



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ & ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Βελτιστοποίηση Μεθόδων Εκχύλισης για την ανάκτηση  
βιοδραστικών ουσιών από φύκος *Ulva lactuca* και τη  
μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη χρήση  
πράσινων διαλυτών»**

Μαρτίνος Σαμουήλ

Επιβλέπων Καθηγητής: Επαμεινώνδας Βουτσάς, Καθηγητής

Αθήνα, 2021

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract.....	8
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> : Μακροφύκος <i>U. lactuca</i> .....	10
1.1 Βιοδραστικές ουσίες του μακρόφυκους <i>U. lactuca</i> .....	11
1.1.1 Καροτενοειδή.....	12
1.2.2 Φαινολικές ενώσεις.....	14
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> : Τεχνικές εκχύλισης για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από το μακροφύκος <i>U. lactuca</i> .....	17
2.1 Κλασική Εκχύλιση Στερεού-Υγρού.....	18
2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE).....	19
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> : Πράσινοι διαλύτες.....	21
3.1 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες- DES (deep eutectic solvents).....	22
3.1.1 Μέθοδοι παρασκευής DES.....	25
3.1.2 Πλεονεκτήματα των DES.....	25
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> : Αντιοξειδωτική δράση.....	28
4.1 Φυσικά Αντιοξειδωτικά.....	28
4.2 Αντιοξειδωτική δράση του φύκους <i>U. lactuca</i> .....	29
4.3 Αντιοξειδωτική δράση με τη ΜΕΘΟΔΟ DPPH.....	30
B. Πειραματικό Μέρος.....	31
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> : Κλασική εκχύλιση <i>U. lactuca</i> .....	31
I. Σκοπός.....	31
II. Όργανα και αντιδραστήρια.....	31
5.1 Πειραματική Διαδικασία.....	33
5.2 Σύγκριση διαλυτών για κλασική εκχύλιση.....	33
5.2.1 Συγκέντρωση χλωροφύλλης A, B, Γ.....	33
5.2.2 Συγκεντρώσεις καροτενοειδών.....	34
5.2.3 Αντιοξειδωτική δράση.....	35
5.2.4 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών TPC για κάθε διαλύτη.....	35
5.2.5 Απόδοση εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη.....	36
5.3 Πειραματικά Αποτελέσματα κλασική εκχύλισης με αιθανόλη-νερό.....	37

5.3.1 Σύγκριση χρόνου εκχύλισης .....	38
5.3.2 Βιοδραστικές ουσίες συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης .....	38
5.3.3 Αντιοξειδωτική δράση συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης .....	40
5.3.4 Ολικά Φαινολικά (TPC) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης.....	40
5.3.5 Συζήτηση.....	41
5.4 Σύγκριση αναλογίας βιομάζας/διαλύτη (w/w) .....	42
5.4.1 Βιοδραστικές ουσίες .....	43
5.4.2 Αντιοξειδωτική δράση.....	44
5.4.3 Ολικά Φαινολικά (TPC) για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη.....	45
5.4.4 Συζήτηση.....	46
5.5 Σύγκριση Πράσινων διαλυτών DES .....	46
I. Σκοπός.....	46
5.5.1 Πειραματική Διαδικασία .....	46
5.5.2 Πειραματικά Αποτελέσματα-Σύγκριση διαλυτών DES.....	47
5.5.3 Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης για κάθε εκχύλιση .....	47
5.5.4 Συγκεντρώσεις ολικών καροτενοειδών για κάθε εκχύλιση με DES.....	48
5.5.5 Αντιοξειδωτική δράση για κάθε εκχύλιση με DES .....	49
5.5.6 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών (TPC) για κάθε εκχύλιση με DES .....	50
5.5.7 Συζήτηση.....	51
Κεφάλαιο 6 <sup>ο</sup> : Εκχύλιση <i>U. lactuca</i> υποβοηθούμενη με μικροκύματα (microwave assisted extraction - MAE) .....	53
I. Σκοπός .....	53
II. Όργανα και αντιδραστήρια .....	53
6.1 Πειραματική Διαδικασία.....	55
6.1.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (microwave assisted extraction - MAE).....	55
6.1.2 Προσδιορισμός βιοδραστικών ενώσεων .....	56
6.1.3 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών, TPC .....	56
6.1.4 Προσδιορισμός απόδοσης της εκχύλισης .....	57
6.1.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH .....	57
Πειραματικά Αποτελέσματα .....	59
6.2 Αντιοξειδωτική δράση (IC50).....	60
6.2.1 Σε σχέση με το χρόνο εκχύλιση .....	60
6.2.2 Σε σχέση με τη θερμοκρασία εκχύλισης.....	61

6.2.3 Σε σχέση με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη.....	62
6.2.4 Σε σχέση με την ισχύ των μικροκυμάτων.....	64
6.3 Ολικά καροτενοειδή (TCC).....	67
6.3.1 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με το χρόνο εκχύλισης .....	67
6.3.2 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με τη θερμοκρασία εκχύλισης.....	69
6.3.3 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη.....	71
6.3.4 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με την ισχύ των μικροκυμάτων.....	72
6.4 Ολικά φαινολικά (TPC).....	75
6.4.1 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με το χρόνο.....	75
6.4.2 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με τη θερμοκρασία.....	76
6.4.3 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη.....	78
6.4.4 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με την ισχύ των μικροκυμάτων.....	78
6.5 Απόδοση εκχύλισης (Yield).....	81
6.5.1 Σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης .....	81
6.5.2 Σε σχέση με τη θερμοκρασία εκχύλισης.....	82
6.5.3 Σε σχέση με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη.....	84
6.5.4 Σε σχέση με την ισχύ των μικροκυμάτων.....	85
6.6 Στατιστική Ανάλυση των Αποτελεσμάτων .....	87
6.7 Συζήτηση Αποτελεσμάτων .....	92
Κεφάλαιο 7 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα.....	97
Βιβλιογραφία .....	99

## Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021, στο Εργαστήριο της Θερμοδυναμικής & Φαινομένων Μεταφοράς, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Βουτσά.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον κ. Επαμεινώνδα Βουτσά, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, ειδικά σε τέτοιους δύσκολους καιρούς, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για αυτή την πειραματική έρευνα, αλλά και την καθοδήγηση του, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνήτρια και Υποψήφια Διδάκτορα Σοφία Πάππου για την πολύτιμη βοήθειά της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την άμεση ανταπόκριση της, όποτε την χρειαζόμουνα. Ακόμα, ευχαριστώ τη Δρ. Μυρτώ Δαρβαβίλα, για την άψογη συνεργασία που είχαμε και η οποία επίσης, αποτέλεσε Δούρειο Ίππο για την είσοδο μου στο Εργαστήριο της Θερμοδυναμικής & Φαινομένων Μεταφοράς.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και σε όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου της Θερμοδυναμικής & Φαινομένων Μεταφοράς για την πρόθυμη βοήθεια τους, σε ότι χρειαζόμουνα αλλά και για το ευχάριστο περιβάλλον.

