθε μέσω ένεσης σε έναν λεπτό σωλήνα σε σχήμα U μέχρι πλήρωσης και τέθηκε σε ταλάντωση μέσω μίας ηλεκτρικής πηγής. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για εύρος θερμοκρασίας 20 - 95 °C, με βήμα 5 °C.

2.10 Μέτρηση ιξώδους βαθένων ευτηκτικών διαλυτών

Για τον προσδιορισμό του ιξώδους των δύο βαθένων ευτηκτικών διαλυτών, χρησιμοποιήθηκε το περιστροφικό ιξωδόμετρο DV1 Viscometer της εταιρείας BROOKFIELD. 6,7 ml του δείγματος τοποθετήθηκαν σε έναν σταθερό μεταλλικό κύλινδρο, στον οποίο κυκλοφορεί νερό ελεγχόμενης θερμοκρασίας, με τη βοήθεια

λουτρού (Julabo F12). Ένας μικρότερος κύλινδρος βυθίστηκε στο κυλινδρικό δοχείο και τέθηκε σε περιστροφή, με συγκεκριμένη ταχύτητα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τρεις (3) διαφορετικές ταχύτητες περιστροφής για κάθε θερμοκρασία, στο εύρος 20 - 90 °C, με βήμα 5 °C. Η τιμή του ιξώδους λαμβάνεται μετά το πέρας χρονικού διαστήματος πέντε (5) λεπτών, έτσι ώστε να εξεταστεί πιθανή χρονική εξάρτηση του ιξώδους.

Βιβλιογραφία

[1] Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

[2] Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.

[3] Waterhouse, A.L. 2002. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), |1. 1.1-|1. 1.8.

3 Αποτελέσματα μετρήσεων & σχολιασμός

3.1 Εισαγωγή

Διεξήχθησαν πειράματα κλασικής υγρής εκχύλισης με τους συμβατικούς διαλύτες νερό και αιθανόλη και τους νέους, πράσινους βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs) χλωριούχος χολίνη (choline chloride)/ ουρία 1:2 κατά mol, ο οποίος από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται και ως ChCl:Urea (1:2), και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ (acetic acid) 1:2 κατά mol, ο οποίος από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται και ως ChCl:AA (1:2), και μειγμάτων αυτών με νερό και αιθανόλη 30 και 20 % κατά βάρος (κ.β.) αντίστοιχα. Ακόμη, διεξήχθησαν πειράματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE) με τον συμβατικό διαλύτη αιθανόλη.

Μελετήθηκε η συμπεριφορά κάθε διαλύτη σε εύρος θερμοκρασίας 55 – 70 °C για κλασική εκχύλιση και 40 – 70 °C για MAE, αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη 1:30 – 1:10 κατά βάρος (κ.β.), χρόνου εκχύλισης 10 – 24 ώρες (h) για κλασική εκχύλιση και 5 – 30 λεπτά (min) για MAE και επιπλέον ισχύος 500 – 750 W για MAE. Οι διαλύτες αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση (Antioxidant Capacity ή AC) του παραγόμενου εκχυλίσματος, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content ή TPC) και τη συγκέντρωση στις αντιοξειδωτικές ενώσεις ελαιουρωπείνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη.

Ακόμη, μετρήθηκαν δύο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs, η πυκνότητα και το ιξώδες, και εξάχθηκαν εμπειρικές συσχετίσεις συναρτήσεως της θερμοκρασίας.

3.2 Αποτελέσματα και σχολιασμός κλασικής υγρής εκχύλισης

3.2.1 Απόδοση κλασικής υγρής εκχύλισης

Υπολογίστηκε η απόδοση (yield) της κλασικής εκχύλισης για τρία συστήματα διαλυτών: (α) αιθανόλη – νερό (70 – 30 % κ.β.), (β) ChCl:Urea (1:2) και (γ) ChCl:Urea (1:2) – αιθανόλη (80% - 20% κ.β.), για θερμοκρασία (T) 55 °C, χρόνο εκχύλισης (t) 24 h και αναλογία βιομάζας/ διαλύτη (Mass Ratio) 1:20 κ.β.. Στον Πίνακα 3.1, καταγράφονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.1: Απόδοση κλασικής εκχύλισης για τρία συστήματα διαλυτών: (α) αιθανόλη – νερό (70 – 30 % κ.β.), (β) ChCl:Urea (1:2) και (γ) ChCl:Urea (1:2) – αιθανόλη (80% - 20% κ.β.), T = 55 °C, Mass Ratio 1:20 κ.β., t = 24 h.

A/A	Διαλύτης 1	Διαλύτης 2	Αρχικό βάρος βιομάζας (g)	Εκχυλισμένο στερεό (g)	Απόδοση (Yield) εκχύλισης (%)
α	Αιθανόλη 70% κ.β.	Νερό 30% κ.β.	5,00	1,69	33,8

β	ChCl:Urea (1:2)	-	8,10	2,98	36,8
γ	ChCl:Urea (1:2) 80% κ.β.	Αιθανόλη 20% κ.β.	8,28	2,95	35,7

3.2.2 Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης, ολικού φαινολικού περιεχομένου και υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης κλασικής υγρής εκχύλισης

Στους Πίνακες 3.2 και 3.3, παρουσιάζονται συνολικά τα αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης κατά σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής δράσης για κάθε διαλύτη. Στον Πίνακα 3.2, καταγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης σε ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ή TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content ή TPC), ενώ στον Πίνακα 3.3, τα αποτελέσματα ανάλυσης σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

Τα ισοδύναμα Trolox (TEAC) υπολογίζονται με βάση την έκφραση της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 2.1) της εξίσωσης 1.

$$TEAC \text{ (mg/ l)} = 524,58 \cdot (ABS \text{ DPPH} - (ABS - ABS \text{ Colour})) - 23,155 \quad (1)$$

, όπου ABS DPPH η απορρόφηση (absorption) της ρίζας DPPH*, ABS η απορρόφηση του μείγματος DPPH* και εκχυλίσματος και ABS Colour η απορρόφηση του εκχυλίσματος. Τα ισοδύναμα Trolox εκφράζονται στη συνέχεια ανά όγκο εκχυλίσματος για λόγους σύγκρισης. Ομοίως υπολογίζονται και τα ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid ή GA). Κατά τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, λήφθηκαν τρεις μετρήσεις ανά δείγμα, από τις οποίες προκύπτει η τυπική απόκλιση (STDEV).

Σημειώνεται ότι δε μελετήθηκαν θερμοκρασίες άνω των 70 °C, για να μην αποσταθεροποιηθούν οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα φύλλα της ελιάς^[1,2], καθώς και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β. για τους DESs, διότι ήταν αδύνατη η διήθηση υπό κενό λόγω της μεγάλης πυκνότητας του παραγόμενου εκχυλίσματος.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) κλασικής εκχύλισης. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση (STDEV) για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β.

Solvent	wt% Ethanol	wt% Water	Mass Ratio	Temp (°C)	Time (h)	TEAC (mg/ l extr)	TPC mg GA/ l extr	STDEV
Water	0	100	1:20	70	24	3011	3653	2
Ethanol	100	0	1:20	55	10	2486	1514	1
	100	0	1:20	55	17	2810	2041	4
	70	30	1:20	55	24	2817	2819	1
	100	0	1:10	55	24	2885	3419	2
	100	0	1:20	55	24	3007	3507	1
	100	0	1:20	63	24	3430	3609	1
	100	0	1:10	70	24	3547	4224	6

	100	0	1:20	70	24	3590	4909	6
	100	0	1:30	70	24	3752	5554	6
ChCl:Urea (1:2)	0	30	1:30	55	24	2947	1554	7
	0	0	1:20	55	24	3038	2081	3
	0	0	1:30	55	24	3204	2487	6
	0	0	1:20	55	10	3795	2730	4
	20	0	1:20	55	24	4271	4355	2
	0	30	1:20	70	24	4339	4709	9
	0	0	1:20	70	24	4447	5744	9
ChCl:AA (1:2)	0	0	1:30	55	24	3029	3558	7
	0	30	1:20	55	24	3068	3648	2
	0	0	1:20	55	24	3078	3896	3
	0	30	1:20	70	24	4453	4344	6
	0	0	1:20	70	24	4513	4676	5
	0	0	1:20	55	10	4634	5261	3
	20	0	1:20	55	24	4989	6868	7

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα ανάλυσης σε χρωματογραφία υψηλής πίεσης κλασικής εκχύλισης.
wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β..

Solvent	wt% Ethanol	wt% Water	Mass Ratio	Temp (°C)	Time (h)	Oleuropein (mg/ l extr)	Hydroxytyrosol (mg/ l extr)	Tyrosol (mg/ l extr)
Water	0	100	1:20	70	24	563	ND*	ND
Ethanol	100	0	1:20	55	10	4754	ND	ND
	100	0	1:20	55	17	6152	ND	ND
	70	30	1:20	55	24	15309	ND	129
	100	0	1:10	55	24	13116	73	ND
	100	0	1:20	55	24	6373	20	ND
	100	0	1:20	63	24	5058	ND	ND
	100	0	1:10	70	24	25841	ND	ND
	100	0	1:20	70	24	7043	ND	ND
	100	0	1:30	70	24	29580	ND	ND
ChCl:Urea (1:2)	0	30	1:30	55	24	1656	ND	ND
	0	0	1:20	55	24	1862	31	ND
	0	0	1:30	55	24	4867	ND	ND
	0	0	1:20	55	10	-	-	-
	20	0	1:20	55	24	7298	ND	ND
	0	30	1:20	70	24	5926	351	ND
	0	0	1:20	70	24	6728	246	ND
ChCl:AA (1:2)	0	0	1:30	55	24	3881	ND	ND
	0	30	1:20	55	24	4575	ND	ND
	0	0	1:20	55	24	5102	54	ND

0	30	1:20	70	24	3314	ND	ND
0	0	1:20	70	24	2131	ND	ND
0	0	1:20	55	10	7336	ND	ND
20	0	1:20	55	24	9014	ND	ND

*ND: Not Detected

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3, γίνεται αντιληπτό ότι όλα τα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε ελαιοευρωπεΐνη. Το εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αφορά σε διαλύτη αιθανόλη, θερμοκρασία 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:30 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση ανιχνεύθηκε στο εκχύλισμα με διαλύτη νερό, θερμοκρασία 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h.

Τα εκχυλίσματα με καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν και περισσότερο συνολικά φαινολικό περιεχόμενο. Ασφαλές συμπέρασμα δεν μπορεί να προκύψει από τις διακυμάνσεις της ελαιοευρωπεΐνης όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση. Η μη σύνδεση με την αντιοξειδωτική δράση ενδεχομένως να οφείλεται στην παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στα φύλλα της ελιάς, οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, καθώς και μη αντιοξειδωτικών παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης που ίσως να ανιχνεύονται ως ελαιοευρωπεΐνη (π.χ. διμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνη).

Υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε για όλους τους διαλύτες εκτός του νερού στους 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, στις οποίες συνθήκες, με ChCl:AA (1:2) λαμβάνουμε εκχυλίσματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε υδροξυτυροσόλη σε σχέση με τους ChCl:Urea (1:2) και αιθανόλη. Με αύξηση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στην αιθανόλη από 1:20 (0,05) σε 1:10 (0,1), λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα, καθώς επίσης και με αύξηση της θερμοκρασίας και ανάμειξη με νερό στον ChCl:Urea (1:2). Σε ανάμειξη του ChCl:Urea (1:2) με νερό, 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, έχουμε την υψηλότερη συγκέντρωση από όλα τα δείγματα. Το εκχύλισμα που προέκυψε από ανάμειξη αιθανόλης με νερό (70 – 30 % κ.β.), στους 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, ήταν το μόνο στο οποίο ανιχνεύθηκε τυροσόλη.

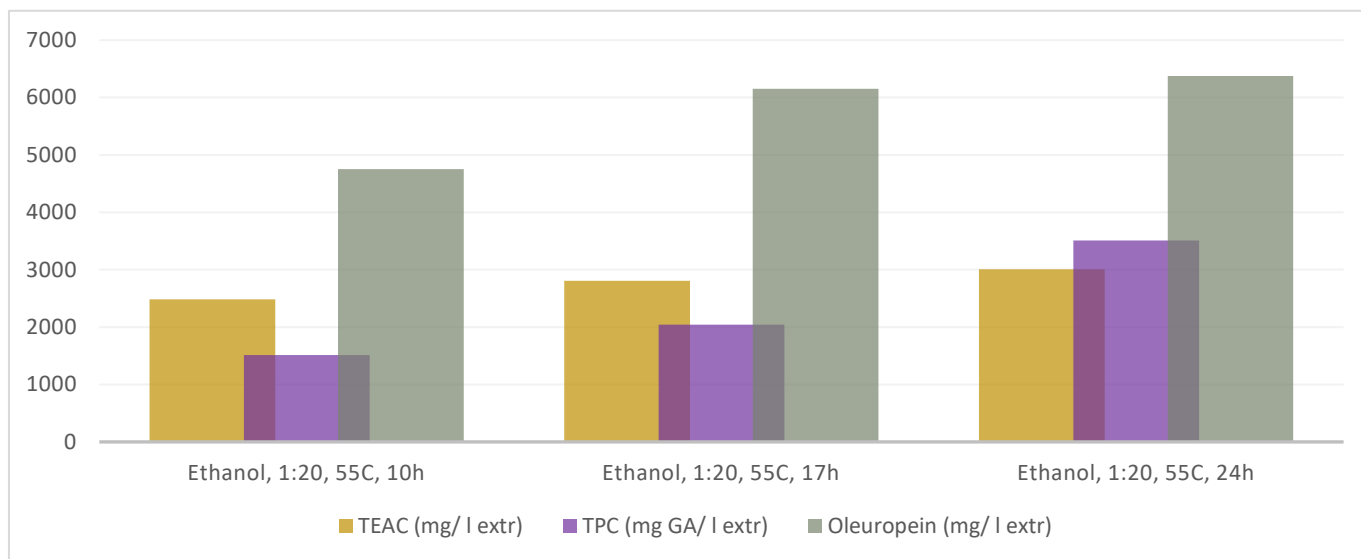
Βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν ότι η ελαιοευρωπεΐνη κυμαίνεται σε συγκεντρώσεις 60 – 90 mg/ g dw (ξηρού βάρους ή dry weight)^[3,4] και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε συγκεντρώσεις 30 – 170 mg GA/ g dw^[5,6,7,8]. Αξίζει να τονιστεί εδώ ότι η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ενώσεις εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία της ελιάς και την περίοδο συγκομιδής και για αυτόν τον λόγο, παρατηρείται και μεγάλη ασυνέπεια μεταξύ των βιβλιογραφικών δεδομένων, που καθιστά ανέφικτη την άμεση σύγκρισή τους. Στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα εκφράζονται ανά όγκο

εκχυλίσματος, καθώς είναι αδύνατη η απομάκρυνση των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, επομένως και η ανάκτηση καθαρών εκχυλισμάτων. Για να γίνει σύγκριση με τη βιβλιογραφία, ανάχθηκαν τα αποτελέσματα του εκχυλίσματος που προέκυψε με αιθανόλη στους 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h σε mg/ g dw. Σε αυτές τις συνθήκες, έχουμε 161,55 mg ελαιοευρωπεΐνης/ g dw, TPC 88,90 mg GA/ g dw και TEAC 232,48 mg/ g dw. Όπως διαπιστώνεται, τα φύλλα ελιάς που εξετάστηκαν περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ελαιοευρωπεΐνης σε σύγκριση με αυτά της βιβλιογραφίας. Σημειώνεται ότι η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών πηγών αναφέρεται σε εκχυλίσεις διάρκειας έως τεσσάρων ωρών (4 h).

Στο Παράρτημα Γ, παρουσιάζονται εικόνες με τον χρωματισμό των δειγμάτων κατά την ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου, καθώς και τυπικά παραδείγματα χρωματογραφημάτων.

3.2.3 Επίδραση χρόνου στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

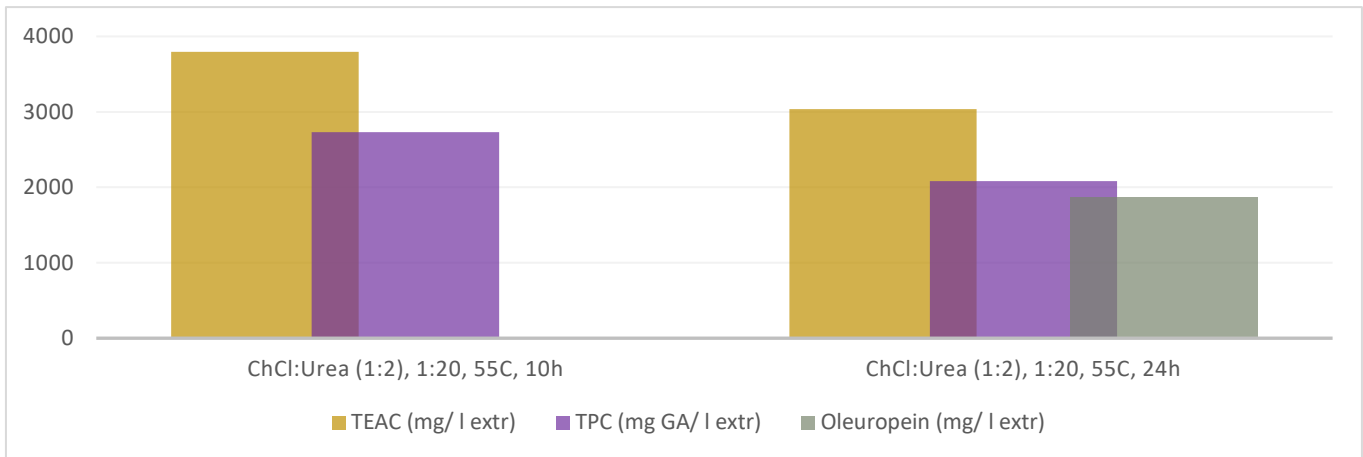
Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (Antioxidant Capacity ή AC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content ή TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης, του DES ChCl:Urea (1:2) και του DES ChCl:AA (1:2) από τον χρόνο απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3 αντίστοιχα, διατηρώντας τη θερμοκρασία και την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη σταθερά.



Διάγραμμα 3.1: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.

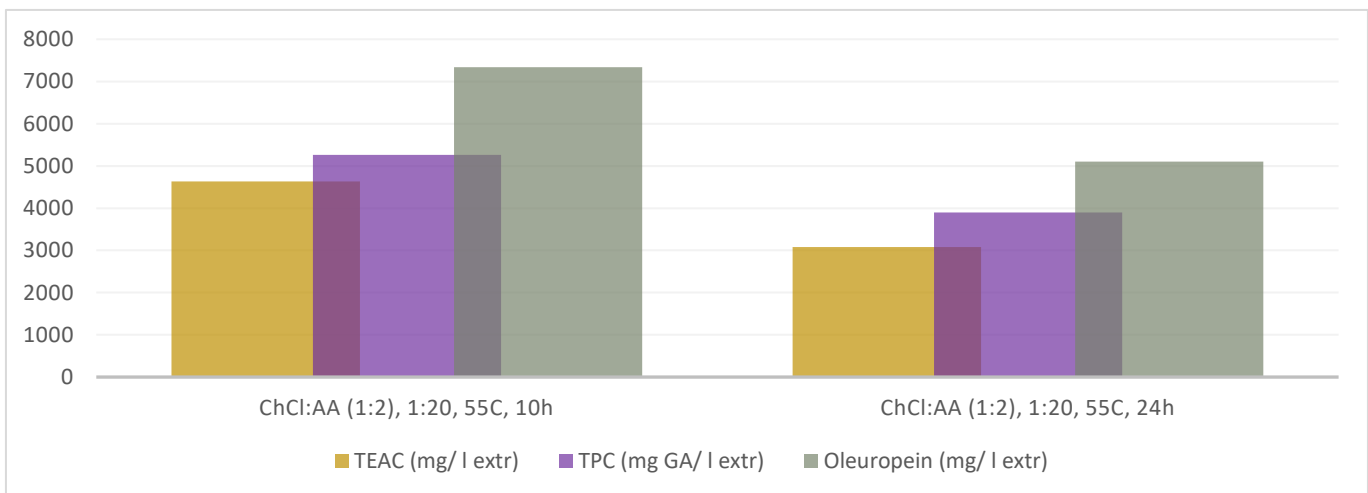
Από το Διάγραμμα 3.1, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και θερμοκρασία 55 °C, με αύξηση του χρόνου από τις 10 στις 17 και

στη συνέχεια, στις 24 ώρες (h), λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη είναι μεγαλύτερη μεταξύ 10 και 17 από ότι μεταξύ 17 και 24 h, ενώ η διαφορά του TPC μεταξύ 17 και 24 h σχεδόν τριπλασιάζεται από εκείνη μεταξύ 10 και 17 h. Η διαφορά στο TPC μεταξύ 17 και 24 h και στη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 10 και 17 h είναι σημαντική (>800 mg/ l εκχυλίσματος).



Διάγραμμα 3.2: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλίσμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.

Από το Διάγραμμα 3.2, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και θερμοκρασία 55 °C, με αύξηση του χρόνου από τις 10 στις 24 h, δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC μεταξύ 24 και 10 h είναι μικρή (<800 mg/ l εκχυλίσματος).



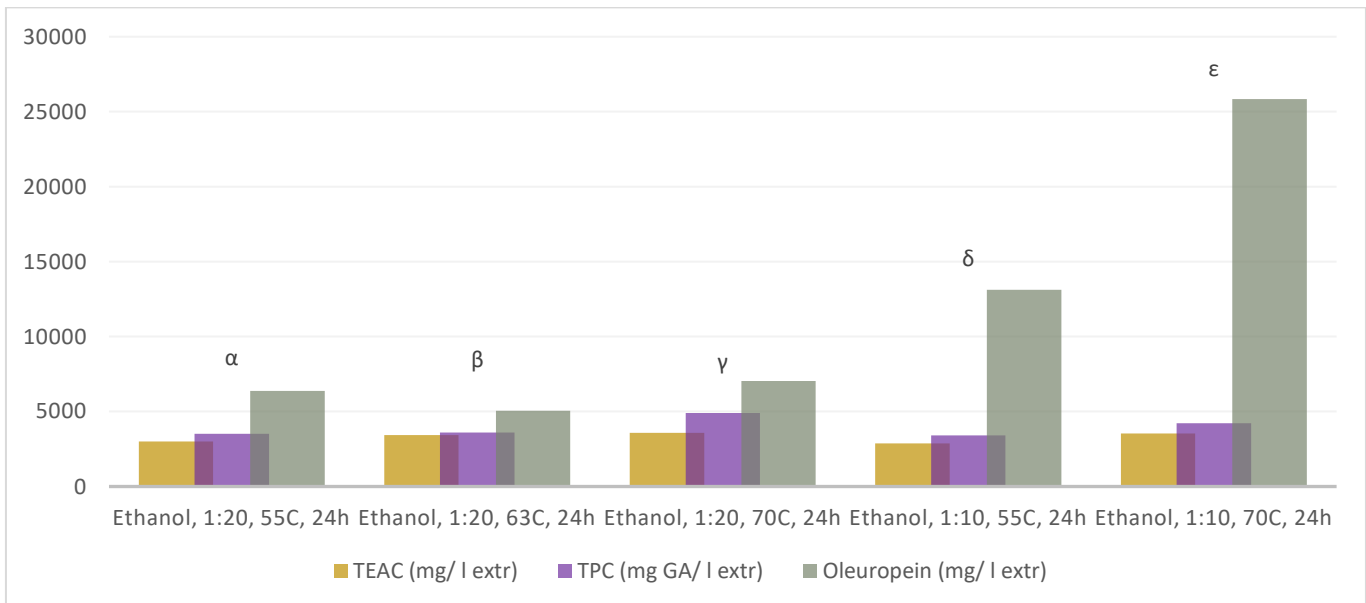
Διάγραμμα 3.3: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από τον χρόνο. Η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερές.

Από το Διάγραμμα 3.3, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και θερμοκρασία 55 °C, με αύξηση του χρόνου από τις 10 στις 24 h, όμοια με τον ChCl:Urea (1:2), δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 24 και 10 h είναι σημαντική.

Συνολικά, όσον αφορά τους διαλύτες αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), με αύξηση του χρόνου στο εύρος 10 – 24 h, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για την αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης.

3.2.4 Επίδραση θερμοκρασίας στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης, του DES ChCl:Urea (1:2) και του DES ChCl:AA (1:2) από τη θερμοκρασία απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.4, 3.5 και 3.6 αντίστοιχα, διατηρώντας τον χρόνο και την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη σταθερά.



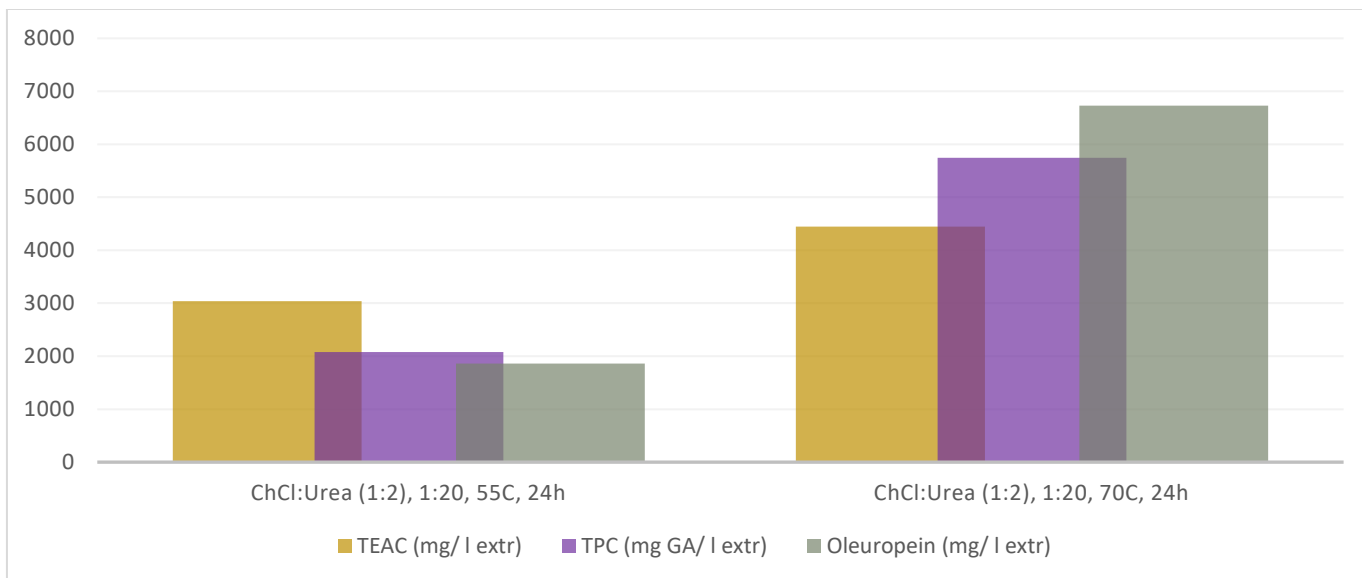
Διάγραμμα 3.4: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β, γ και δ, ε.

Από το Διάγραμμα 3.4 και τα σημεία α, β και γ, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 στους 63 και στη συνέχεια, στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλυτή αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC είναι μεγαλύτερη μεταξύ 55 και 63 από ότι μεταξύ 63 και 70 °C, ενώ η διαφορά του TPC μεταξύ 63 και 70 °C είναι σχεδόν δεκατρείς φορές μεγαλύτερη από εκείνη μεταξύ 55 και 63 °C. Η διαφορά του TPC μεταξύ 63 και 70 °C και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 55, 63 και 70 °C είναι σημαντική.

Από το Διάγραμμα 3.4 και τα σημεία δ και ε, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α, β και γ, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλυτή αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά του TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 55 και 70 °C είναι σημαντική, με τη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη σχεδόν να διπλασιάζεται.

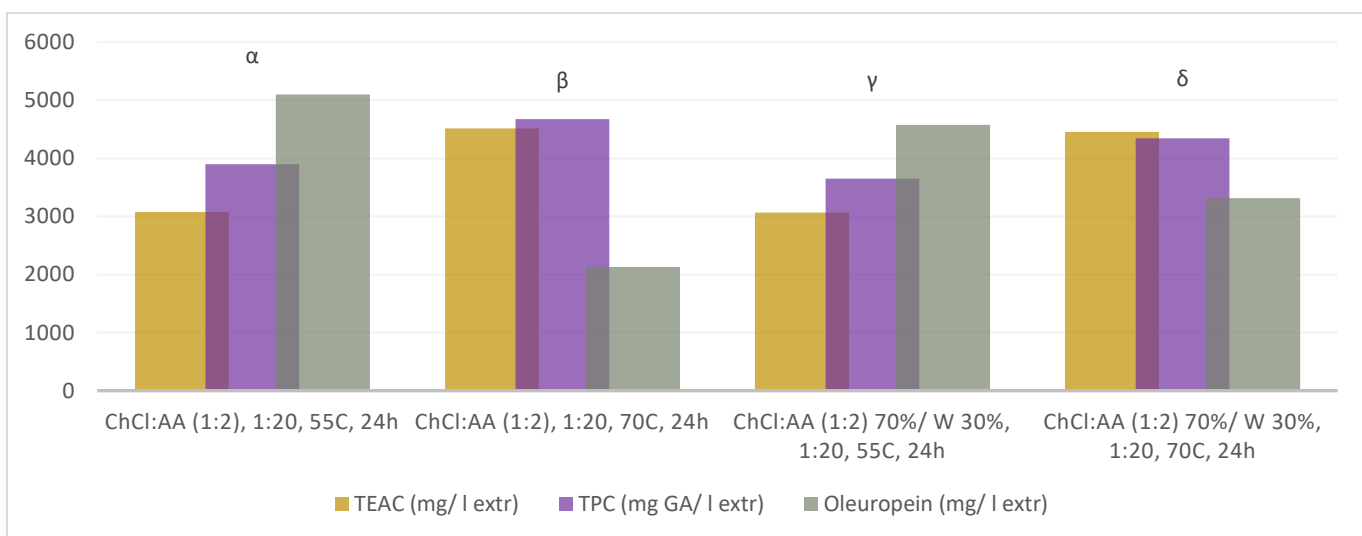
Σε μία μελέτη^[9], εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (25, 40 και 60 °C) στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης εκχυλισμάτων που προέκυψαν με κλασική υγρή εκχύλιση διάρκειας 4 h, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 βάρος κατ' όγκο και συμβατικό διαλύτη νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη αυξάνεται με τη θερμοκρασία και πιο συγκεκριμένα, ότι η συγκέντρωση ελαιοευρωπεΐνης αυξάνεται 18 φορές όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 25 στους 40 °C και 2,4 φορές όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 40 στους 60 °C. Οι συγγραφείς απέδωσαν αυτήν την αύξηση στην αύξηση της διαλυτότητας της ελαιοευρωπεΐνης σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Σε μία δεύτερη μελέτη^[10], εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (25, 40 και 60 °C) στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης εκχυλισμάτων που προέκυψαν με κλασική υγρή εκχύλιση διάρκειας 2 h, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:5 βάρος κατ' όγκο και συμβατικό διαλύτη αιθανόλη – νερό (70 – 30 % βάρος κατ' όγκο). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη αυξάνεται με τη θερμοκρασία και πιο συγκεκριμένα, ότι η αύξηση στη συγκέντρωση ελαιοευρωπεΐνης είναι σημαντική όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 25 στους 40 °C και μικρή όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 40 στους 60 °C. Οι συγγραφείς απέδωσαν αυτήν την αύξηση στην αύξηση της διαλυτότητας της ελαιοευρωπεΐνης και των συντελεστών διάχυσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες.



Διάγραμμα 3.5: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.5, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 55 και 70 °C είναι σημαντική.



Διάγραμμα 3.6: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

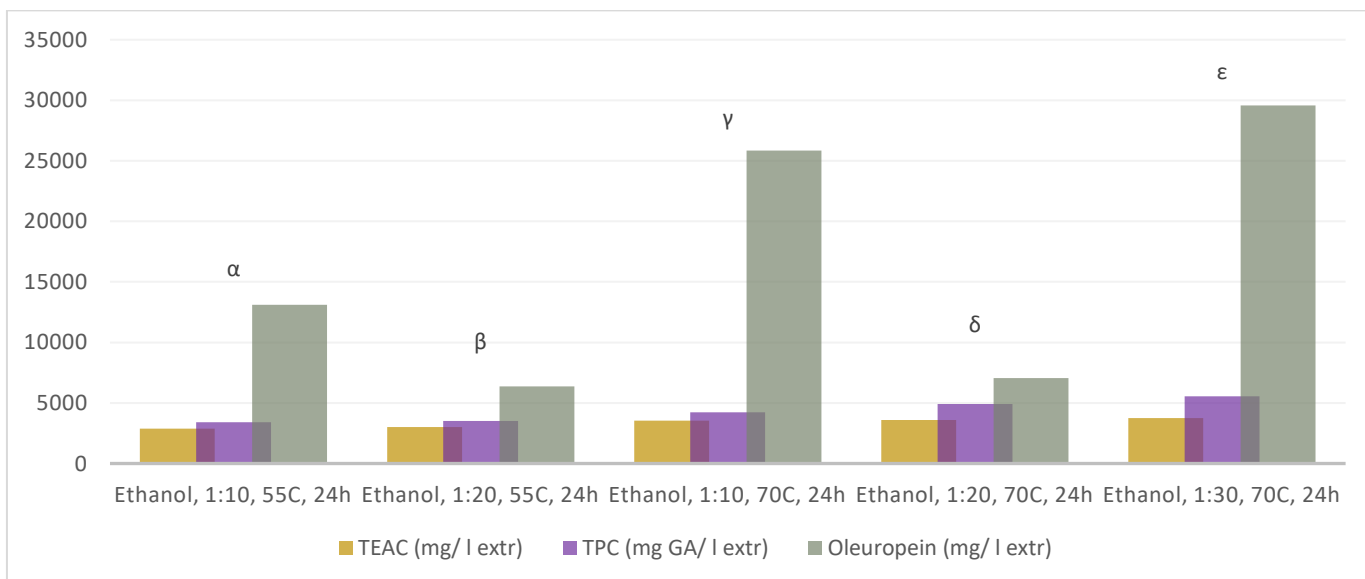
Από το Διάγραμμα 3.6 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC, αλλά όχι όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 55 και 70 °C είναι σημαντική.

Από το Διάγραμμα 3.6 και τα σημεία γ και δ, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α και β, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2) αναμειγμένο με νερό 30 % κατά βάρος, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC, αλλά όχι όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ 55 και 70 °C είναι σημαντική.

Συνολικά, όσον αφορά τους διαλύτες αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 – 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για όλους τους διαλύτες, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης, με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 – 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για τους αιθανόλη και ChCl:Urea (1:2).

3.2.5 Επίδραση αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης, του DES ChCl:Urea (1:2) και του DES ChCl:AA (1:2) από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.7, 3.8 και 3.9 αντίστοιχα, διατηρώντας τον χρόνο και τη θερμοκρασία σταθερά.

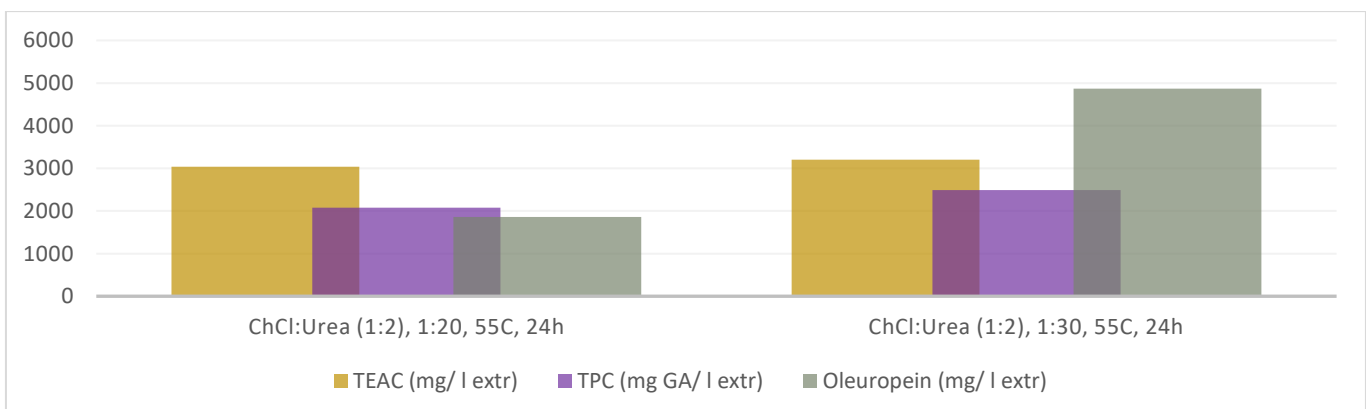


Διάγραμμα 3.7: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ, ε.

Από το Διάγραμμα 3.7 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C και χρόνο εκχύλισης 24 h, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από 1:10 (0,1) σε 1:20 (0,05) , λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλυτή αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC, αλλά όχι όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC μεταξύ 1:10 και 1:20 είναι μικρή, ενώ της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική. Η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη σχεδόν υποδιπλασιάζεται.

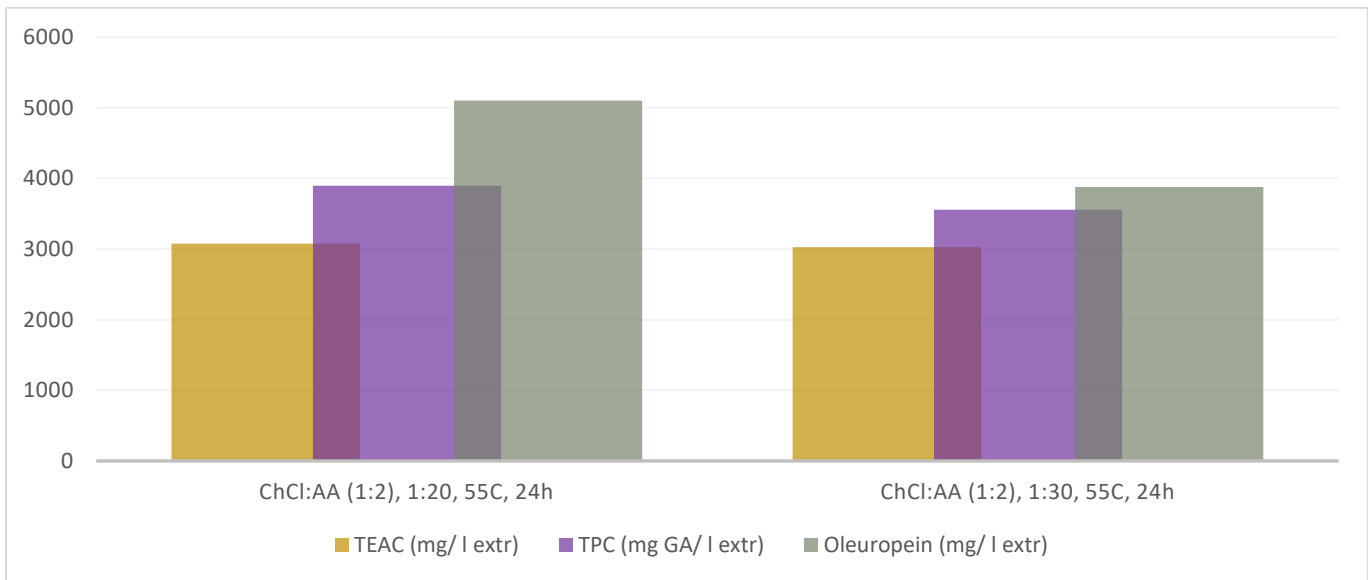
Από το Διάγραμμα 3.7 και τα σημεία γ, δ και ε, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α και β, για σταθερή θερμοκρασία 70 °C και χρόνο εκχύλισης 24 h, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από την 1:10 στην 1:20 και στη συνέχεια, στην 1:30, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλυτή αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC είναι μεγαλύτερη μεταξύ 1:20 και 1:30 από ότι μεταξύ 1:10 και 1:20, αν και μικρή, ενώ η διαφορά του TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη είναι σημαντική.