Η συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω ένα κλάδο της Χημικής Μηχανικής, που όχι απλά μου κίνησε το ενδιαφέρον αλλά ένα κλάδο που θα με ενδιέφερε να ασχοληθώ και μελλοντικά. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και φίλους για την ενθάρρυνση και την καθημερινή στήριξη.

## Περίληψη

Τα θαλάσσια φύκη έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον από την βιομηχανία και την ακαδημαϊκή κοινότητα, ως φυσικοί πόροι πλούσιοι σε βιοδραστικές ενώσεις. Αρκετές έρευνες αναφέρουν την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα, το μακροφύκος *Ulva lactuca* περιέχει φαινολικές ενώσεις, χλωροφύλλες και καροτενοειδή, ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, έχει αναπτυχθεί έντονη ερευνητική δραστηριότητα για τη ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών που περιέχονται στο μικρόφυκος *U. lactuca*, μέσω διαφόρων τεχνικών εκχύλισης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται κλασσική και υποβοηθούμενη με μικροκύματα (microwave assisted) εκχύλιση βιομάζας *U. lactuca* και μελετάται η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε χλωροφύλλη Α,-Β,-Γ, καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, η αντιοξειδωτική τους δράση και η απόδοση των εκχυλίσεων.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών από το μακρόφυκος *U.lactuca* τόσο με την κλασσική μέθοδο εκχύλισης στερεού-υγρού όσο και με την μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενη με μικροκύματα, με τη χρήση πράσινων διαλυτών, θέλοντας να συνεισφέρει στην γνώση για τη χρήση εναλλακτικών, πράσινων διαλυτών που χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια και βιομηχανίες για την εξαγωγή βιοδραστικών ουσιών από το μακρόφυκος *U. lactuca*.

Στόχος της είναι, η παραμετρική βελτιστοποίηση των δύο μεθόδων εκχύλισης του μακροφύκου *U.lactuca*, ώστε να προκύψουν εκχυλίσματα πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Εξετάζεται η επίδραση των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και στην ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών στόχων. Μελετώντας τα πειραματικά αποτελέσματα, πραγματοποιείται σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης του μακροφύκου *U.lactuca* ώστε να αναδειχθεί η καταλληλότερη ανάμεσα στις δύο.

Στην κλασσική εκχύλιση οι παράμετροι, που εξετάζονται είναι η θερμοκρασία, η χρονική διάρκεια εκχύλισης και η αναλογία διαλύτη-βιομάζας. Στην υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση, εκτός από τις προαναφερθείσες παραμέτρους μελετάται και η ισχύς των μικροκυμάτων.

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας, έγινε χρήση των βαθέμιως ευτηκτικών διαλυτών (Deep Eutectic Solvent – DES) ως μέσα εκχύλισης. Η χρήση των DES σε μια σειρά εφαρμογών της χημικής μηχανικής απασχολεί τα τελευταία χρόνια την ακαδημαϊκή κοινότητα και τη βιομηχανία, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους όπως η εύκολη σύνθεση, το χαμηλό κόστος, η φιλικότητα προς το περιβάλλον, η χαμηλή πτητικότητα, η υψηλή ισχύς διάλυσης και η υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, DES, οι οποίοι είναι: choline chloride/urea 1:2, choline chloride/ethylene glycol 1:4, choline chloride/citric 1:1, choline chloride/citric 1:2, choline chloride/glycerol 1:2, choline chloride/butanediol 1:2, choline chloride/ethylene glycol 1:2

Επίσης χρησιμοποιείται για σύγκριση ο κλασσικός διαλύτης αιθανόλη-νερό(70:30 w/w). Η επιλογή του διαλύτη αιθανόλη-νερό έγινε με βάση τις πειραματικές μελέτες, που έγιναν στο εργαστήριο αλλά και βάσει της βιβλιογραφικής έρευνας, η οποία τον αναδिकνύει ως ένα διαλύτη κατάλληλο και αποδοτικό για συγκεκριμένη εφαρμογή.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μέσα από τις βέλτιστες συνθήκες των δύο εκχυλίσεων ότι, η εκχύλιση με μικροκύματα παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα στα εκχυλίσματα του μακροφύκους σε σχέση με την κλασσική εκχύλιση, ενώ στη κλασσική εκχύλιση ο διαλύτης DES choline chloride/butanediol 1:2 έδειξε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις από την ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών του μακροφύκους *U. lactuca*, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Η κλασσική εκχύλιση παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιοδραστικών ουσιών σε διάρκεια εκχύλισης 12h και σε αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1:10 (w/w).

Όσον αφορά στην εκχύλιση με μικροκύματα, η θερμοκρασία των 60 °C είναι η βέλτιστη για την μέγιστη απόδοση (yield), τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (IC50), και την μέγιστη ανάκτηση ολικών καροτενοειδών (TCC).

Σχετικά με το χρόνο εκχύλισης, η απόδοση της εκχύλισης καθώς και τα ολικά καροτενοειδή βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστο το μέγιστο χρόνο κατεργασίας, δηλαδή τα 30 λεπτά. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστο τον ελάχιστο χρόνο κατεργασίας, δηλαδή τα 5 λεπτά.

Επιπλέον η απόδοση της εκχύλισης, καθώς και τα ολικά καροτενοειδή, βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές όταν χρησιμοποιείται η μέγιστη τιμή ισχύος των μικροκυμάτων, δηλαδή 800 W. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στην ελάχιστη ισχύ, δηλαδή 300 W.

Η απόδοση της εκχύλισης καθώς και τα ολικά καροτενοειδή, βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στη μεγαλύτερη αναλογία βιομάζας/διαλύτη, 1/40 w/w. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στην ελάχιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη, δηλαδή 1/10 w/w.



## Abstract

Seaweed has gained much interest from industry and academia as a natural resource rich in bioactive compounds. Several studies report their strong antioxidant activity, as well as their anti-cancer properties. In particular, the macroalgae *Ulva lactuca* contains phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids, compounds with strong antioxidant activity. Thus, intense research activity has been developed for the recovery of bioactive substances contained in the microalgae *U. lactuca*, through various extraction techniques.

In the present dissertation, classical and microwave-assisted (microwave assistance) *U. lactuca* biomass extraction was carried out and the content of chlorophyll A, -B, -C extracts, carotenoids, phenolic compounds, their antioxidant production was studied.

The aim of the present study is a recovery of bioactive substances from the *U. lactuca* macroalgae by both the conventional solid-liquid extraction method and the microwave-assisted extraction method, using green solvents, wanting to contribute to the knowledge of the use of alternative, green solvents used in laboratories and industries to extract bioactive substances from the macroalgae *U. lactuca*.

Its aim is the parametric improvement of the two extraction methods of *U. lactuca* macroalgae, in order to obtain extracts rich in bioactive substances, with strong antioxidant activity. The effect of the solvents on the antioxidant activity of the extracts and on the recovery of the target bioactive substances is examined. Studying the experimental results, a comparison was made between the two extraction methods of the *U. lactuca* macroalgae to indicate the most suitable of the two.

In conventional extraction the parameters considered are temperature, extraction time and solvent-biomass ratio. In the microwave-assisted extraction, in addition to the aforementioned parameters, the microwave power is also studied.

Deep Eutectic Solvent (DES) was used as an extraction medium in the dissertation. The use of DES in a range of chemical engineering applications has occupied the academic community and industry in recent years, due to their unique properties such as easy composition, low cost, environmental friendliness, low volatility, high dissolution strength and high biodegradability.

The solvents used are the highly eutectic solvents, DES, which are: choline chloride / urea 1: 2, choline chloride / ethylene glycol 1: 4, choline chloride / citric 1: 1, choline chloride / citric 1: 2, choline chloride / glycerol 1: 2, choline chloride / butanediol 1: 2, choline chloride / ethylene glycol 1: 2

Also for comparison the classic solvent ethanol-water (70:30 w / w). The selection of the ethanol-water solution was made based on the experimental studies carried out in the laboratory but also on the basis of the literature research, which is being investigated as a suitable and efficient one for a specific application.

The results showed through the optimal conditions of the two extractions that, the microwave extraction shows better results in the macroalgae extracts than the conventional extraction, while it was in the classic extraction or solvent DES choline chloride / butanediol 1: 2 showed high concentrations. the recovery of the bioactive substances of the macroalgae *U. lactuca*, with strong antioxidant activity.

Conventional extraction showed higher concentrations of bioactive substances during the extraction period of 12h and in a ratio of biomass / solutions of 1:10 (w / w).

For microwave extraction, 60 oC is optimal for maximum yield, maximum antioxidant activity (IC50), and maximum total carotenoid recovery (TCC).

Regarding the extraction time, the extraction efficiency as well as the Dutch carotenoids were found to be optimal at the maximum processing time, ie 30 minutes. On the contrary, the antioxidant activity as well as the Dutch phenolics were found to have the optimal minimum processing time, ie 5 minutes.

In addition, the extraction efficiency, as well as the Dutch carotenoids, were found to have optimal values when the maximum value of the microwave power, ie 800 W. On the contrary, the antioxidant activity as well as the Dutch phenolics were found to have optimal values at the minimum power, ie 300 W.

The extraction efficiency, as well as the Dutch carotenoids, were found to have optimal values at a higher biomass / solvent ratio, 1/40 w / w. On the contrary, the antioxidant activity as well as the Dutch phenomena were found to have optimal values in the minimum biomass / solvent ratio, 1/10 w / w.

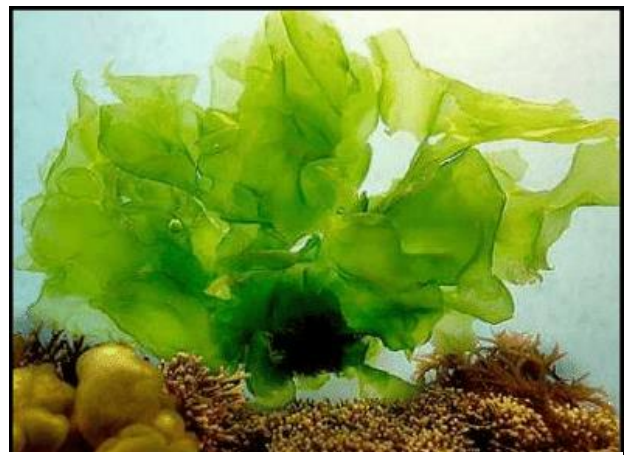
## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Μακροφύκος *U. lactuca*

Το φύκος *U. lactuca*, γνωστό και με το κοινό όνομα θαλάσσιο μαρούλι, είναι ένα βρώσιμο πράσινο φύκι στην οικογένεια *Ulvaceae*. Ανήκει στο γένος *Ulva*, όπου τα τελευταία χρόνια τα είδη του γένους *Ulva* χρησιμοποιούνται ως βιοφίλτρα σε «συστήματα ολοκληρωμένης υδατοκαλλιέργειας» [1]. Μπορεί να φτάσει τα 18 εκατοστά (7,1 ίντσες) έως 30 εκατοστά (12 ίντσες) [2]. Το κύτταρο του φύκους αποτελείται από την κυτταρίνη και πλασματική μεμβράνη και αναπτύσσεται σε βράχια σε εύτροφα υποβαθμισμένα οικοσυστήματα, όπου και χρησιμοποιείται ως δείκτης ευτροφισμού [3].