Σε μία μελέτη^[10], εξετάστηκε η επίδραση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη (1:3, 1:5, 1:7, 1:10 βάρος κατ' όγκο) στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης εκχυλισμάτων που προέκυψαν με κλασική υγρή εκχύλιση διάρκειας 2 h, σε θερμοκρασία 25 °C και με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη – νερό (70 – 30 % βάρος κατ' όγκο). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη αυξάνεται με τη μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη και πιο συγκεκριμένα, ότι η αύξηση στη συγκέντρωση ελαιοευρωπεΐνης είναι σημαντική όταν η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη μειώνεται από 1:7 σε 1:10 κ.β. και μικρή μεταξύ των υπόλοιπων εξεταζόμενων αναλογιών. Οι συγγραφείς απέδωσαν αυτήν την αύξηση στο γεγονός ότι μικρότερη αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παρέχει μεγαλύτερη κινητήρια δύναμη για την εκχύλιση, σύμφωνα με τους νόμους που διέπουν το φαινόμενο της διάχυσης.



Διάγραμμα 3.8: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.8, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C και χρόνο εκχύλισης 24 h, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από 1:20 σε 1:30, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC μεταξύ 1:20 και 1:30 είναι μικρή, ενώ της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική. Η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη μεγαλώνει σχεδόν κατά δυόμιση φορές.



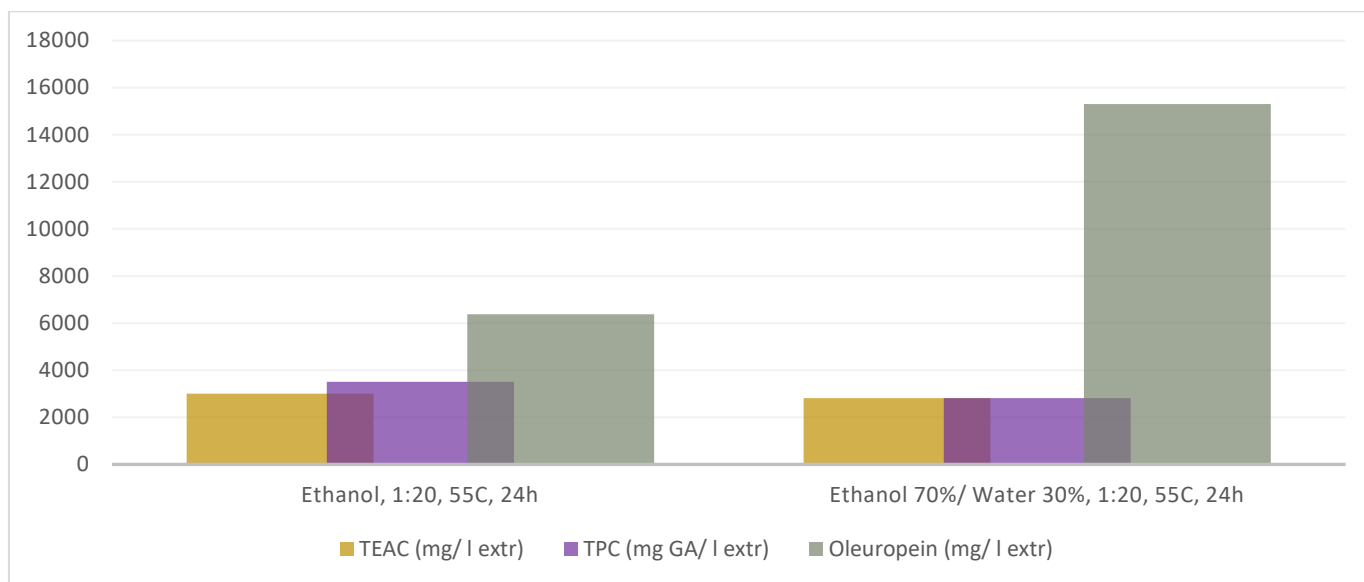
Διάγραμμα 3.9: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος και η θερμοκρασία παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.9, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C και χρόνο εκχύλισης 24 h, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από 1:20 σε 1:30, δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC μεταξύ 1:20 και 1:30 είναι μικρή, ενώ της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική.

Συνολικά, όσον αφορά τους διαλύτες αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:10 – 1:30 κ.β., λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για τους αιθανόλη και ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης.

3.2.6 Επίδραση ανάμειξης με νερό στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

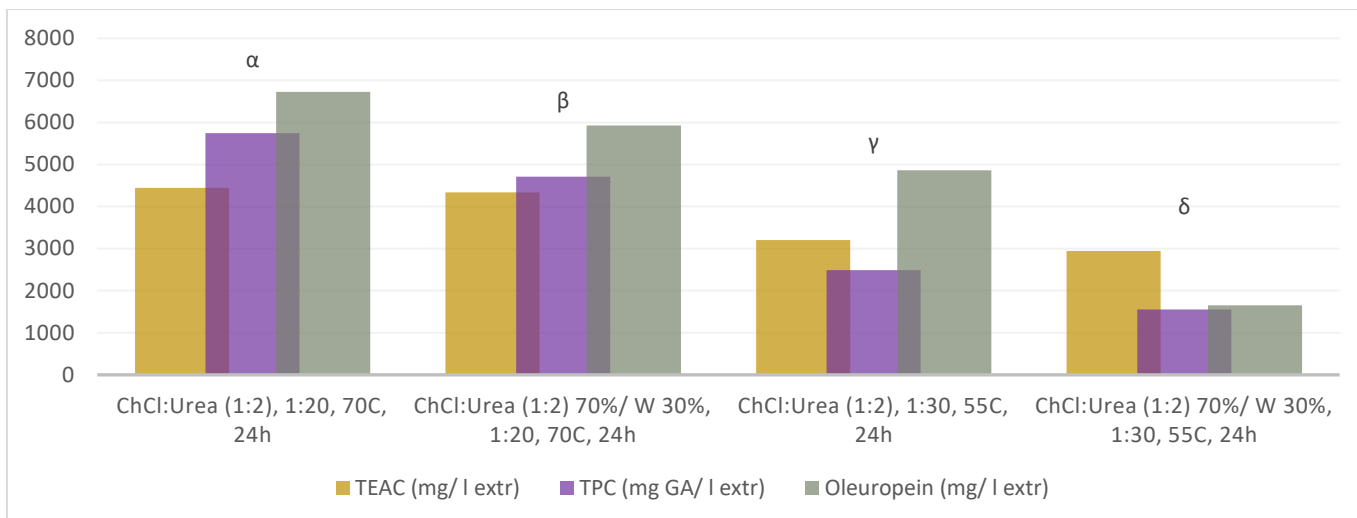
Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης, του DES ChCl:Urea (1:2) και του DES ChCl:AA (1:2) από την ανάμειξη με νερό απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.10, 3.11 και 3.12 αντίστοιχα, διατηρώντας τον χρόνο, τη θερμοκρασία και την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη σταθερά.



Διάγραμμα 3.10: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.10, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με νερό 30 % κατά βάρος (κ.β.), δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο TPC, αλλά όχι όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC είναι μικρή, ενώ της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική.

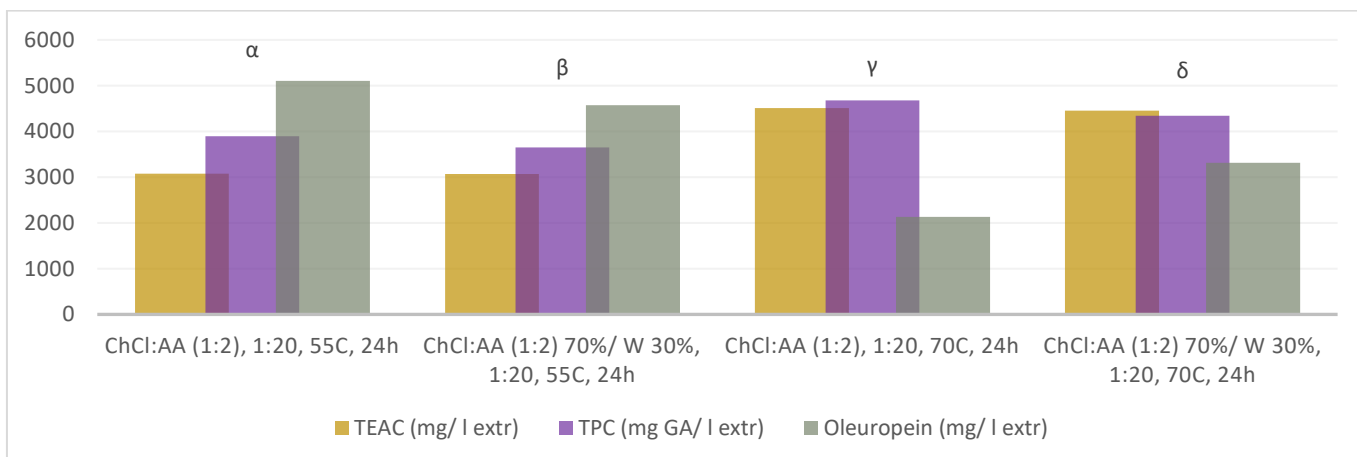
Σε μία μελέτη^[9], εξετάστηκε η επίδραση της ανάμειξης με νερό (20, 50 % κατ' όγκο) στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης εκχυλισμάτων που προέκυψαν με κλασική υγρή εκχύλιση διάρκειας 4 h, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 βάρος κατ' όγκο και συμβατικό διαλύτη αιθανόλη. Η υψηλότερη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη προέκυψε με ανάμειξη με νερό 20 % κατ' όγκο, ακολουθούμενη από την ανάμειξη με νερό 50 % κατ' όγκο και την καθαρή αιθανόλη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με μίας δεύτερης μελέτης^[11], που έδειξε ότι η χρήση νερού ως συνδιαλύτη με οργανικούς διαλύτες αυξάνει την ποσότητα της εκχυλισμένης ελαιοευρωπεΐνης.



Διάγραμμα 3.11: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

Από το Διάγραμμα 3.11 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC είναι μικρή, ενώ του TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική.

Από το Διάγραμμα 3.11 και τα σημεία γ και δ, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α και β, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:30 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β. δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά της AC είναι μικρή, ενώ του TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική.



Διάγραμμα 3.12: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με νερό. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

Από το Διάγραμμα 3.12 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη είναι μικρή.

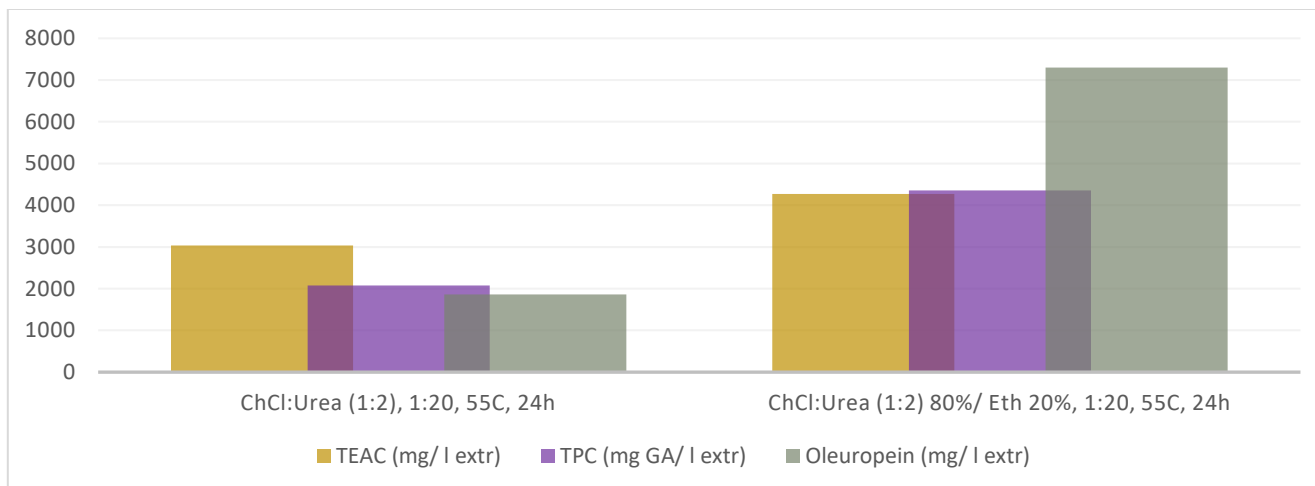
Από το Διάγραμμα 3.12 και τα σημεία γ και δ, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC, αλλά όχι όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC είναι μικρή, ενώ της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη σημαντική.

Τα αποτελέσματα για τους DESs έρχονται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, καθώς η ανάμειξη με νερό μειώνει το ιξώδες, συνεπώς και διευκολύνει τα φαινόμενα διάχυσης, και αυξάνει την πολικότητα, συνεπώς και διευκολύνει την ανάκτηση πολικών ενώσεων, όπως των φαινολικών^[12]. Ειδικά για τον ChCl:Urea (1:2), σε μία μελέτη^[13], για εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα διάρκειας 20 λεπτών, σε αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:7,5 βάρος κατ' όγκο, ανάμειξη με νερό 25 % κατά βάρος αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη.

Συνολικά, όσον αφορά τους διαλύτες αιθανόλη, ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για όλους τους διαλύτες, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης, με ανάμειξη με νερό 30 % κ.β., λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για την αιθανόλη.

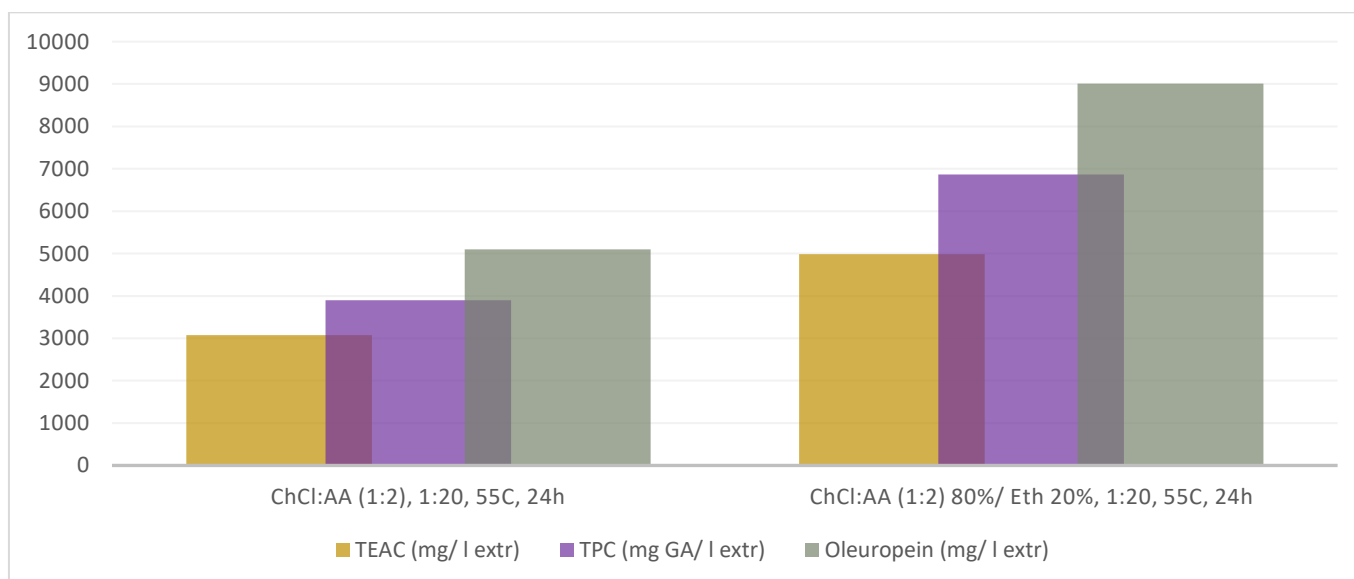
3.2.7 Επίδραση ανάμειξης με αιθανόλη στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του DES ChCl:Urea (1:2) και του DES ChCl:AA (1:2) από την ανάμειξη με αιθανόλη απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.13 και 3.14 αντίστοιχα, διατηρώντας τον χρόνο, τη θερμοκρασία και την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη σταθερά.



Διάγραμμα 3.13: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:Urea (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με αιθανόλη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.13, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, με ανάμειξη με αιθανόλη 20 % κατά βάρος (κ.β.), λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:Urea (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη είναι σημαντική.



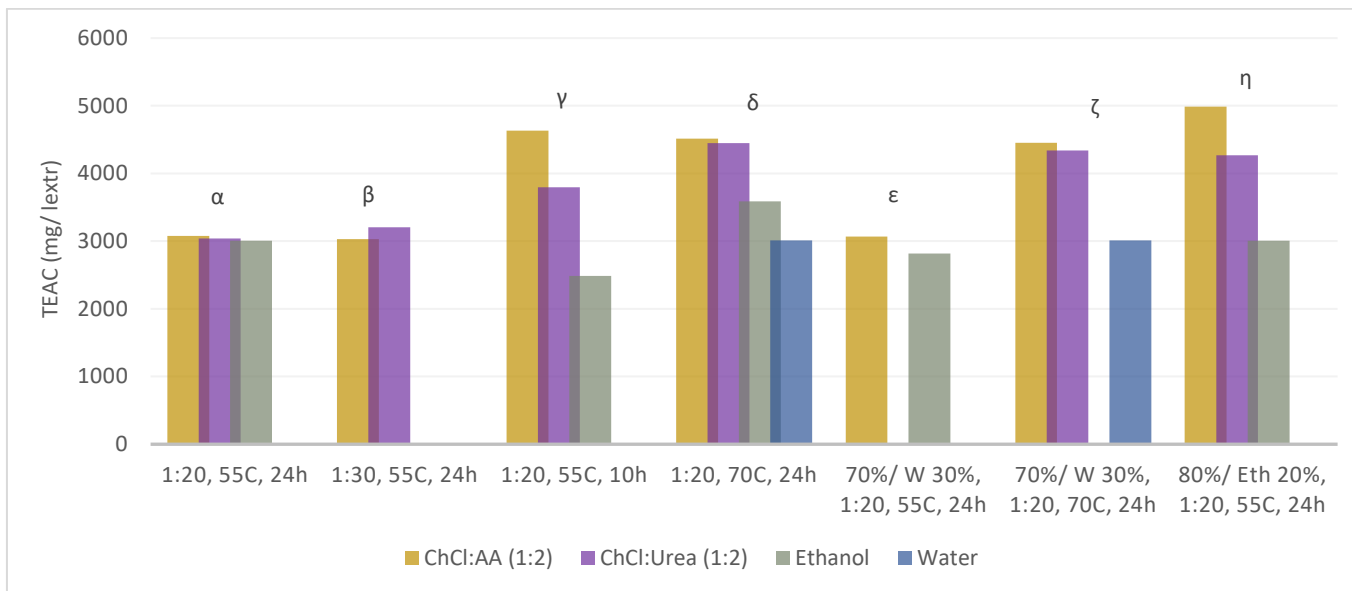
Διάγραμμα 3.14: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων του ChCl:AA (1:2) με κλασική εκχύλιση από την ανάμειξη με αιθανόλη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά.