Αναπτύσσεται παγκοσμίως, σε Ευρώπη, Βόρεια Αμερική (δυτικές και ανατολικές ακτές), Κεντρική Αμερική, Νήσοι της Καραϊβικής, Νότια Αμερική, Αφρική, Νησιά Ινδικού Ωκεανού, Νοτιοδυτική Ασία, Κίνα, Νησιά Ειρηνικού, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία. Το *U. lactuca* είναι πολύ συνηθισμένο κι αναπτύσσεται σε βράχους. Συναντάται επίσης, σε ακτές γύρω από τα Βρετανικά Νησιά, τις ακτές της Γαλλίας, τις Χαμηλές Χώρες μέχρι και τη Δανία. Είναι ιδιαίτερα παραγωγικό σε περιοχές όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα. Όπως για παράδειγμα, στην ακτή της Βρετάνης, όπου ένα υψηλό επίπεδο νιτρικών, από την εντατική καλλιέργεια εκεί, ξεπλένεται στη θάλασσα. Το αποτέλεσμα είναι ότι μεγάλες ποσότητες *U. lactuca* αναπτύσσονται σε παραλίες, όπου η αποσύνθεσή τους παράγει μεθάνιο, υδρόθειο και άλλα αέρια. [3]

Το φύκος *U. lactuca* είναι μακροφύκος και ανήκει στο βιολογικό είδος *Chlorophyta* [2]. Μπορεί να αναπτυχθεί προσκολλημένο και ελεύθερο. Επίσης, είναι ένα πολυμορφικό φύκος, με μορφολογίες που εξαρτώνται από τον βαθμό αλατότητας του νερού ή τη συμβίωση με βακτήρια [5]. Τα θαλάσσια φύκια αποτελούν πηγές πλούσιες σε βιοδραστικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, οι θειούχοι πολυσακχαρίτες (SPs), που εξάγονται από διάφορα είδη φυκών,



Εικόνα 1: μακρόφυκος *U. Lactuca*

έχουν δείξει διάφορες βιολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες. Το *U. lactuca*, γνωστό και ως «θαλασσινό μαρούλι», είναι ένα βρώσιμο πράσινο φύκι από το οποίο εξάγονται οι SPs *Ulvans*.

Αρκετές μελέτες ανέφεραν την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων *Ulva lactuca*. Εκτός από τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με την διέγερση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών, τα *ulvans* έχουν δείξει πολλά υποσχόμενες αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω ενός ή περισσότερων από τους ακόλουθους μηχανισμούς: αντι-μετάσταση, αντι-αγγειογένεση, διαμόρφωση ανοσίας, απόπτωση και αντιοξειδωτική δράση [6].

Οι πολυσακχαρίτες των μακροφυκών *U. lactuca*, εμφάνισαν αντικαρκινική δράση στα κύτταρα λεμφώματος ποντικών, δείχνοντας πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Τα *Ulvans*, αποδείχθηκε επίσης ότι, είναι κυτταροτοξικά για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, για τα κύτταρα καρκίνου του μαστού και του τραχήλου της μήτρας του ανθρώπου [4].

Το *U. lactuca* περιέχει αντιφλεγμονώδεις ουσίες και είναι πλούσια πηγή φυσικού χρώματος με αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό συστατικό στα τρόφιμα καθώς και στη φαρμακευτική βιομηχανία [5].

Το *U. lactuca* μπορεί να αποτελέσει μια ελκυστική πηγή παραγωγής βιοκαυσίμων, καθώς η ανάπτυξή του δεν απαιτεί καλλιεργήσιμη γη και χρήση λιπασμάτων. Το *Ulva* μπορεί να αναπτυχθεί σε αλατόνερο και λύματα και έχει υψηλότερη ικανότητα απορόφησης του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> από τις επίγειες καλλιέργειες. Επιπλέον, οι ρυθμοί ανάπτυξης και η παραγωγικότητα του είναι υψηλοί, σε σύγκριση με εκείνους των καλλιεργειών γης που προορίζονται για την παραγωγή βιοκαυσίμων, και μπορεί να αντέξει σε σκληρές και ακατάλληλες συνθήκες [2].

### 1.1 Βιοδραστικές ουσίες του μακρόφυκου *U. lactuca*

Τα φύκος *U. lactuca* θεωρείται ένα από τα πλουσιότερα βιο-αποθέματα, που περιλαμβάνουν πολυάριθμες βιοδραστικές ενώσεις με ευέλικτες μεθόδους επεξεργασίας και πολλαπλές δραστηριότητες.[7] Μελέτες έδειξαν ότι, είναι πλούσιο σε ξανθοφύλλη και

σε ποικιλία αντιοξειδωτικών (β-καροτένια, λουτεΐνη, λυκοπένιο και νεοξανθίνη). Επίσης, μπορεί να αποτελέσει πηγή ενέργειας.[8]

Το *U. lactuca* αποτελείται από έως και 30% επί ξηρού βάρους Ψίβαν, το οποίο περιέχει κυρίως σουλφονικά οξέα, θειική Ι-ραμνόζη, ξυλόζη και γλυκόζη. Αυτός ο πολυσακχαρίτης και οι ολιγοσακχαρίτες του έχουν, αντικαρκινικές, αντιπηκτικές, αντι-λιπιδικές, ηπατοπροστατευτικές, ανοσο-διεγερτικές, αντικαταθλιπτικές και αντι-αγχολυτικές δραστηριότητες και ζητούνται όλο και περισσότερο για εφαρμογές φαρμακευτικές και τροφίμων.[3] Πρόσφατα αναφέρθηκε η χρήση ενός σύνθετου υλικού κατασκευασμένου από οξειδιο ψευδαργύρου και ανθρακικό ασβέστιο, επικαλυμμένου με πολυσακχαρίτες Ψίβαν για τη θεραπεία εγκαύματων [10][11].

Οι υδατάνθρακες του *U. lactuca* μπορούν επίσης να αποτελέσουν πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοϋλικών καθώς και δομικών στοιχείων για την παραγωγή μιας σειράς χημικών ειδών, όπως οργανικά οξέα και αλκοόλες[12].

Ακόμα, το *U. lactuca* περιέχει φαινολικά, χλωροφύλλη και καροτενοειδή, τα οποία μπορεί να θεωρηθεί ότι δρουν στην καταστροφή των ελεύθερων ριζών [13].