Από το Διάγραμμα 3.14, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, όμοια με τον ChCl:Urea (1:2), με ανάμειξη με αιθανόλη 20 % κ.β., λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για διαλύτη ChCl:AA (1:2), τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Η διαφορά των AC, TPC και της συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη είναι σημαντική.

Συνολικά, όσον αφορά τους DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2), με ανάμειξη με αιθανόλη 20 % κ.β., λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για όλους τους διαλύτες, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης.

3.2.8 Σύγκριση διαλυτών

Στα Διαγράμματα 3.15, 3.16, 3.17, συγκρίνονται η αντιοξειδωτική δράση (AC), το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και η συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη αντίστοιχα των εκχυλισμάτων του DES ChCl:AA (1:2), του DES ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες. Για μείγματα των DESs με νερό 30 % κατά βάρος (κ.β.), τα αποτελέσματα συγκρίνονται με εκείνα του μείγματος αιθανόλης – νερού (70 – 30 % κ.β.) και του καθαρού νερού στις ίδιες συνθήκες. Για μείγματα των DESs με αιθανόλη 20 % κ.β., τα αποτελέσματα συγκρίνονται με εκείνα της καθαρής αιθανόλης στις ίδιες συνθήκες.



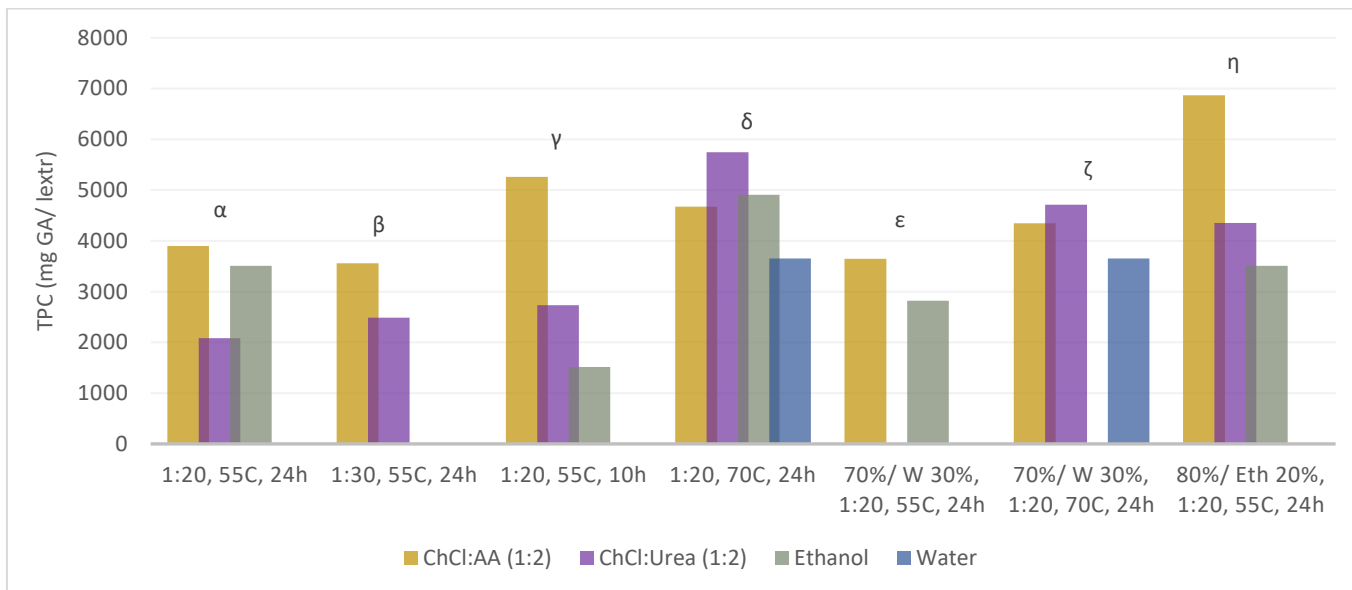
Διάγραμμα 3.15: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.

Από το Διάγραμμα 3.15, παρατηρούμε ότι εκχυλίσματα με διαλύτη τον ChCl:AA (1:2) παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (AC) σε όλα τα εξεταζόμενα πειραματικά σημεία εκτός από το β. Μία πιθανή εξήγηση για την καλύτερη AC του

εκχυλίσματος με διαλύτη ChCl:Urea (1:2) σε αυτό το σημείο (β) είναι ότι με ChCl:Urea (1:2), λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα σε μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη σε 1:30, σε αντίθεση με τον ChCl:AA (1:2), όπως μπορεί να φανεί με σύγκριση των σημείων α και β.

Η διαφορά AC μεταξύ των ChCl:AA (1:2) και ChCl:Urea (1:2) είναι μικρή στα περισσότερα πειραματικά σημεία (α, β, δ, ζ), αλλά διευρύνεται σημαντικά στα σημεία γ και η, σε θερμοκρασία 55 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο 10 h ή 24 h και ανάμειξη με αιθανόλη 20 % κ.β. αντίστοιχα. Η διαφορά AC μεταξύ των ChCl:AA (1:2) και αιθανόλη είναι μικρή στα σημεία α και ε, αλλά διευρύνεται σημαντικά στα σημεία γ, δ και η. Η διαφορά AC μεταξύ των ChCl:AA (1:2) και νερό είναι σημαντική και στα δύο εξεταζόμενα πειραματικά σημεία (δ, ζ).

Συνολικά, με ChCl:AA (1:2), λαμβάνονται εκχυλίσματα με την καλύτερη AC, ακολουθούμενα από εκχυλίσματα με ChCl:Urea (1:2), αιθανόλη και νερό. Στις βέλτιστες συνθήκες (σημείο η), ο ChCl:AA έχει μία διαφορά AC από την αιθανόλη που ανέρχεται περίπου στα 2000 mg Trolox/ l εκχυλίσματος, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό +66 %, γεγονός που τον καθιστά ανταγωνιστική επιλογή.



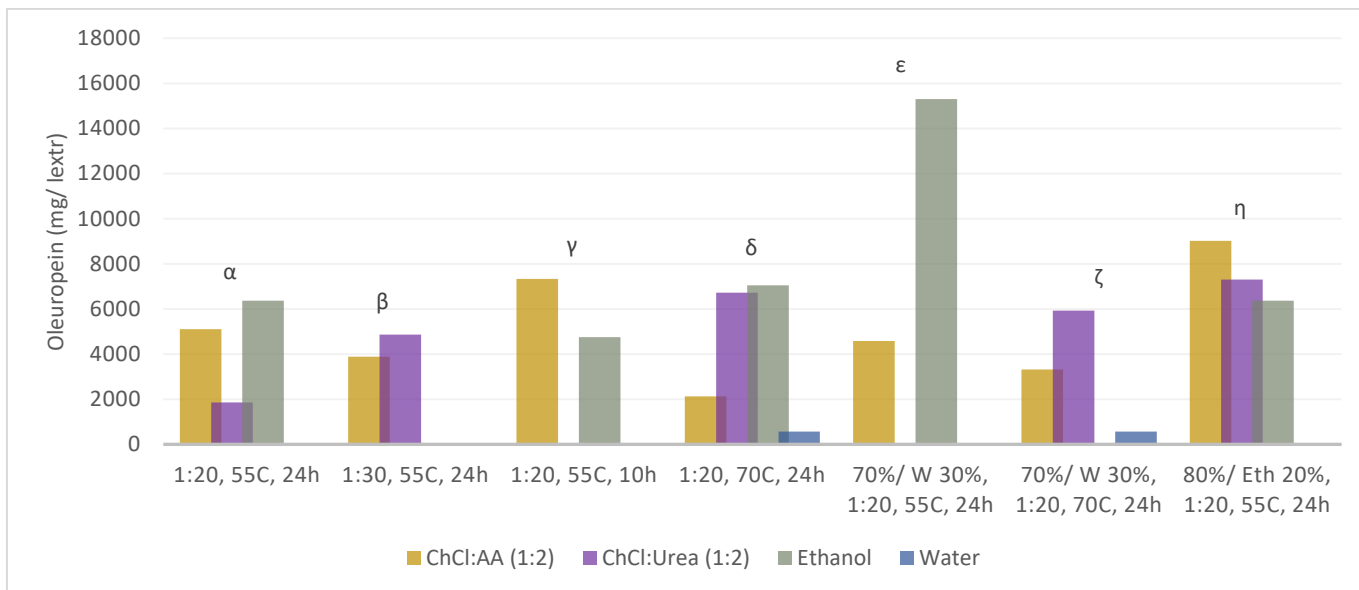
Διάγραμμα 3.16: Σύγκριση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.

Από το Διάγραμμα 3.16, παρατηρούμε ότι εκχυλίσματα με διαλύτη τον ChCl:AA (1:2) παρουσιάζουν υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) σε όλα τα εξεταζόμενα πειραματικά σημεία εκτός από τα δ, ζ.

Η διαφορά TPC μεταξύ των ChCl:AA (1:2) και ChCl:Urea (1:2) είναι σημαντική στα περισσότερα πειραματικά σημεία (α, β, γ, δ, η). Η διαφορά TPC μεταξύ των ChCl:AA (1:2)

και αιθανόλη είναι μικρή στα σημεία α και δ, αλλά διευρύνεται σημαντικά στα σημεία γ, ε και η. Η διαφορά TPC μεταξύ των ChCl:AA (1:2) και νερό είναι σημαντική και στα δύο εξεταζόμενα πειραματικά σημεία (δ, ζ).

Συνολικά, με ChCl:AA (1:2), λαμβάνονται εκχυλίσματα με το υψηλότερο TPC, ακολουθούμενα από εκχυλίσματα με ChCl:Urea (1:2), αιθανόλη και νερό. Στις βέλτιστες συνθήκες (σημείο η), ο ChCl:AA (1:2) έχει μία διαφορά TPC από την αιθανόλη που ανέρχεται περίπου στα 3400 mg GA/ l εκχυλίσματος, δηλαδή παρουσιάζει σχεδόν διπλάσιο TPC, γεγονός που τον καθιστά ανταγωνιστική επιλογή.



Διάγραμμα 3.17: Σύγκριση συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης του ChCl:AA (1:2), του ChCl:Urea (1:2), της αιθανόλης και του νερού στις ίδιες συνθήκες.

Από το Διάγραμμα 3.17, παρατηρούμε ότι εκχυλίσματα με διαλύτη την αιθανόλη παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη στα περισσότερα σημεία (α, δ, ε), ενώ εκχυλίσματα με διαλύτη τον ChCl:Urea (1:2) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη στα σημεία β και ζ και εκχυλίσματα με διαλύτη τον ChCl:AA (1:2) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη στα σημεία γ και η. Η διαφορά συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη μεταξύ των διαλυτών είναι σημαντική σε όλα τα εξεταζόμενα σημεία εκτός της διαφοράς μεταξύ των ChCl:Urea (1:2) και αιθανόλη στο σημείο δ.

Στις βέλτιστες συνθήκες (σημείο ε), η αιθανόλη έχει μία διαφορά συγκέντρωσης σε ελαιοευρωπεΐνη από τον ChCl:AA (1:2) που ανέρχεται περίπου στα 10700 mg/ l εκχυλίσματος, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό +230 %. Στις βέλτιστες συνθήκες του ChCl:AA (1:2) (σημείο η), ο ChCl:AA (1:2) έχει μία διαφορά συγκέντρωσης σε

ελαιοευρωπείνη από την αιθανόλη που ανέρχεται περίπου στα 2600 mg/l εκχυλίσματος, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό +40 %.

Η επιτυχία του ChCl:AA (1:2) είναι πολύ υποσχόμενη. Αν συνδυαστούν οι βέλτιστες παράμετροι, μπορούν να προκύψουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, ανάμειξη 20 % κ.β. ή μεγαλύτερη με αιθανόλη, θερμοκρασία 70 °C, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνος μικρότερος των 10 h.

3.3 Αποτελέσματα και σχολιασμός εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα

3.3.1 Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη

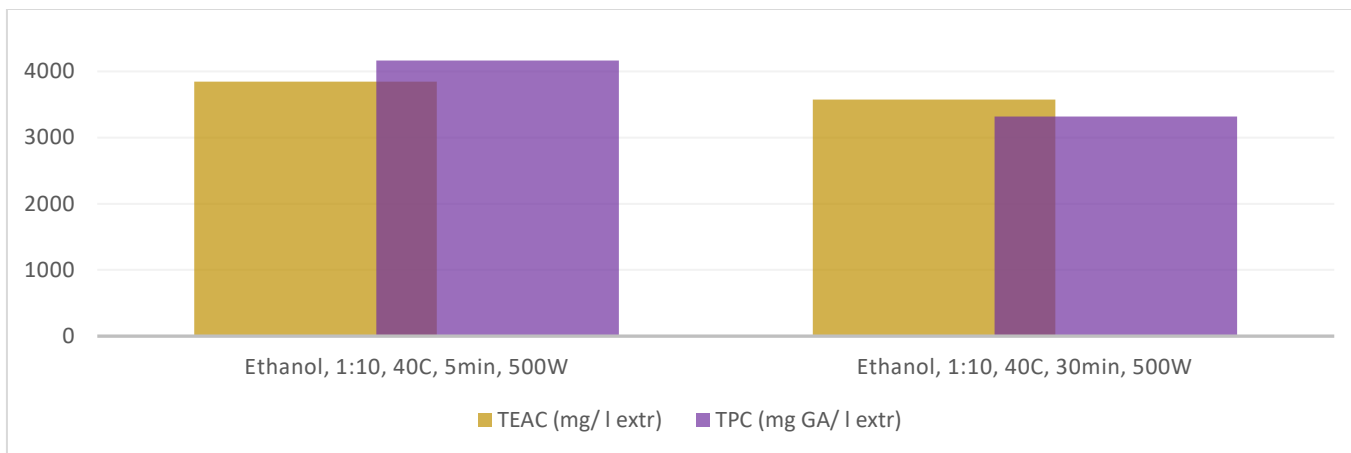
Τα αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (MAE) με διαλύτη αιθανόλη κατά σειρά αυξανόμενης αντιοξειδωτικής δράσης καταγράφονται στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση (STDEV) για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. wt%: ποσοστό κ.β., Mass Ratio: αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β..

wt% Ethanol	Mass Ratio	Temp (°C)	Time (min)	Power (Watt)	TEAC (mg/l extr)	TPC mg GA/l extr	STDEV
100	1:30	40	5	750	1588	1083	6
100	1:30	40	5	500	1856	1373	6
100	1:30	40	30	500	1960	1445	1
100	1:20	55	5	630	2071	1787	2
100	1:10	40	30	500	3574	3318	5
100	1:10	40	5	750	3609	3428	5
100	1:10	40	5	500	3848	4166	6
100	1:10	70	30	500	4379	4438	1

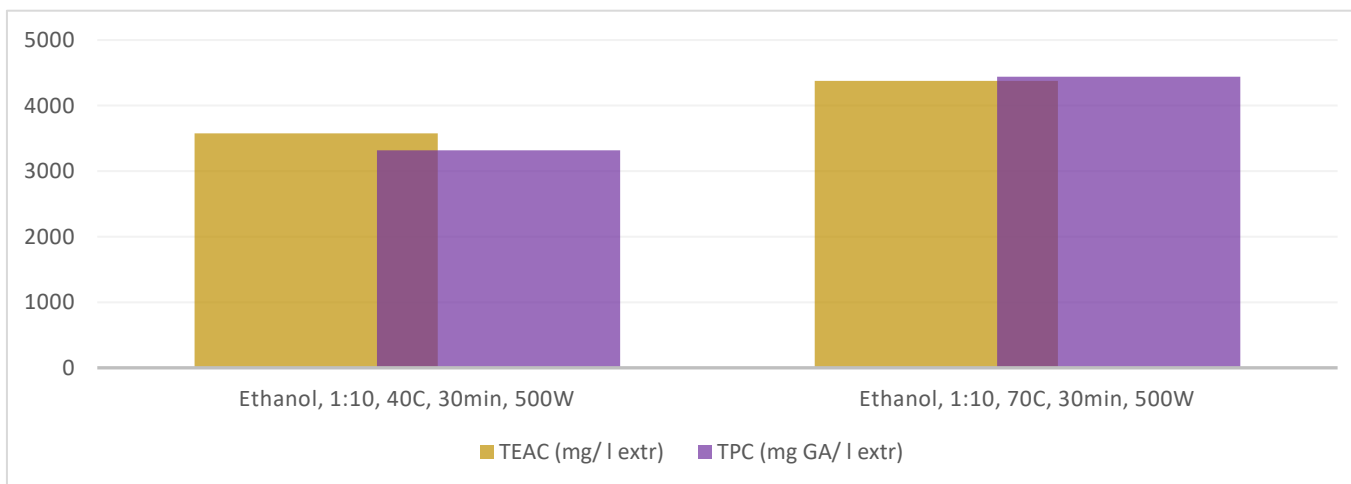
3.3.2 Επίδραση λειτουργικών παραμέτρων εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα στην ποιότητα των εκχυλισμάτων

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) από τον χρόνο, τη θερμοκρασία, την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και την ισχύ απεικονίζονται στα Διαγράμματα 3.18, 3.19, 3.20, 3.21. αντίστοιχα, διατηρώντας τις εκάστοτε άλλες δύο παραμέτρους σταθερές.



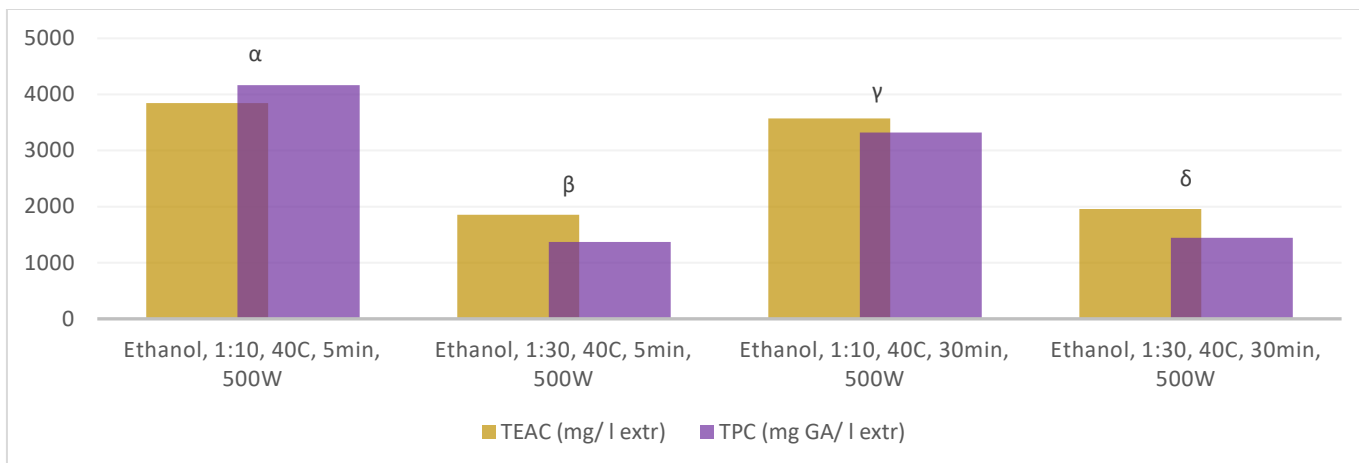
Διάγραμμα 3.18: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από τον χρόνο. Η θερμοκρασία, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και η ισχύς παραμένουν σταθερές.