Το *U. lactuca* είναι επίσης πηγή βασικών αμινοξέων. Μερικά από αυτά, όπως η ιστιδίνη, βρίσκονται σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που απαντώνται στα όσπρια και τα αυγά.[14]

Το *U. lactuca* περιέχει έλαια, κατάλληλα για αντιδράσεις εστεροποίησης/διστεροποίησης για την παραγωγή βιοντίζελ.[18]

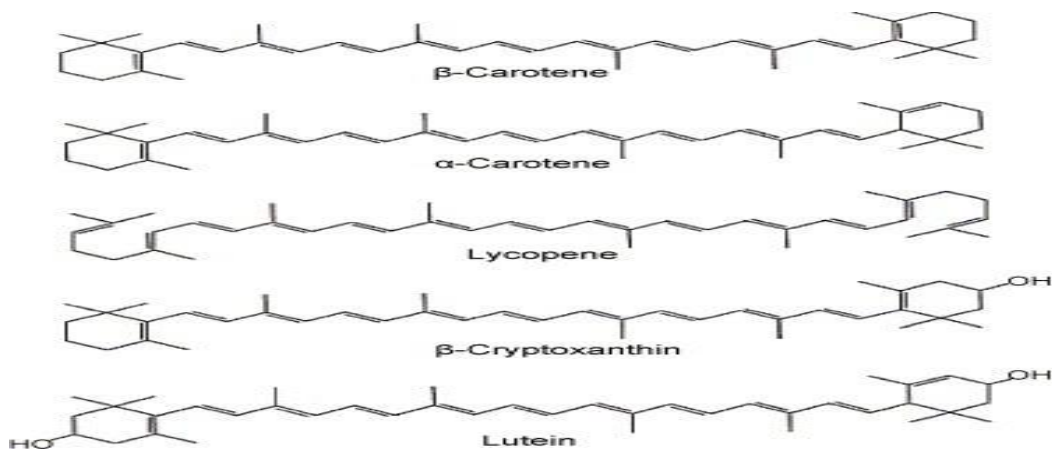
### 1.1.1 Καροτενοειδή

Βάσει επιστημονικών στοιχείων, έχουν διατυπωθεί οδηγίες διατροφής παγκοσμίως που στοχεύουν στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης και η οστεοπόρωση. Μία από τις κύριες συστάσεις αυτών των διαιτητικών οδηγιών είναι η αύξηση της κατανάλωσης φυτικών τροφών, συμπεριλαμβανομένων φρούτων και λαχανικών που είναι πηγές καροτενοειδών. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καροτενοειδών ήταν το κύριο επίκεντρο της έρευνας E.J. Johnson et al 2002 [19].

Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, έχουν λάβει μεγάλο ενδιαφέρον από ερευνητές, επαγγελματίες υγείας και ρυθμιστικούς οργανισμούς για το ρόλο τους στη πρόληψη χρόνιων ασθενειών [20].

Όλα τα καροτενοειδή διαθέτουν πολυισοπρενοειδή δομή, μακρά συζευγμένη αλυσίδα διπλού δεσμού και σχεδόν διμερή συμμετρία γύρω από τον κεντρικό διπλό δεσμό, ως κοινά χημικά χαρακτηριστικά [21].

Το μεγάλο πλήθος των δομών των καροτενοειδών που υπάρχουν στη φύση προκύπτει από διαδοχικές δομικές αλλαγές, όπως κυκλοποίηση στο ένα ή και στα δυο άκρα του μορίου, υδροξυλίωση ή εισαγωγή στο μόριο οξυγονούχων ομάδων, δίνοντας τους τα χαρακτηριστικά χρώματα και τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Οι δομές ορισμένων κοινών καροτενοειδών φαίνονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Δομή ορισμένων σημαντικών διαιτητικών καροτενοειδών

Πιστεύεται ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε καροτενοειδή και σε άλλα δραστικά συστατικά θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο των κακοηθειών του κόλον, του πνεύμονα, και του μαστού [22].

Μεταξύ των καροτενοειδών, η φυκοξανθίνη και η ασταξανθίνη είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα, που θα μπορούσε να βοηθήσει στον έλεγχο της εξέλιξης του καρκίνου. Η φυκοξανθίνη, ένα σημαντικό καροτενοειδές των φαιοφυκών, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.[23]

Βιβλιογραφική έρευνα, με σκοπό τη μελέτη καροτενοειδών στο μακροφύκος *U. lactuca*, έδειξε αρκετά μεγάλη ανάκτηση καροτενοειδών και συγκεκριμένα λουτεΐνη, η  $\beta$ -καροτίνη,

η νεοξανθίνη, η β-κρυπτοξανθίνη, η βιολαξανθίνη, η ανθραξανθίνη και η ζεαξανθίνη. Επίσης, οι αποδόσεις τόσο των συνολικών καροτενοειδών όσο και των μεμονωμένων καροτενοειδών του *Ulna L.*, επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες και συνθήκες. Θα ήταν εφικτό να βελτιωθούν οι αποδόσεις των καροτενοειδών βελτιστοποιώντας τις συνθήκες ανάπτυξης [25].

### 1.2.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία φυτοχημικών ενώσεων στην οποία αποδόθηκε μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία δέκα χρόνια. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φαινολών τη μεγάλης αφθονίας τους στην ανθρώπινη διατροφή και του πιθανού ρόλου τους στην πρόληψη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων που συσχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις.[26]

Οι φυτικές φαινόλες παρουσιάζουν μια ετερογένεια ως προς τη διαλυτότητα τους, αφού μερικές είναι διαλυτές μόνο σε οργανικού διαλύτες καθώς επίσης, υπολογίζεται ότι, περισσότερες από 8000 πολύφαινόλες υπάρχουν σε διάφορα είδη φυτών, ένα εκ των οποίων και το *U. lactuca*. [27]

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα φυσικά αντιοξειδωτικά στα χερσαία φυτά και στην εφαρμογή τους στα συστήματα τροφίμων για την πρόληψη της οξειδωσης. Τα υδρόβια φυτά κερδίζουν επίσης ενδιαφέρον ως πιθανή πηγή αντιοξειδωτικών. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι τα θαλάσσια μακροφύκη είναι μια πλούσια πηγή διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι πολυφαινόλες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.[28]

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες, απαντώνται πολύ συχνά στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν τους σημαντικότερους δευτερεύοντες μεταβολίτες των φυτών.

Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων υδροξυλομάδων (-OH) ενωμένων με έναν εξαμελή αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος συνδέεται με σάκχαρα, όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη.[29][30]

Οι μεταβολίτες αυτοί γενικά εμπλέκονται στην προστασία των φυτών από την υπεριώδη ακτινοβολία και από παθογόνους παράγοντες.