Από το Διάγραμμα 3.18, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β., θερμοκρασία 40 °C και ισχύ 500 W, με αύξηση του χρόνου από τα 5 στα 30 λεπτά, δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά του TPC είναι σημαντική.



Διάγραμμα 3.19: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από τη θερμοκρασία. Ο χρόνος, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και η ισχύς παραμένουν σταθερά.

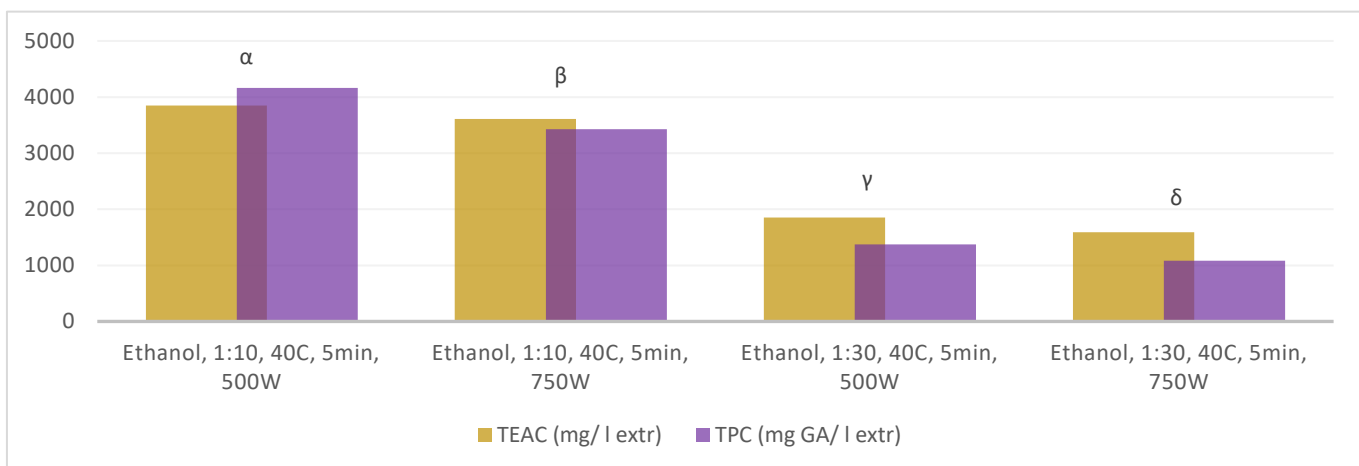
Από το Διάγραμμα 3.19, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β., ισχύ 500 W και χρόνο 30 λεπτά, με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 70 °C, λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC είναι σημαντική.



Διάγραμμα 3.20: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα από την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η ισχύς παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

Από το Διάγραμμα 3.20 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή θερμοκρασία 40 °C, ισχύ 500 W και χρόνο 5 λεπτά, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από 1:10 σε 1:30 κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC είναι σημαντική.

Από το Διάγραμμα 3.20 και τα σημεία γ και δ, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α και β, για σταθερή θερμοκρασία 40 °C, ισχύ 500 W και χρόνο 30 λεπτά, με μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη από 1:10 σε 1:30 κ.β., δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC είναι σημαντική.



Διάγραμμα 3.21: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με υγρή εκχύλιση υποβοηθούμενη με

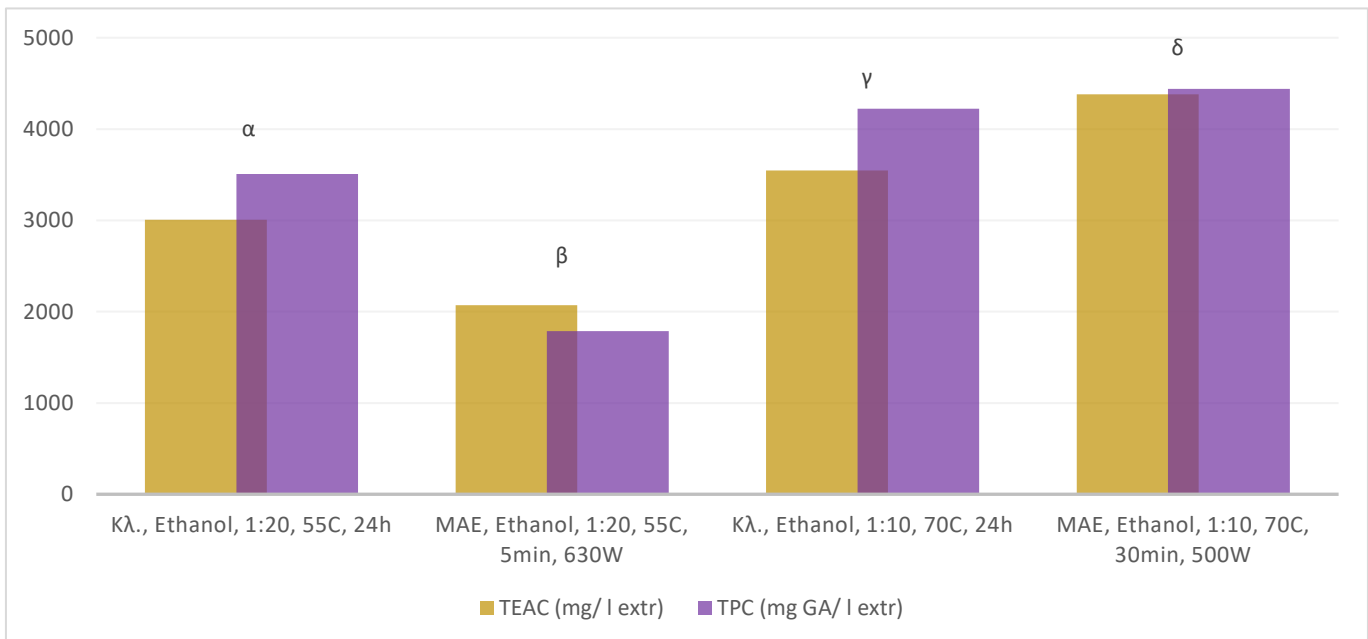
μικροκύματα από την ισχύ. Ο χρόνος, η θερμοκρασία και η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παραμένουν σταθερά. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

Από το Διάγραμμα 3.21 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β., θερμοκρασία 40 °C και χρόνο 5 λεπτά, με αύξηση της ισχύος από 500 σε 750 W, δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC είναι μικρή.

Από το Διάγραμμα 3.21 και τα σημεία γ και δ, παρατηρούμε ότι, όμοια με τα α και β, για σταθερή αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:30 κ.β., θερμοκρασία 40 °C και χρόνο 5 λεπτά, με αύξηση της ισχύος από 500 σε 750 W, δε λαμβάνονται καλύτερα αποτελέσματα για MAE με διαλύτη αιθανόλη, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC. Η διαφορά των AC, TPC είναι μικρή.

3.3.3 Σύγκριση εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με την κλασική υγρή εκχύλιση με συμβατικό διαλύτη αιθανόλη

Στο Διάγραμμα 3.22, συγκρίνονται η αντιοξειδωτική δράση (AC) και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα της αιθανόλης στην ίδια αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και θερμοκρασία.



Διάγραμμα 3.22: Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων κλασικής εκχύλισης και εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα της αιθανόλης στην ίδια αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και θερμοκρασία. Συγκρίνονται μεταξύ τους τα σημεία α, β και γ, δ.

Από το Διάγραμμα 3.22 και τα σημεία α και β, παρατηρούμε ότι σε αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και θερμοκρασία 55 °C, με τη MAE, λήφθηκε εκχύλισμα που έφτασε σε χρόνο 5 λεπτών σε ποσοστό 69 % τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης για 24 ώρες (h) όσον αφορά την AC και σε ποσοστό 51 % όσον αφορά το TPC. Από τα σημεία γ και δ, σε αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β. και θερμοκρασία 70 °C, με τη MAE, λήφθηκε εκχύλισμα που ξεπέρασε σε χρόνο 30 λεπτών σε ποσοστό +23 % τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης για 24 h όσον αφορά την AC και σε ποσοστό +5 % όσον αφορά το TPC.

Η MAE φαίνεται πολύ υποσχόμενη. Αν συνδυαστούν οι βέλτιστες παράμετροι, μπορούν να προκύψουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, θερμοκρασία 70 °C, ισχύς 500 W ή μικρότερη, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β. ή μεγαλύτερη και χρόνος 5 min ή μικρότερος.

3.4 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των βαθέν ευτηκτικών διαλυτών χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol & εξαγωγή εμπειρικών συσχετίσεων με τη θερμοκρασία

3.4.1 Αποτελέσματα και σχολιασμός μετρήσεων πυκνότητας και ιξώδους των βαθέν ευτηκτικών διαλυτών χλωριούχος χολίνη/ ουρία 1:2 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ 1:2 κατά mol

Μετρήθηκαν το ιξώδες και η πυκνότητα των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5 και 3.6 αντίστοιχα.

Πίνακας 3.5: Μετρήσεις πυκνότητας των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) σε θερμοκρασία 20 – 95 °C.

ChCl:Urea (1:2)		ChCl:AA (1:2)	
T (°C)	Density, ρ (g/ cm ³)	T (°C)	Density, ρ (g/ cm ³)
20	1,1972	20,05	1,1144
25	1,1944	25,00	1,1113
30	1,1915	30,00	1,1080
35	1,1888	35,00	1,1048
40	1,1861	40,00	1,1016
45	1,1836	45,00	1,0986
50	1,1812	50,00	1,0957
55	1,1779	55,00	1,0919
60	1,1752	60,00	1,0888
65	1,1725	65,00	1,0856
70	1,1698	70,00	1,0825

75	1,1671	75,01	1,0794
80	1,1644	80,01	1,0763
85	1,1618	85,01	1,0733
		90,01	1,0702
		95,02	1,0672

Πίνακας 3.6: Μετρήσεις ιξώδους των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) σε θερμοκρασία 20 – 90 °C. Σημειώνεται η τυπική απόκλιση.

T (°C)	ChCl:Urea (1:2)		ChCl:AA (1:2)	
	Viscosity, η (cP)	STDEV	Viscosity, η (cP)	STDEV
20	1825,0	15,4	100,5	0,4
25	1082,0	3,6	77,2	0,4
30	669,6	3,2	59,8	0,1
35	431,7	1,6	47,4	0,1
40	290,8	1,8	38,3	0,0
45	201,9	1,3	31,4	0,2
50	144,6	1,3	26,1	0,0
55	105,3	0,2	22,0	0,1
60	79,0	0,2	18,9	0,1
65	60,8	0,4	16,5	0,1
70	46,6	0,2	14,6	0,1
75	37,2	0,1	13,0	0,0
80	30,3	0,2	11,8	0,0
85	25,1	0,1	10,9	0,1
90	21,0	0,1	10,3	0,0

Ο ChCl:AA (1:2) παρουσιάζει χαμηλότερο ιξώδες και πυκνότητα από τον ChCl:Urea (1:2) στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών.

3.4.2 Εξαγωγή εμπειρικής γραμμικής συσχέτισης πυκνοτήτων των δύο βαθέων ευτηκτικών διαλυτών με τη θερμοκρασία

Παρατηρούμε πως η εξάρτηση της πυκνότητας με τη θερμοκρασία για τους δύο DESs είναι γραμμική. Επομένως, αρκεί μία ευθεία της μορφής $\rho = aT + b$ για να την περιγράψει.

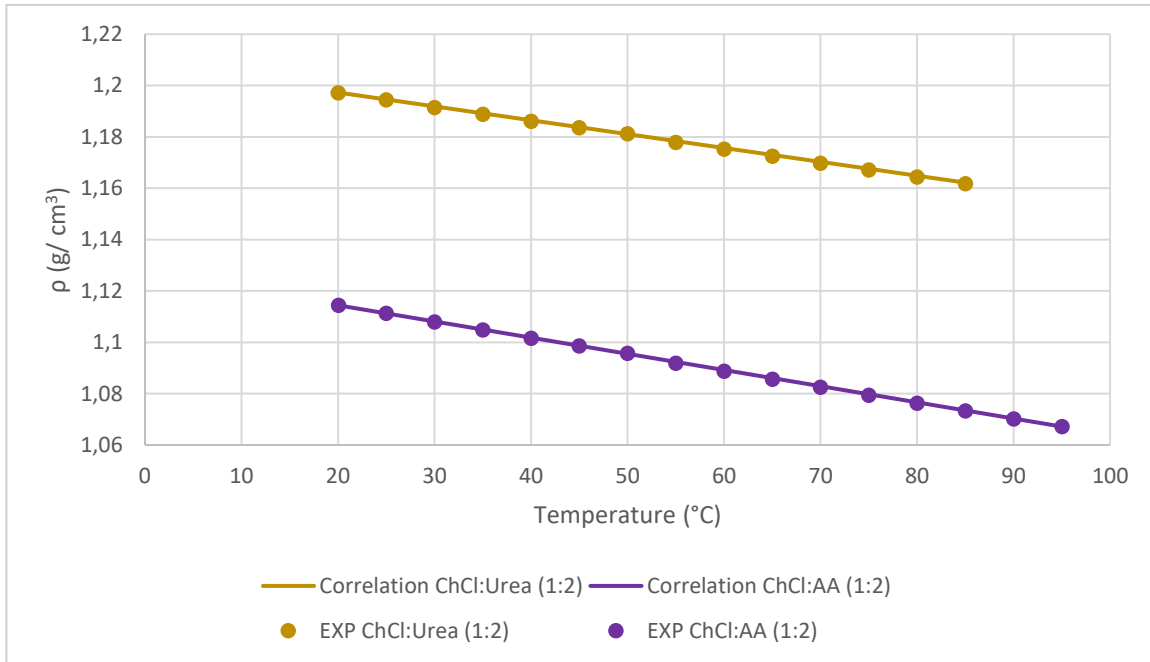
Οι τιμές των παραμέτρων υπολογίστηκαν για τον εκάστοτε DES και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7 μαζί με την επί τοις εκατό απόλυτη μέση σχετική απόκλιση (%AARD). Στο Διάγραμμα 3.22, απεικονίζονται γραφικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.7: Παράμετροι γραμμικού μοντέλου $\rho = aT + b$ για τους DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2). Σημειώνεται η απόλυτη μέση σχετική απόκλιση.

	ChCl:Urea (1:2)	ChCl:AA (1:2)
a (g/ C·cm ³)	-0,00054	-0,00063

b (g/ cm ³)	1,20809	1,12702
%AARD	0,03	0,02

$$* \%AARD = \frac{100}{n} \sum_1^n \left| 1 - \frac{\eta_{calc}}{\eta_{exp}} \right|$$



Διάγραμμα 3.23: Γραμμική συσχέτιση της πυκνότητας των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με τη θερμοκρασία. Με τελείες απεικονίζονται τα πειραματικά σημεία.

Η μοντελοποίηση κρίνεται αρκετά αποτελεσματική, με σφάλματα που κινούνται στο 0,03 και το 0,02% αντίστοιχα.

3.4.3 Εξαγωγή εμπειρικής συσχέτισης ιξωδών των δύο βαθέν ευτηκτικών διαλυτών με τη θερμοκρασία με το μοντέλο Vogel – Fulcher – Tammann

Το μοντέλο Vogel – Fulcher – Tammann (VFT) απορρέει από την εξίσωση του Arrhenius και είναι ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή του ιξώδους ιοντικών υγρών συναρτήσει της θερμοκρασίας. Γράφεται ως εξής:

$$\eta(T) = \eta_0 \cdot e^{\frac{B}{T-T_0}} \quad (2)$$

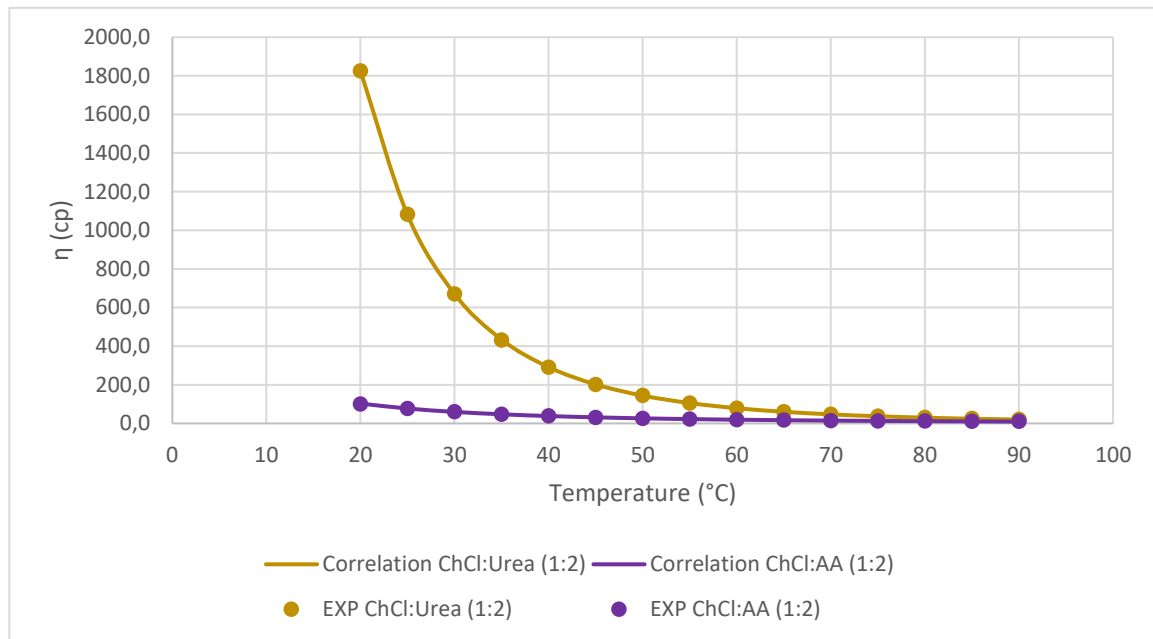
,όπου η το δυναμικό ιξώδες σε cP (mPa·s) και η₀, B και T₀ εμπειρικές σταθερές εξαρτώμενες από το ρευστό.

Οι τιμές των παραμέτρων υπολογίστηκαν για τον εκάστοτε DES και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8 μαζί με την επί τοις εκατό απόλυτη μέση σχετική απόκλιση (%AARD). Στο Διάγραμμα 3.23, απεικονίζονται γραφικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.8: Παράμετροι μοντέλου VFT για τους DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2). Σημειώνεται η απόλυτη μέση σχετική απόκλιση.

	ChCl:Urea (1:2)	ChCl:AA (1:2)
η_0 (cP)	0,0331	0,4243
B (K)	1080,7	499,12
T_0 (K)	194,16	202,22
%AARD*	1,0	1,5

$$* \%AARD = \frac{100}{n} \sum_1^n \left| 1 - \frac{\eta_{calc}}{\eta_{exp}} \right|$$



Διάγραμμα 3.24: Εμπειρική συσχέτιση με το μοντέλο VFT του ιξώδους των DESs ChCl:Urea (1:2) και ChCl:AA (1:2) με τη θερμοκρασία. Με τελείες απεικονίζονται τα πειραματικά σημεία.

Η μοντελοποίηση κρίνεται αρκετά αποτελεσματική, με σφάλματα που κινούνται στο 1,0 και το 1,5% αντίστοιχα.

Βιβλιογραφία

[1] Stamatopoulos, Konstantinos, Katsoyannos, Evangelos, Chatzilazarou, Arhontoula. 2014. Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic

Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction. *Antioxidants*, 3(2), 229–244.

[2] Teles, Aline Soares Cascaes, Chávez, Davy William Hidalgo, Gomes, Flávia dos Santos, Cabral, Lourdes Maria Corrêa, Tonon, Renata Valeriano. 2017. Effect of temperature on the degradation of bioactive compounds of Pinot Noir grape pomace during drying. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21.

[3] Haris Omar, S. 2010. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133–154.

[4] I. Chinou. 2017. Assessment report on *Olea europaea* L., folium., EMA/HMPC/359236/2016, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), European Medicines Agency, *Science Medicines Health*, 16(1), 4-6.

[5] Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., 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.

[6] Monteleone, J.I., Sperlinga, E., Siracusa, L., Spagna, G., Parafati, L., Todaro, A., Palmeri, R.. 2021. Water as a Solvent of Election for Obtaining Oleuropein-Rich Extracts from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *Agronomy*, 11, 465.

[7] Hakan Çetinkaya, Muhittin Kulak. 2016. Relationship between total phenolic, total flavonoid and oleuropein in different aged olive (*Olea europaea* L.) Cultivar leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(2), 81.

[8] Lins, P. G., Marina Piccoli Pugine, S., 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.

[9] Yateem, H., Afaneh, I., Al-Rimawi, F.. 2014. Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4(5).

[10] Cifá, Domenico, Skrt, Mihaela, Pittia, Paola, Di Mattia, Carla, Poklar Ulrih, Nataša. 2018. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 1128–1137.

[11] Ortega-Garcia, F., Blanco, S., Peinado, M. A., Peragon, J.. 2008. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*, 28(1), 45–54.

[12] Şahin, S., Kurtulbaş, E., & Bilgin, M. 2020. Special designed deep eutectic solvents for the recovery of high added-value products from olive leaf: a sustainable environment for bioactive materials. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1–8.

[13] Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. 2018. 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.

4 Συμπεράσματα & προτάσεις για το μέλλον

4.1 Συμπεράσματα

Μελετήθηκε πειραματικά η εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φύλλα ελιάς με κλασική υγρή εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE), με σκοπό να διαπιστωθεί αν η τελευταία είναι πιο αποτελεσματική, αλλά και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων εκχύλισης και συγκεκριμένα, της θερμοκρασίας (55 - 70 °C για κλασική εκχύλιση και 40 - 70 °C για MAE), της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη (1:30 - 1:10 κατά βάρος (κ.β.)), του χρόνου εκχύλισης (10 - 24 ώρες (h) για κλασική εκχύλιση και 5 - 30 λεπτά για MAE) και επιπλέον της ισχύος (500 - 750 W) για τη MAE, στην ποιότητα του παραγόμενου εκχυλίσματος, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση (Antioxidant Capacity ή AC), το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Total Phenolic Content ή TPC) και τη συγκέντρωση στις αντιοξειδωτικές ενώσεις ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη.

Στην κλασική εκχύλιση, μελετήθηκε η συμπεριφορά των συμβατικών διαλυτών αιθανόλη και νερό και των βαθέν ευτηκτικών διαλυτών (Deep Eutectic Solvents ή DESs) χλωριούχος χολίνη (choline chloride)/ ουρία 1:2 κατά mol (ChCl:Urea (1:2)) και χλωριούχος χολίνη/ οξικό οξύ (acetic acid) 1:2 κατά mol (ChCl:AA (1:2)) και μειγμάτων αυτών με νερό και αιθανόλη 30 και 20 % κατά βάρος (κ.β.) αντίστοιχα, με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι DESs είναι πιο αποτελεσματικοί. Στη MAE, μελετήθηκε η συμπεριφορά του συμβατικού διαλύτη αιθανόλη. Ακόμη, μετρήθηκαν δύο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs, η πυκνότητα και το ιξώδες, και εξάχθηκαν εμπειρικές συσχετίσεις συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Πιο συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η απόδοση της κλασικής εκχύλισης για τρία συστήματα διαλυτών: (α) αιθανόλη - νερό (70 - 30 % κ.β.), (β) ChCl:Urea (1:2) και (γ) ChCl:Urea (1:2) - αιθανόλη (80% - 20% κ.β.), για θερμοκρασία 55 °C, χρόνο εκχύλισης 24 h και αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β.. Η απόδοση κινήθηκε από το 33,8 έως το 36,8 %, με αποδοτικότερο σύστημα το (β).

Όλα τα εκχυλίσματα ήταν πλούσια σε ελαιοευρωπεΐνη και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές της βιβλιογραφίας. Υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε για όλους τους διαλύτες εκτός του νερού. Με χρήση του ChCl:AA (1:2), λήφθηκαν εκχυλίσματα πλουσιότερα σε υδροξυτυροσόλη σε σχέση με τους ChCl:Urea (1:2) και αιθανόλη. Με αύξηση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στην αιθανόλη από 1:20 (0,05) σε 1:10 (0,1), λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα, καθώς επίσης και με αύξηση της θερμοκρασίας και ανάμειξη με νερό στον ChCl:Urea (1:2). Συνολικά, υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε σε έξι

(6) και τυροσόλη σε ένα (1) από τα είκοσι τέσσερα (24) εκχυλίσματα που λήφθηκαν με κλασική εκχύλιση.

Τα εκχυλίσματα με καλύτερη AC παρουσιάζουν και περισσότερο συνολικά TPC. Ασφαλές συμπέρασμα δεν μπορεί να προκύψει από τις διακυμάνσεις της ελαιοευρωπεΐνης όσον αφορά την AC. Η μη σύνδεση με την AC ενδεχομένως να οφείλεται στην παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στα φύλλα της ελιάς, οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, καθώς και μη αντιοξειδωτικών παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης που ίσως να ανιχνεύονται ως ελαιοευρωπεΐνη.

Όσον αφορά την επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων της κλασικής εκχύλισης στην AC, το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με τους διαλύτες αιθανόλη, CHCl_3 :Urea (1:2) και CHCl_3 :AA (1:2), παρατηρήθηκε ότι, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης στο εύρος 10 – 24 h έχει θετική επίδραση μόνο στην περίπτωση της αιθανόλης. Με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 - 70 °C, λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την AC και το TPC. Όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης, με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 55 – 70 °C, λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα μόνο για τους αιθανόλη και CHCl_3 :Urea (1:2). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της διαλυτότητας της ελαιοευρωπεΐνης και των λοιπών συστατικών των φύλλων και των συντελεστών διάχυσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Ακόμη, η μείωση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:30 – 1:10 κ.β. επέδρασε θετικά μόνο για τους αιθανόλη και CHCl_3 :Urea (1:2). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι μικρότερη αναλογία βιομάζας/ διαλύτη παρέχει μεγαλύτερη κινητήρια δύναμη για την εκχύλιση, σύμφωνα με τους νόμους που διέπουν το φαινόμενο της διάχυσης. Η ανάμειξη των αιθανόλη, CHCl_3 :Urea (1:2) και CHCl_3 :AA (1:2) με νερό 30% κ.β. είχε αρνητική επίδραση όσον αφορά την AC και το TPC. Όσον αφορά την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης, η ανάμειξη με νερό 30% κ.β. είχε θετική επίδραση μόνο στην περίπτωση της αιθανόλης, ενώ με ανάμειξη των DESs με αιθανόλη 20% κ.β., λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα και για τους δύο.

Στη MAE, με διαλύτη την αιθανόλη, λήφθηκαν καλύτερα αποτελέσματα με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 40 - 70 °C, αύξηση της αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη στο εύρος 1:30 – 1:10 κ.β., μείωση του χρόνου εκχύλισης στο εύρος 5 – 30 λεπτά, και μείωση της ισχύος στο εύρος 500 – 750 W, τόσο όσον αφορά την AC, όσο και το TPC και την ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης.

Όσον αφορά την AC και το TPC, ο CHCl_3 :AA (1:2) αποδεικνύεται με μικρή διαφορά καλύτερος διαλύτης από τον CHCl_3 :Urea (1:2), ο οποίος ακολουθείται από την αιθανόλη. Η διαφορά διευρύνεται σημαντικά με την προσθήκη αιθανόλης. Η αιθανόλη συνολικά

είναι πιο αποτελεσματική των DESs στην ανάκτηση ελαιοευρωπεΐνης. Στις βέλτιστες εξεταζόμενες συνθήκες (ανάμειξη 20 % κ.β. με αιθανόλη, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β., θερμοκρασία 70 °C και χρόνο εκχύλισης 24 h), με ChCl:AA (1:2), λήφθηκε εκχύλισμα με +66 % AC, +96 % TPC και +40 % συγκέντρωση σε ελαιοευρωπεΐνη σε σχέση με την αιθανόλη, γεγονός που τον καθιστά ανταγωνιστική επιλογή.

Η MAE κρίνεται πιο αποτελεσματική από την κλασική εκχύλιση, καθώς σε χρόνο 5 λεπτών, λήφθηκε εκχύλισμα που έφτασε σε ποσοστό 69 % τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης για 24 h όσον αφορά την AC και σε ποσοστό 51 % όσον αφορά το TPC, σε αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και θερμοκρασία 55 °C, και σε χρόνο 30 λεπτών, λήφθηκε εκχύλισμα που ξεπέρασε σε ποσοστό +23 % τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης για 24 h όσον αφορά την AC και σε ποσοστό +5 % όσον αφορά το TPC σε αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:10 κ.β. και θερμοκρασία 70 °C. Αν συνδυαστούν οι βέλτιστες παράμετροι εκχύλισης της MAE με τον βέλτιστο DES, δηλαδή τον ChCl:AA (1:2), μελλοντικά μπορούν να προκύψουν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

Τέλος, μετρήθηκαν δύο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs, η πυκνότητα και το ιξώδες, και εξάχθηκαν με ικανοποιητική ακρίβεια εμπειρικές συσχετίσεις συναρτήσεως της θερμοκρασίας, βάσει του γραμμικού μοντέλου και του μοντέλου Vogel – Fulcher – Tammann για την πυκνότητα και το ιξώδες αντίστοιχα. Ο ChCl:AA (1:2) παρουσιάζει χαμηλότερο ιξώδες και πυκνότητα από τον ChCl:Urea (1:2). Αυτή του η ιδιότητα ίσως είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματικότητά του έναντι του ChCl:Urea (1:2).

4.2 Προτάσεις για το μέλλον

Το εκχύλισμα φύλλων ελιάς έχει εδραιωθεί πλέον στην αγορά φαρμακευτικών προϊόντων και τροφίμων και η έρευνα έχει στραφεί σε νέους, πράσινους διαλύτες και τεχνικές που μπορούν να το βελτιώσουν ποιοτικά. Η πρώτη ύλη είναι άφθονη, ιδίως στον Ελλαδικό και γενικότερα τον Μεσογειακό χώρο, ανεκμετάλλευτη και, κυρίως, μη βρώσιμη. Ήδη μελετώνται σε παγκόσμια κλίμακα πολλά συστήματα DESs σε συνδυασμό με πληθώρα σύγχρονων τεχνικών και λαμβάνονται πολύ υποσχόμενα αποτελέσματα.

Ο DES ChCl:AA (1:2) είναι φθηνός στην παρασκευή του σε σχέση με άλλους DES, παρουσιάζει χαμηλό ιξώδες και πυκνότητα και με αυτόν, λαμβάνονται εκχυλίσματα με εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση. Η περαιτέρω μελέτη του υπόσχεται ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, είναι χρήσιμο να εξεταστούν ανάμειξη σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά βάρος με αιθανόλη και χρόνος μικρότερος των 10 h. Ακόμη, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν πειράματα με τον συγκεκριμένο διαλύτη σε μικροκύματα, καθώς και με άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση με υπερήχους.

Όμοια, για τον DES CHCl:Urea (1:2), είναι χρήσιμο να εξεταστούν ανάμειξη σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά βάρος με αιθανόλη και χρόνος μικρότερος των 10 h, αλλά και άλλες τεχνικές εκχύλισης, όπως η MAE και η εκχύλιση με υπερήχους. Χρήσιμη παραμένει επίσης και η μελέτη άλλων DESs, με ουσίες που αναδεικνύονται στην παγκόσμια βιβλιογραφία, όπως η γλυκερόλη, η αιθυλενογλυκόλη, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ.

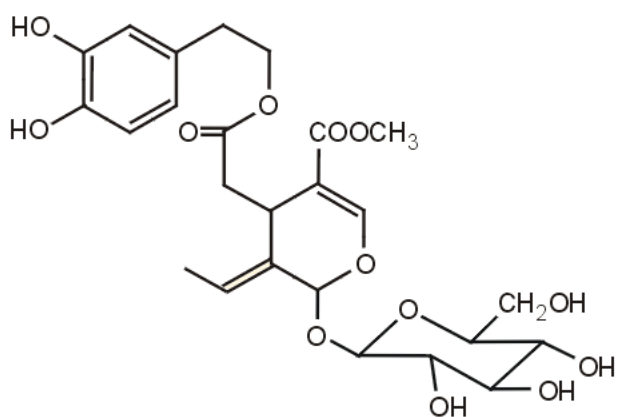
Όσον αφορά την κλασική εκχύλιση, είναι χρήσιμο να μελετηθεί και η παράμετρος του ρυθμού ανάδευσης, ενώ για την MAE, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή μεγάλου εύρους πειραμάτων για τη μελέτη της συμπεριφοράς τόσο των συμβατικών διαλυτών όσο και των DESs σε διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας, ισχύος, αναλογίας βιομάζας/ διαλύτη, χρόνου και ρυθμού ανάδευσης. Το ίδιο είναι απαραίτητο να γίνει και για τις λοιπές πράσινες τεχνικές. Μέσω μίας εκτενής μελέτης, θα βελτιστοποιηθεί η κάθε τεχνική και θα κατανοηθεί καλύτερα η συμπεριφορά των DESs όσον αφορά την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών.

Πρόκληση αποτελεί και η ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, κυρίως αυτών που παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την ελαιοευρωπεΐνη (π.χ. ρουτίνη, λουτεολίνη, κατεχίνη), καθώς και η βελτιστοποίηση της μεθόδου, ώστε να μην ανιχνεύονται τυχόν μη αντιοξειδωτικά παράγωγα ελαιοευρωπεΐνης ως ελαιοευρωπεΐνη. Ακόμη, θα ήταν χρήσιμο να μετράται και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή μαζί με το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά, καθώς τα πρώτα παρουσιάζουν πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

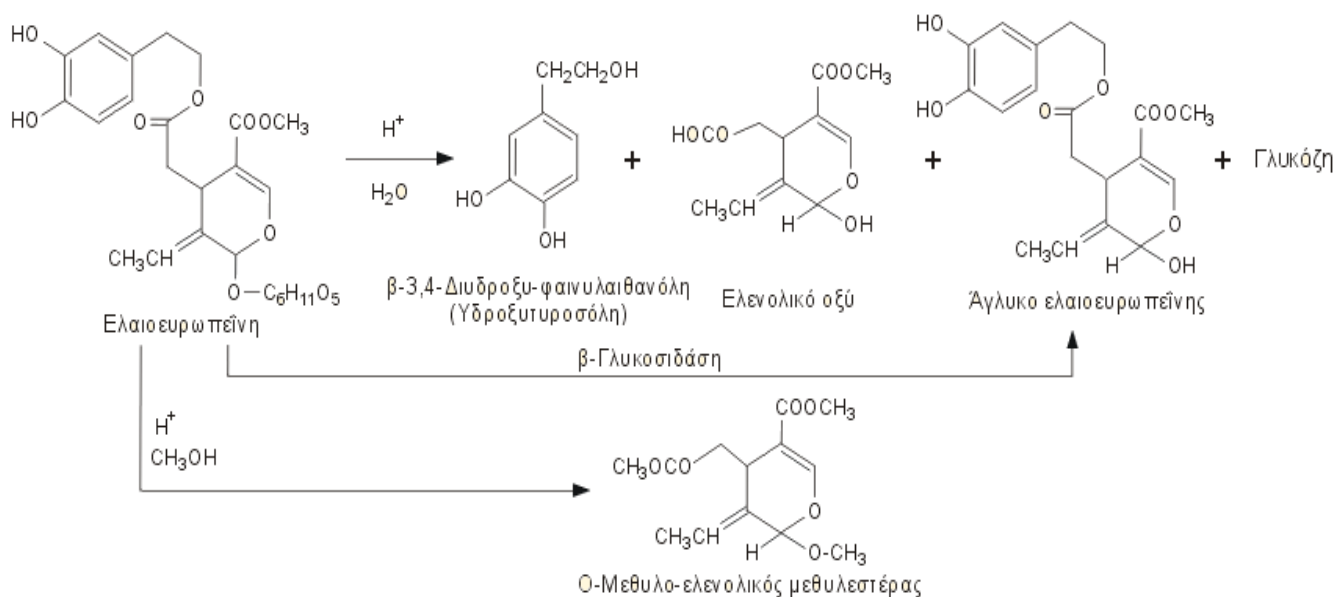
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η περαιτέρω ανάλυση των εκχυλισμάτων ως προς την αντιμικροβιακή και αντιϊκή δράση, τη δράση κατά των φλεγμονών και των μυκητιάσεων και η διεξαγωγή κλινικών μελετών. Τέλος, καθώς απώτερος στόχος είναι η εφαρμογή των ευρημάτων στη βιομηχανία, είναι κρίσιμο να πραγματοποιηθούν πειράματα σε πιλοτική κλίμακα, ώστε να επιλυθούν τα όποια τεχνικά και πρακτικά προβλήματα προκύψουν, αλλά και να αξιολογηθούν οικονομικά οι προτεινόμενες νέες τεχνολογίες.

Παράρτημα Α: Χημικοί τύποι συστατικών φύλλων ελιάς & αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της ελαιοευρωπεΐνης

Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells, σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης, επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της, ο οποίος απεικονίζεται στην Εικόνα Α.1. Οι συγγραφείς παρέχουν επίσης τις υδρολυτικές αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της, οι οποίες παρουσιάζονται Εικόνα Α.2.



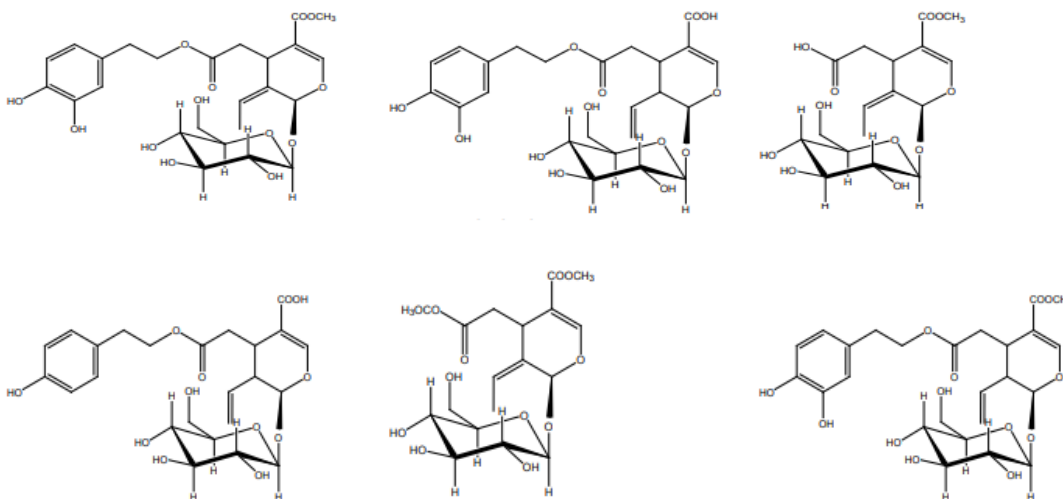
Εικόνα Α.1: Χημικός τύπος ελαιοευρωπεΐνης (oleuropein).