Συνήθως παράγονται από τα φυτά, ως προϊόντα της άμυνας κατά παθογόνων μικροοργανισμών, ή η βιοσύνθεσή τους αποτελεί απόκριση σε καταπονήσεις από το αβιοτικό περιβάλλον (για αυτό και αποκαλούνται μεταβολίτες του στρες) και δε σχετίζονται ευθέως με την ανάπτυξη του φυτικού ιστού.

Παρόλα αυτά, συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο σχηματισμός ριζών, η βλάστηση των σπόρων και η ωρίμανση των καρπών, και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των φυτών.

Είναι συνδεδεμένοι με τα μορφολογικά και τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά αυτών και των παραπροϊόντων τους (συνεισφέρουν στη γεύση και το χρωματισμό τους) και είναι υπεύθυνοι για διάφορες λειτουργικές ιδιότητες των φυτών [29-31]. Οι φαινολικές ενώσεις είναι στενά συνδεδεμένες με την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυσικών προϊόντων.

Οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες των πολυφαινολών τις καθιστούν ικανές να δρουν ως αναγωγικά μέσα, έχοντας την ικανότητα εξεδουτέρωσης των ελευθέρων ριζών ενός φυτού, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες. Όπως δηλώνουν μερικές επιδημιολογικές μελέτες, η μακροχρόνια υιοθέτηση διατροφής πλούσιας σε φυτικές πολυφαινόλες συνεισφέρει στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες και συνεπώς προλαμβάνει την εμφάνιση σοβαρών χρόνιων παθήσεων.

Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις μειώνουν την περίσσεια ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται στους ασθενείς, με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμικής κατάστασης και για αυτό προσδίδουν στο φυσικό προϊόν στο οποίο περιέχονται ικανοποιητική δράση έναντι του διαβήτη τύπου II.

Σύμφωνα με τη μελέτη Wang et al 2009, διαπιστώθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ των ολικών φαινολικών που περιέχονται σε εκχυλίσματα φυκιών, ενισχύοντας την ικανότητα δράσης τους ενάντια στις ρίζες υπεροξυλίου, καθιστώντας έτσι, ισχυρά αντιοξειδωτικά.[30]

Οι φαινόλες ανήκουν στη κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως και τα καροτενοειδή και βρίσκονται σε φυτά, όπως το *U. lactuca*. και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων και να προστατεύσουν το ανθρώπινο σώμα



από διάφορες χρόνιες ασθένειες . Έχει αποδειχθεί ότι, στα εκχύλισματα *U. lactuca*, οι υψηλές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων παίζουν ρόλο στην αντιοικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων του μακροφύκου.[32] Αρκετές μελέτες επικεντρώθηκαν στη μελέτη των ολικών φαινολικών, που περιέχουν τα εκχύλισματα του *U. lactuca*., λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής τους δράσης και της μεγάλης συγκέντρωσης που μπορεί να ανακτηθεί από αυτά, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες εκχύλισης.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Τεχνικές εκχύλισης για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από το μακροφύκος *U. lactuca*

Οι ποσοτικές και ποιοτικές μελέτες βιοδραστικών συστατικών που προέρχονται από φυτά, βασίζονται κυρίως στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης. Οι πιο κοινοί παράγοντες που επηρεάζουν τις διεργασίες εκχύλισης είναι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος.

Η εκχύλιση των φυτικών υλικών, μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους. Οι μη συμβατικές μέθοδοι, οι οποίες είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης χρήσης συνθετικών και οργανικών χημικών, μικρότερου χρόνου λειτουργίας και καλύτερης απόδοσης και ποιότητας εκχυλίσματος, έχουν αναπτυχθεί κατά τα τελευταία 50 χρόνια. Για την ενίσχυση της συνολικής απόδοσης και της επιλεκτικότητας βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά, έχουν μελετηθεί ως μη συμβατικές τεχνικές η χρήση υπερήχων, μικροκυμάτων και υπερκρίσιμων ρευστών. Ταυτόχρονα, συμβατικές τεχνικές, όπως η κλασική εκχύλιση στερεού-υγρού, θεωρούνται ακόμη μέθοδοι αναφοράς για σύγκριση με τις καινοτόμες τεχνικές και μέτρο της επιτυχίας τους.

Βιβλιογραφική μελέτη σύγκρινε διάφορες μεθόδους εκχύλισης από μακροφύκι, μελετώντας την ανάκτηση όσο το δυνατόν υψηλότερων συγκεντρώσεων των βιοδραστικών ουσιών από αυτό. Συγκεκριμένα, στην εργασία των *Fabrowska et al (2018)* μελετήθηκε η απομόνωση καροτενοειδών από φύκια γλυκού νερού (*Ulva flexuosa*), χρησιμοποιώντας τέσσερις μεθόδους εκχύλισης: μικροκυμάτων (MAE), η υπερηχογραφική εξαγωγή (HAE), η υπερκρίσιμη εκχύλιση υγρών (SFE) και κλασική εκχύλιση με αιθανόλη ως διαλύτη, μελετώντας την ανάκτηση ολικών καροτενοειδών και χλωροφύλλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι , η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα είχε μεγαλύτερες αποδόσεις στις συγκεντρώσεις των ουσιών από τα εκχυλίσματα.[37]

Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, στη παρούσα διπλωματική έρευνα, για την εκχύλιση του μακροφύκου ήταν η MAE και η κλασική εκχύλιση. Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα μελετήθηκε η θερμοκρασία, η ισχύς, η διάρκεια εκχύλισης και η αναλογία βιομάζα/διαλύτη. Στη κλασική εκχύλιση μελετήθηκε η θερμοκρασία, η διάρκεια εκχύλισης και η βιομάζα/διαλύτη, με τη χρήση του διαλύτη αιθανόλη/νερό(70:30 w/w)

Η εκχύλιση με μικροκύματα αποτελεί τη πιο συχνή και πιο αποτελεσματική μέθοδο για τα εκχυλίσματα φυτών.[34][40]

Παρακάτω, θα αναπτυχθούν οι κύριες τεχνικές εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών, στις οποίες επικεντρώθηκε η μελέτη της παρούσα έρευνα για την εκχύλιση του μακροφύκου *U. lactuca.*, που είναι γνωστές μέχρι σήμερα.