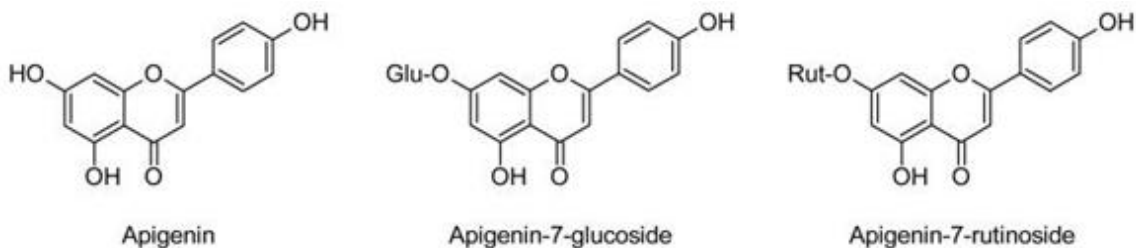
Εικόνα Α.2: Αντιδράσεις που επιβεβαιώνουν τη δομή της ελαιοευρωπεΐνης.

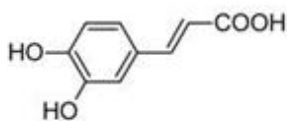
Η λιγκτροσίδη διαφέρει από την ελαιοευρωπεΐνη στην παρουσία ενός υπολείμματος τυροσόλης αντί της διυδροξυ-φαινυλ-αιθυλικής αλκοόλης. Ο διμεθυλεστέρας της ολεοσίδης, γνωστός επίσης ως γλυκοσίδη του μεθυλεστέρα του

ελεανολικού οξέος, περιέχει δύο όξινες λειτουργίες της ελαιοευρωπεΐνης, εστεροποιημένες με το υπόλειμμα μεθανόλης. Η ελαιοροσίδη είναι ένα ισομερές της ελαιοευρωπεΐνης, που διαφέρει από εκείνη στην εξωκυκλική θέση διπλού δεσμού, και η δομή της προσδιορίστηκε ως 3,4-διυδροξυφαινυλεστέρα σεκοξυλογανίνης. Τα τριτερπένια έχουν επίσης απομονωθεί, όπως το μασλινικό και ολεανολικό οξύ και η β-αμυρίνη. Η εμφάνιση του μασλινικού οξέος σε φρέσκα φύλλα της ο. ευγοραεα επιβεβαιώνει ότι είναι ένας πραγματικός μεταβολίτης του φυτού. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι το μασλινικό οξύ παράγεται κατά τη γήρανση των φλοιών της ελιάς, πιθανώς μέσω μικροβιακής α-υδροξυλίωσης του ελεανολικού οξέος. Επίσης, έχουν προσδιοριστεί αρκετά αλκαλοειδή στα φύλλα της ελιάς, όπως παράγωγα κινγκονίνης και κινγκονιδίνης^[7]. Οι σχετικές δομές της ελαιοευρωπεΐνης, της διμεθυλοελαιοευρωπεΐνης, του μεθυλεστέρα ελαιοσίδης, της λιγκστροσίδης, του διμεθυλεστέρα της ολεοσίδης και της ελαιοροσίδης απεικονίζονται στην Εικόνα Α.3. Αναλυτικά, οι χημικοί τύποι των ουσιών που περιέχονται στα φύλλα καθώς και σε όλο το δέντρο της ελιάς απεικονίζονται στην Εικόνα Α.4.

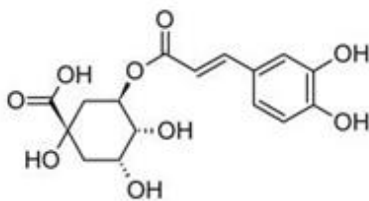


Εικόνα Α.3: Σχετικές δομές συστατικών φύλλων ελιάς. Από αριστερά προς τα δεξιά: χημικός τύπος της ελαιοευρωπεΐνης, της διμεθυλο-ελαιοευρωπεΐνης, του μεθυλεστέρα ελαιοσίδης, της λιγκστροσίδης, του διμεθυλεστέρα της ολεοσίδης και της ελαιοροσίδης.

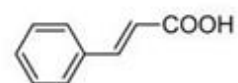




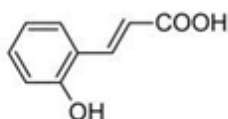
Caffeic acid



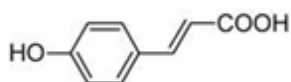
5-Caffeoylquinic acid



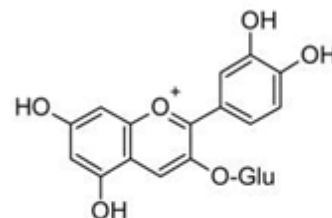
Cinnamic acid



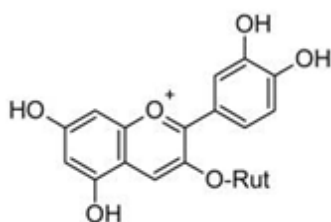
o-Coumaric acid



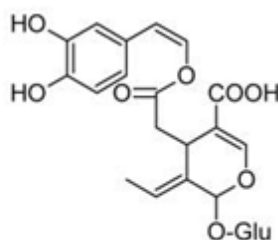
p-Coumaric acid



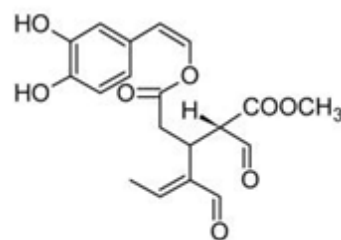
Cyanidin-3-glucoside



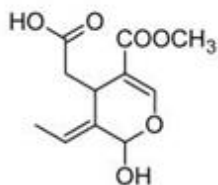
Cyanidin-3-rutinoside



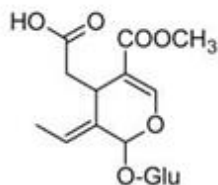
Demethylleuropein



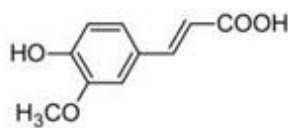
3,4-DHPEA-EDA



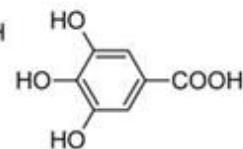
Elenoic Acid



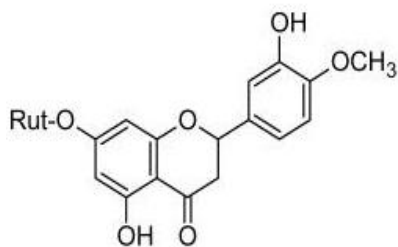
Elenoic acid glucoside



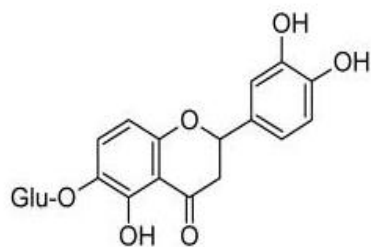
Ferulic acid



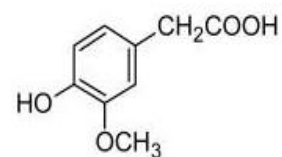
Gallic acid



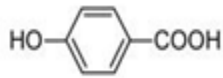
Hesperidin



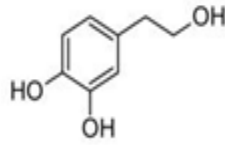
Homoorientin



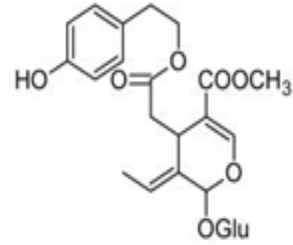
Homovanillic acid



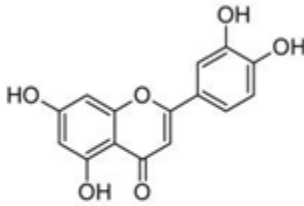
4-Hydroxybenzoic acid



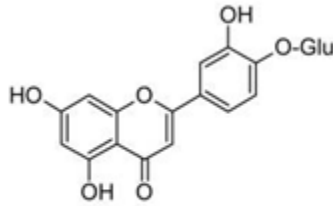
Hydroxytyrosol



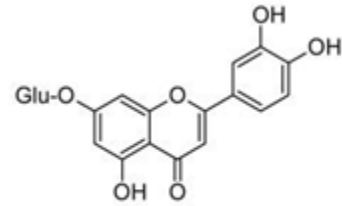
Ligstroside



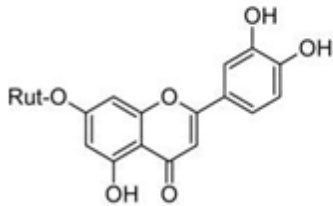
Luteolin



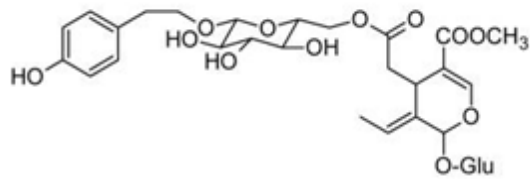
Luteolin-4-glucoside



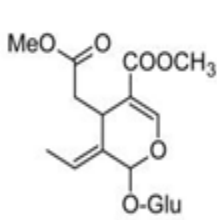
Luteolin-7-glucoside



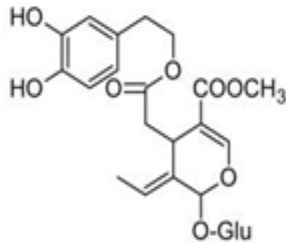
Luteolin-7-rutinoside



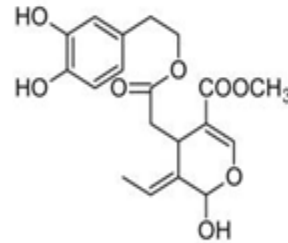
Nüzhenide



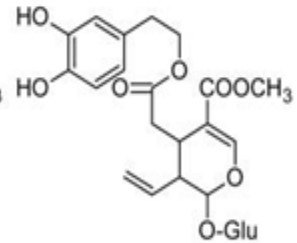
Oleoside



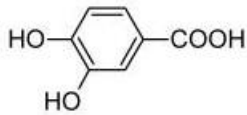
Oleuropein



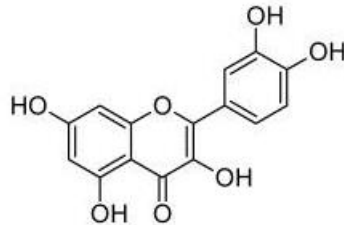
Oleuropein aglycon



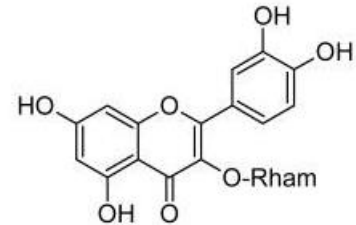
Oleuroside



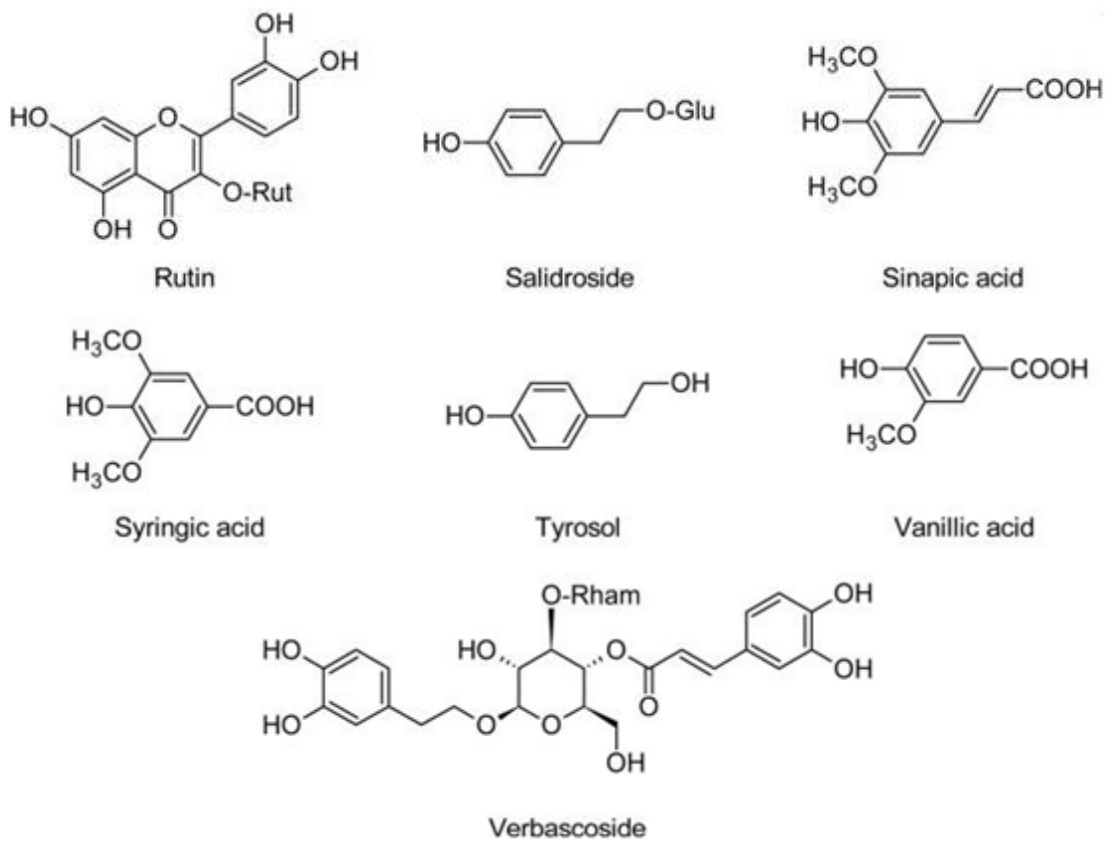
Protocatechuic acid



Quercetin



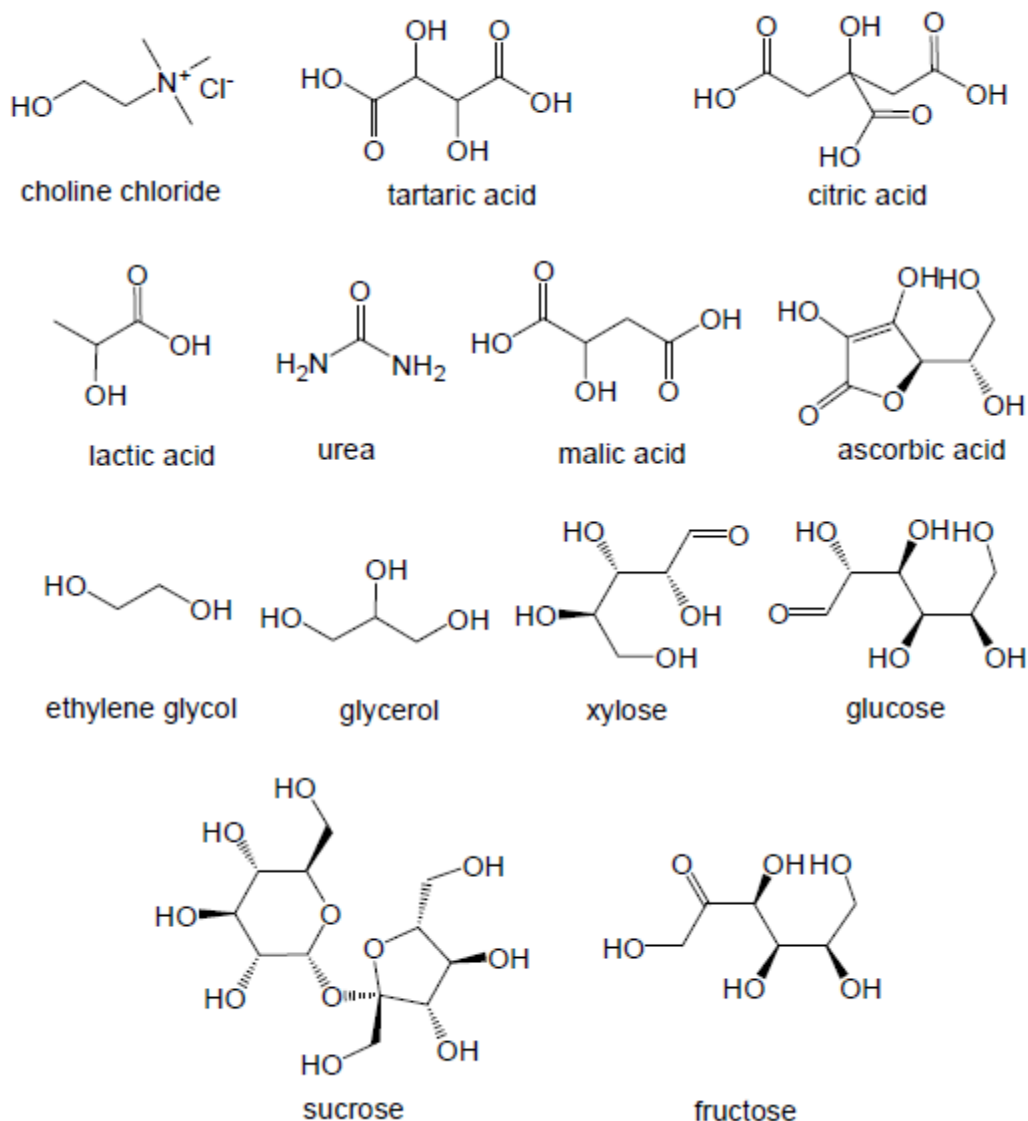
Quercitrin



Εικόνα Α.4: Αναλυτικά οι χημικοί τύποι των ουσιών που περιέχονται στα φύλλα καθώς και σε όλο το δέντρο της ελιάς σε αλφαβητική σειρά.

Παράρτημα Β: Χημικοί τύποι μερικών δοτών και δεκτών δεσμού υδρογόνου για σύνθεση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, σημεία τήξης και ιξώδη

Οι χημικοί τύποι μερικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση Φυσικών Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών απεικονίζονται στην Εικόνα Β.1.



Εικόνα Β.1: Χημικοί τύποι μερικών ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών.

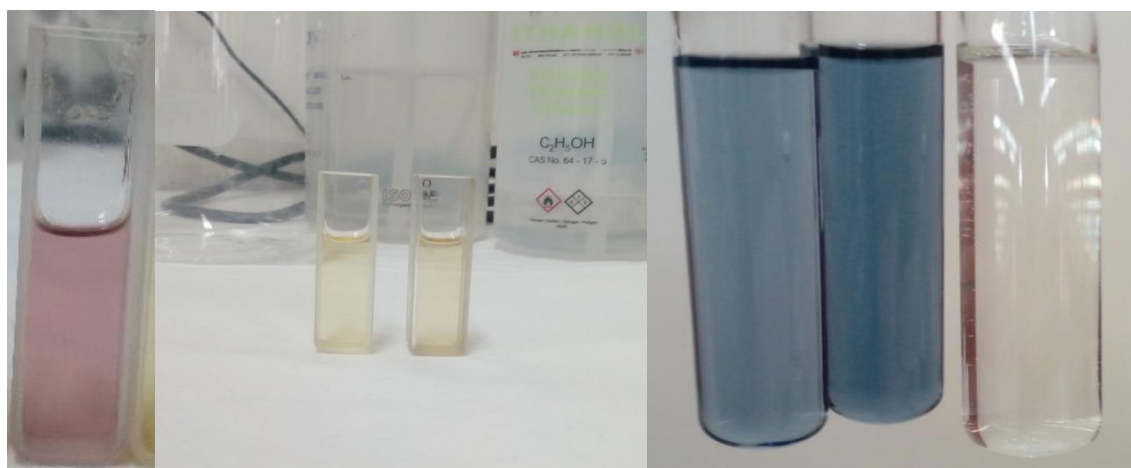
Στον Πίνακα Β.1, συγκεντρώνονται οι συνδυασμοί που έχουν σχετικά καλή απόδοση σε ελαιοευρωπείνη, τα σημεία τήξης του δέκτη δεσμού υδρογόνου, του δότη και του βαθύ ευτηκτικού μείγματος και το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας Β.1: Συνδυασμοί βαθέων ευτηκτικών διαλυτών με τις καλύτερες αποδόσεις σε ελαιουρωπεΐνη κατά ελαττούμενη σειρά, τα σημεία τήξης του δέκτη δεσμού υδρογόνου, του δότη και του βαθύ ευτηκτικού μείγματος και το ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου.

HBA - HBD	Γραμμομοριακή Αναλογία	Ποσοστό νερού (% w/w)	Σημείο τήξης HBA (°C)	Σημείο τήξης HBD (°C)	Σημείο τήξης DES (°C)	Ιξώδες (cp)
Κιτρικό οξύ - Γαλακτικό οξύ	1:4	48,9	153	16.8	-	-
ChCl - Αιθυλενογλυκόλη	1:2	25	302	-13	-66	<26,5
Κιτρικό οξύ - Γαλακτικό οξύ	1:4	0	153	16.8	-	-
ChCl - Αιθυλενογλυκόλη	1:2	43,3	302	-13	-66	<26,5
L - προλίνη - Γαλακτικό οξύ	1:8	0	205	16.8	-	-
Κιτρικό οξύ - Αιθυλενογλυκόλη	1:4	0	153	-13	-	-
ChCl - 1,2- Προπανοδιόλη	1:1	25	302	-59	-	37,1
ChCl - Ουρία	1:2	25	302	133	12	113,8
L - προλίνη - Αιθυλενογλυκόλη	1:4	0	205	-13	-	-
Γλυκερόλη - D-σορβιτόλη	8:1	0	18.6	95	-	-
Κιτρικό οξύ - Γλυκερόλη	1:4	0	153	18.6	-	-
ChCl - Γαλακτικό οξύ	1:2	25	302	18	-63,99	14
Μεθυλιμιδαζόλη - Γλυκερόλη	1:4	0	-6	18.6	-	-
ChCl - 1,4- Βουτανοδιόλη	1:6	25	302	16	-32	<47
Γλυκερόλη - Ουρία	2:1	0	18.6	133	-	-
L – προλίνη - Γλυκερόλη	1:4	0	205	18.6	-	-
ChCl - Ξυλιτόλη	2:1	25	302	94-97	-	-

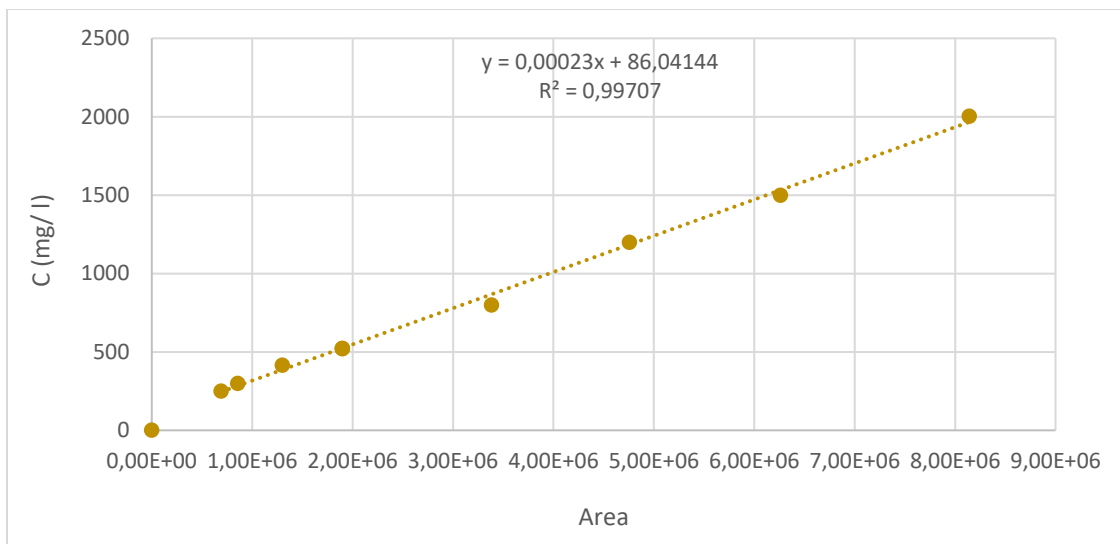
Παράρτημα Γ: Χρωματισμός των δειγμάτων κατά την ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου, τυπικές καμπύλες αναφοράς υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης & τυπικά παραδείγματα χρωματογραφημάτων

Στην Εικόνα Γ.1, φαίνεται ο αποχρωματισμός των εκχυλισμάτων με $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2) και με ανάμειξη $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2) με νερό 30% κ.β. για θερμοκρασία 55°C, αναλογία βιομάζας/διαλύτη (Mass Ratio) 1:30 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h μετά το πέρας της ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς και ο μπλε χρωματισμός τους μετά την παραμονή σε υδατόλουτρο για την ανάλυση ολικού φαινολικού περιεχομένου.

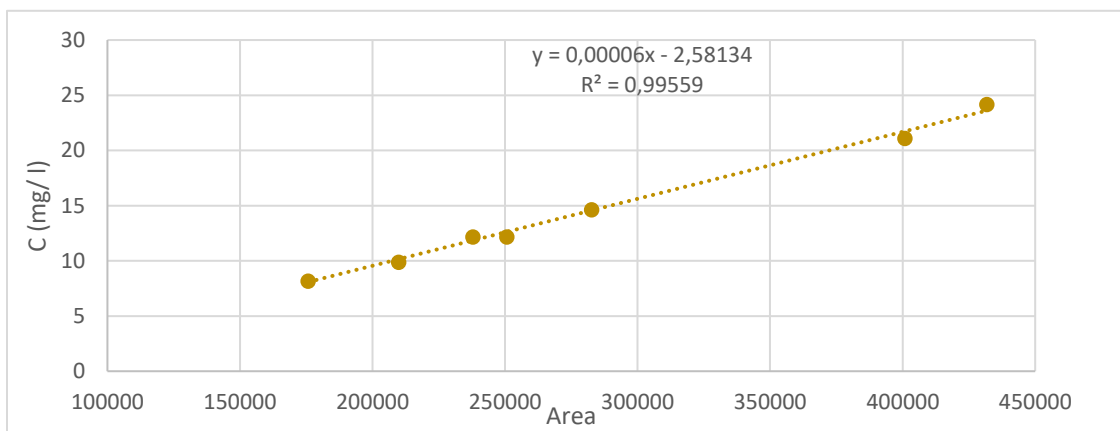


Εικόνα Γ.1: **Αριστερά:** Μωβ χρώμα διαλύματος DPPH^* . **Κέντρο:** φαίνεται ο αποχρωματισμός από το μωβ χρώμα του διαλύματος DPPH^* σε κίτρινο των εκχυλισμάτων με $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2) (αριστερά) και με ανάμειξη $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2) με νερό 30% κ.β. (δεξιά), $T = 55^\circ\text{C}$, Mass Ratio 1:30, $t = 24\text{ h}$, σε κυψελίδες, μετά το πέρας της ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης. Το πιο έντονα αποχρωματισμένο δείγμα (αριστερά) αντιστοιχεί σε υψηλότερα ισοδύναμα Trolox. **Δεξιά:** φαίνεται ο μπλε χρωματισμός από αριστερά προς τα δεξιά: των εκχυλισμάτων με ανάμειξη $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2) με νερό 30% κ.β. και με $\text{ChCl}:\text{Urea}$ (1:2), $T = 55^\circ\text{C}$, Mass Ratio 1:30, $t = 24\text{ h}$ και του τυφλού δείγματος μετά την παραμονή σε υδατόλουτρο, για την ανάλυση ολικού φαινολικού περιεχομένου. Το πιο έντονα χρωματισμένο δείγμα (μεσαίο) αντιστοιχεί σε υψηλότερα ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

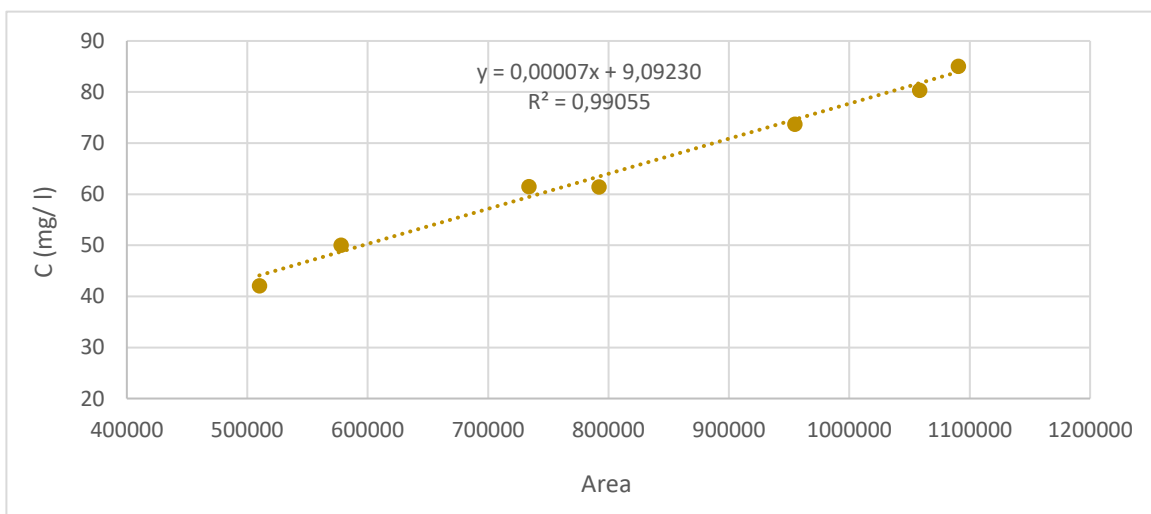
Στα Διαγράμματα Γ.1, Γ.2 και Γ.3, παρουσιάζονται τυπικές καμπύλες αναφοράς για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις ελαιοευρωπείνη, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη αντίστοιχα.



Διάγραμμα Γ.1: Τυπική καμπύλη αναφοράς ελαιοευρωπεΐνης.

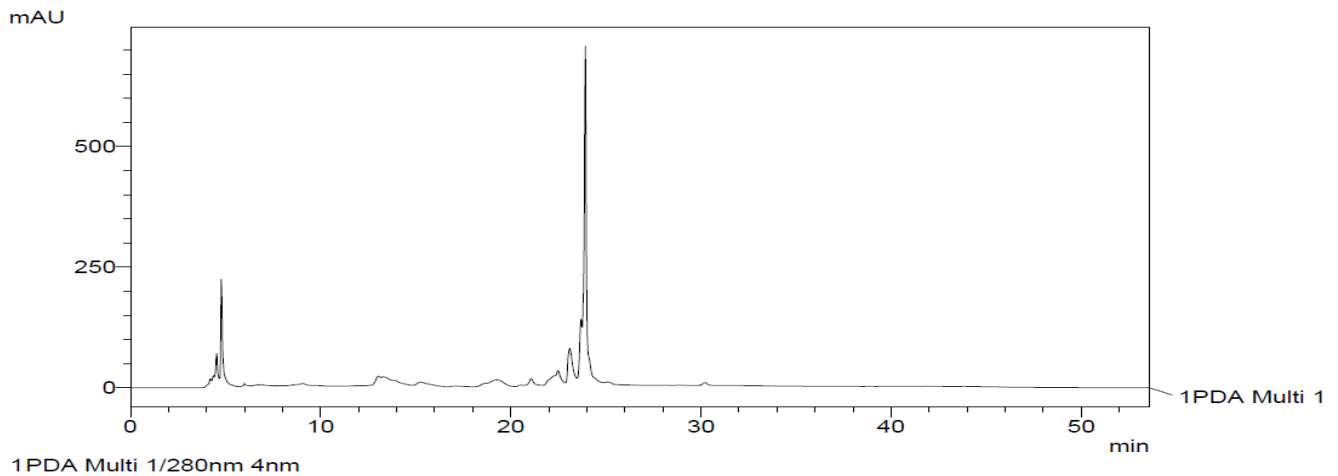


Διάγραμμα Γ.1: Τυπική καμπύλη αναφοράς υδροxyτυροσόλης.

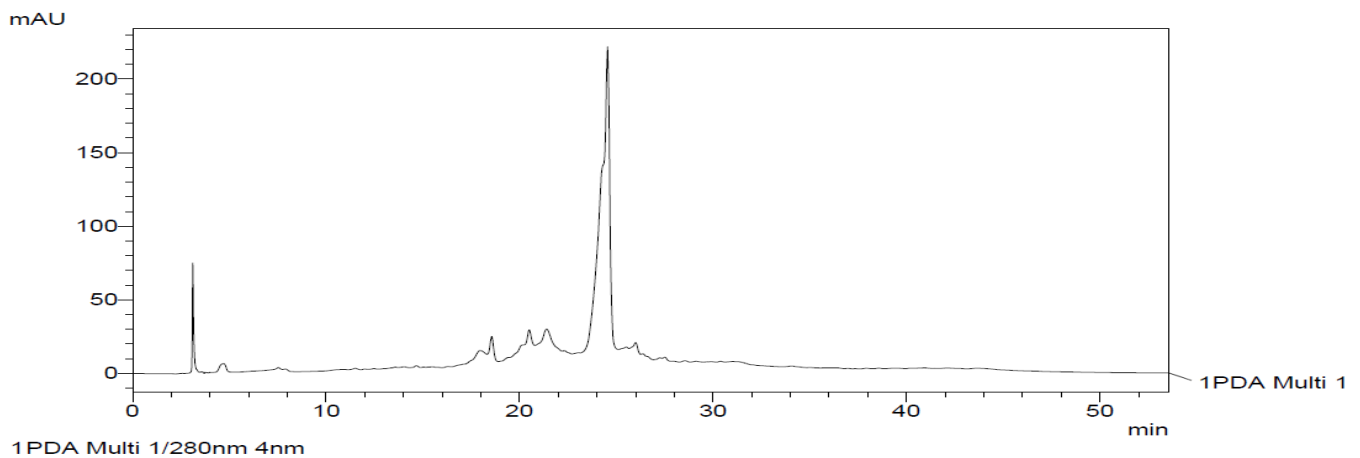


Διάγραμμα Γ.3: Τυπική καμπύλη αναφοράς τυροσόλης.

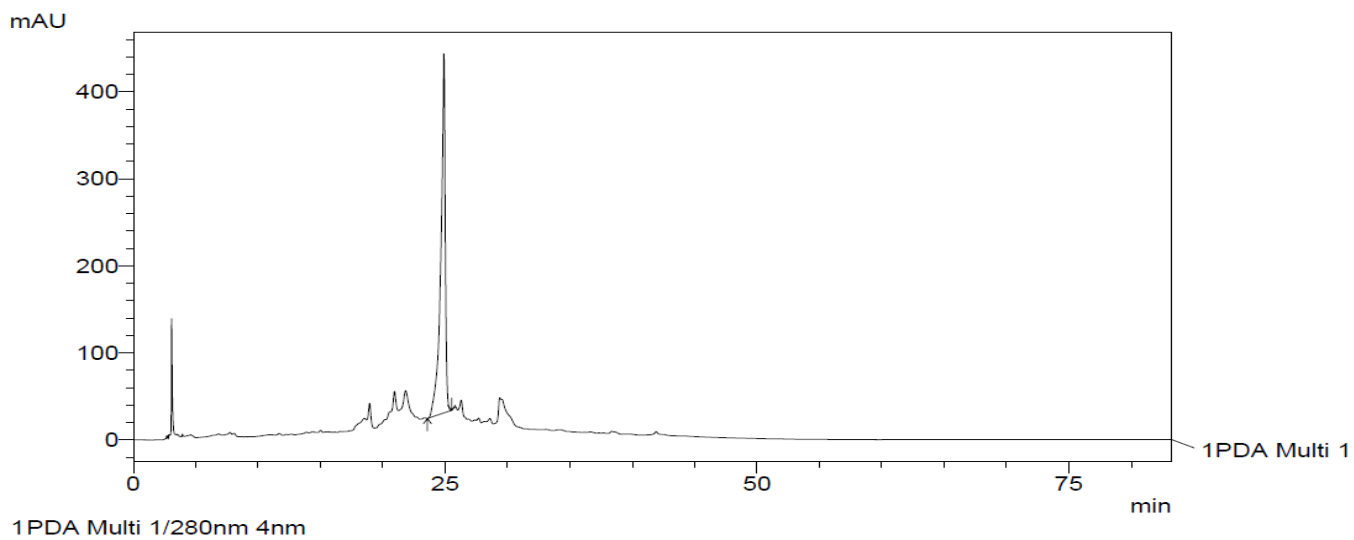
Στις Εικόνες Γ.2, Γ.3 και Γ.4, παρουσιάζονται τρία τυπικά παραδείγματα χρωματογραφημάτων για διαλύτη $\text{CHCl}_3:\text{Urea}$ (1:2), θερμοκρασία $55\text{ }^\circ\text{C}$, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:30 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h, για διαλύτη $\text{CHCl}_3:\text{AA}$ (1:2), θερμοκρασία $55\text{ }^\circ\text{C}$, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη κ.β. 1:30 και χρόνο εκχύλισης 24 h και για διαλύτη $\text{CHCl}_3:\text{AA}$ (1:2) – αιθανόλη (80 – 20 % κ.β.), θερμοκρασία $55\text{ }^\circ\text{C}$, αναλογία βιομάζας/ διαλύτη 1:20 κ.β. και χρόνο εκχύλισης 24 h αντίστοιχα. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά, η υδροξυτυροσόλη σε χρόνο 7,9 λεπτά και η τυροσόλη σε χρόνο 11,5 λεπτά. Η καμπύλη που εμφανίζεται σε όλα τα γραφήματα στο $3^\circ - 5^\circ$ λεπτό δεν έχει ταυτοποιηθεί.



Εικόνα Γ.2: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με $\text{CHCl}_3:\text{Urea}$ (1:2), $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, Mass Ratio 1:30, $t = 24\text{ h}$. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά.



Εικόνα Γ.3: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με $\text{CHCl}_3:\text{AA}$ (1:2), $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$, Mass Ratio 1:30, $t = 24\text{ h}$. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά.



Εικόνα Γ.4: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος με $ChCl:AA$ (1:2) – Ethanol (80 – 20 %), $T = 55$ °C, Mass Ratio 1:30, $t = 24$ h. Η ελαιοευρωπεΐνη εμφανίζεται σε χρόνο 24,7 λεπτά. Απεικονίζεται με ευθεία γραμμή το διάστημα ολοκλήρωσης για υπολογισμό της συγκέντρωσης ελαιοευρωπεΐνης.