## 2.1 Κλασική Εκχύλιση Στερεού-Υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού (*Solid Liquid Extraction-SLE*) αναφέρεται στην κλασική τεχνολογία εκχύλισης, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου διαλύτη, οποίος διαλύει επιλεκτικά την ένωση που μας ενδιαφέρει, όχι όμως και το υπόστρωμα. Η πιο κοινή μορφή της τεχνικής SLE είναι η μέθοδος “*shake-filter*” η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη για τις οργανικές ενώσεις ή αραιού οξέος ή βάσης για τις ανόργανες ενώσεις, στο δείγμα και την ανάδευση, για να επιτρέψει στις ενώσεις να διαλυθούν στο υγρό περιβάλλον, έως ότου παραληφθούν πλήρως [86].

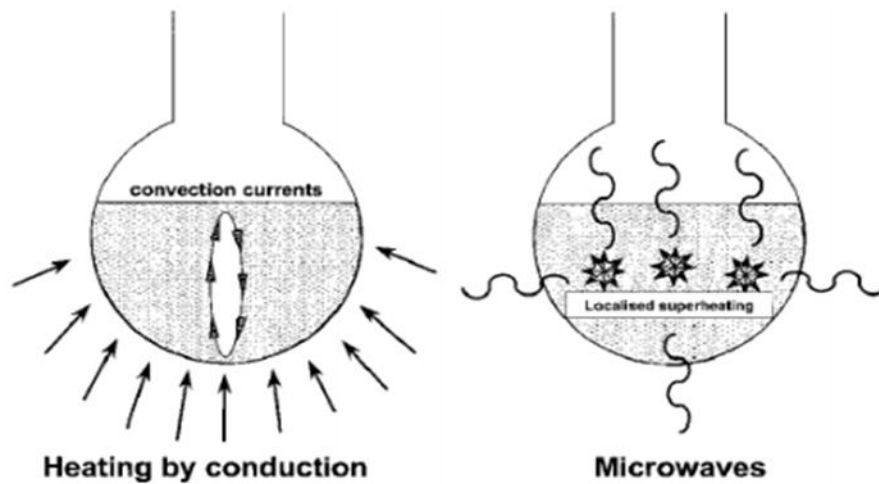
Η διαδικασία κλασικής εκχύλισης μπορεί να επιταχυνθεί με θέρμανση, με τη βοήθεια ψυκτικού, για να μπορεί να παραμένει σταθερή θερμοκρασία και με ανάδευση. Στη συνέχεια, Οι αδιάλυτες ενώσεις απομακρύνονται στη συνέχεια με διήθηση ή φυγοκέντρηση.

Σε βιβλιογραφική μελέτη, η οποία μελέτησε την εξαγωγή φαινολικών ενώσεων από φύλλα *Ficus carica*, με την κλασική μέθοδο εκχύλισης στερεού-υγρού, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια απλή μέθοδο, οικολογικά φιλική και αποτελεσματική.

Οι κλασική εκχύλιση, μπορεί να αποτελέσει μέθοδο σύγκριση για τις νέες αναπτυγμένες μεθόδους εκχύλισης, που χρησιμοποιούνται πιο συχνά τα τελευταία χρόνια[37]

## 2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (ΜΑΕ)

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με εύρος συχνοτήτων από 0,3 μέχρι 300 GHz. Το μεγάλο πλεονέκτημα των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τις κλασσικές μεθόδους θέρμανσης με αγωγή, είναι ότι τα μικροκύματα θερμαίνουν όλο το δείγμα ταυτόχρονα.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της αρχής θέρμανσης με αγωγή στην κλασσική εκχύλιση και με την ακτινοβολία των μικροκυμάτων στην εκχύλιση με μικροκύματα

Παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ξηρή φυτόμαζα για εκχυλίσεις, τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν ακόμη μικροσκοπικά ίχνη υγρασίας, τα οποία αποτελούν το στόχο της θέρμανση με μικροκύματα. Η υγρασία όταν θερμανθεί μέσα στο φυτικό κύτταρο λόγω του φαινομένου των μικροκυμάτων, εξατμίζεται και ασκεί μεγάλη πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα και συνεπώς τη διόγκωσή του. Το κυτταρικό τοίχωμα λοιπόν, πιέζεται εσωτερικά και έτσι προκαλείται η ρήξη του κυττάρου που επιτρέπει την απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών στον περιβάλλοντα διαλύτη, αυξάνοντας την απόδοση εκχυλίσμων συστατικών.

Αυτό το φαινόμενο μπορεί να ενταθεί ακόμη περισσότερο αν ο διαλύτης που περιβάλλει τη μήτρα του φυτού έχει καλύτερη θερμική απόδοση υπό την επίδραση των μικροκυμάτων.

Οι *Zhou και Liu (2006)* και οι *Kratchanova et al. (2004)* μελέτησαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ιστούς από φύλλα καπνού και φρέσκες φλοιίδες πορτοκαλιών αντίστοιχα, πριν από την εκχύλισή τους με μικροκύματα και μετά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επιφάνεια των δειγμάτων ήταν κατεστραμμένη σε μεγάλο βαθμό μετά από την εκχύλιση με μικροκύματα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η εκχύλιση με μικροκύματα επηρεάζει την κυτταρική δομή των δειγμάτων λόγω της απότομης αύξησης της θερμοκρασίας και της εσωτερικής πίεσης των κυττάρων.[82]

Οι κύριοι βασικοί παράμετροι που παίζουν ρόλο στη εκχύλιση με μικροκύματα είναι η ισχύς, η θερμοκρασία και η διάρκεια εκχύλισης.

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Πράσινοι διαλύτες

Τα τελευταία χρόνια, σχεδόν όλες οι διεργασίες εξαγωγής αρωματικών ελαίων, καλλυντικών και φαρμάκευτικών δραστικών συστατικών, συστατικών τροφίμων, θρεπτικών συστατικών, βιοκαυσίμων, βασίζονται σε διαλύτες, οι περισσότεροι από τους οποίους έχουν πετρελαϊκή προέλευση. Τα περίπλοκα βήματα επεξεργασίας που περιλαμβάνονται στον κύκλο βιομηχανικής παραγωγής τους καθιστά όλο και πιο δύσκολη την πρόβλεψη του συνολικού περιβαλλοντικού αντίκτυπου.

Οι ιδανικοί εναλλακτικοί διαλύτες κατάλληλοι για πράσινη εκχύλιση θα πρέπει να έχουν υψηλή αξιοπιστία, υψηλά σημεία ανάφλεξης με χαμηλή τοξικότητα και χαμηλές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, να είναι εύκολα βιοδιασπώμενοι, να λαμβάνονται από ανανεώσιμους (μη πετροχημικούς) πόρους σε λογική τιμή και να είναι εύκολο να ανακυκλωθούν χωρίς καμία βλαβερή επίδραση στο περιβάλλον. Η εύρεση του τέλειου διαλύτη που πληροί όλες τις προαναφερθείσες απαιτήσεις είναι ένα δύσκολο έργο, έτσι η απόφαση για τον βέλτιστο διαλύτη θα είναι πάντα ένας συμβιβασμός ανάλογα με τη διεργασία και το φυτό το οποίο πρόκειται να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. [84]

Πειραματικές μελέτες, εξέτασαν την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από εκχυλίσματα *U. lactuca*, με σκοπό την ανάκτηση όσο δυνατόν μεγαλύτερων συγκεντρώσεων και τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του μακροφύκου, με διάφορους διαλύτες [23][34]. Το συμπέρασμα ήταν ότι, η αιθανόλη πέραν της μεγάλης απόδοσης που είχε στις παραμέτρους που εξετάστηκαν, θεωρείται ως εναλλακτικός διαλύτης λόγω του χαμηλότερου κόστους παραγωγής από άλλους εναλλακτικούς διαλύτες και του γεγονότος ότι αναγνωρίζεται ως «βιοανανεώσιμος» διαλύτης.

Βιβλιογραφική μελέτη έδειξε ότι, ο διαλύτης αιθανόλη/νερό θεωρήθηκε να παρουσιάζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα των φυκιών *C. Pyrenoidosa*, σε σύγκριση με το εξάνιο και τη μεθανόλη.[85]

Επίσης, έχει θεωρηθεί από άρθρο που μελέτα την περιβαλλοντική αξιολόγηση διαλυτών ότι, τα μείγματα μεθανόλης-νερού ή αιθανόλης-νερού είναι ευνοϊκά για το περιβάλλον σε σύγκριση με τα καθαρά μίγματα αλκοόλης.[88]

Η επιλογή ενός διαλύτη οδηγείται κυρίως από φυσιοχημικές ιδιότητες, που είναι συμβατές με τα αντιδρώντα, καθιστώντας παράλληλα το κατάλληλο περιβάλλον που απαιτείται για την παροχή της βέλτιστης ταχύτητας και επιλεκτικότητας. Τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει αρκετές εξειδικευμένες μελέτες, κυρίως από φαρμακοβιομηχανία για να αξιολογήσουν και να αποσαφηνίσουν τη χρήση οργανικών διαλυτών. Σε όλες αυτές τις αναθεωρήσεις, το μίγμα αιθανόλη:νερο βαθμολογήθηκε ιδανικό από τις υπάρχουσες μετρήσεις.[89] Σημαντικό ρόλο, παίζει η αναλογία του διαλύτη αιθανόλη:νερό. Συγκεκριμένα σε έρευνα, η οποία μελέτησε την ανάκτηση φαινολικών ενώσεων και την αντιοξειδωτική δράση της προπύλης, γνωστή φυσική ουσία, τα αποτελέσματα της έδειξαν ότι 75% κατά βάρος αιθανόλη/νερό διαλύτης μπορεί να είναι ο καλύτερος για την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης και τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες.[90]

### **3.1 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες- DES (deep eutectic solvents)**

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι ένα σύνολο πράσινων διαλυτών, οι οποίοι ανακαλύφθηκαν το 2003 [49]. Αυτοί οι νέοι διαλύτες αναπτύσσονται με σκοπό να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς πτητικούς οργανικούς διαλύτες, σε πολλές εφαρμογές, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους. Ως βαθής ευτηκτικός διαλύτης ορίζεται ένα ευτηκτικό υγρό μίγμα δύο ή περισσότερων στερεών ή υγρών συστατικών, τα οποία μπορούν να σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals. Μάλιστα, όταν πρωτεύοντες μεταβολίτες φυσικών προϊόντων, αναμιγνυόμενοι στην κατάλληλη αναλογία, μετατρέπονται από ένα ετερογενές μίγμα σε ένα ομογενές υγρό, παρασκευάζονται οι λεγόμενοι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDESs), που συνεπώς αποτελούν υποκατηγορία των DESs. Έχουν παρασκευαστεί πάνω από 100 διαφορετικά NaDESs μέχρι σήμερα, τα οποία φαίνεται να λειτουργούν ως αποτελεσματικοί διαλύτες πολλών βιολογικά ενεργών μορίων.

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) θεωρούνται μία ιδιαίτερα ελκυστική νέα κατηγορία πράσινων διαλυτών, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως η εύκολη σύνθεση, το χαμηλό κόστος σύνθεσης, η φιλικότητα προς το περιβάλλον, η χαμηλή πτητικότητα, η

υψηλή ισχύς διάλυσης, η υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα και η δυνατότητα του δομικού τους σχεδιασμού [48].

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του DES εξαρτώνται από τη στοιχειομετρική αναλογία και την ταυτότητα των δομικών συστατικών τους.

Ένας DES αποτελείται από έναν δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) και έναν δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA). [49].

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των DES είναι η προσρόφηση διοξειδίου του άνθρακα. Η προσρόφηση και η απομόνωση του CO<sub>2</sub> είναι ένα τρέχον φλέγον ζήτημα με στόχο τη μείωση της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Οι μεγαλύτερες προσπάθειες εστιάζονται στην ανάπτυξη πηγών ενέργειας που δεν εκπέμπουν CO<sub>2</sub>, ωστόσο αυτές δεν βρίσκονται ακόμα στο στάδιο όπου μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα. Ο σχεδιασμός βιώσιμων, ανακυκλώσιμων προσροφητικών υλικών που εμφανίζουν ενισχυμένη ικανότητα προσρόφησης CO<sub>2</sub> είναι ζωτικής σημασίας. Λόγω της υψηλής διαλυτότητας του CO<sub>2</sub> στα ιοντικά υγρά, αυτά έχουν βρει εφαρμογή ως διαλύτες για δέσμευση CO<sub>2</sub>. Ωστόσο, τα DES και ειδικότερα τα NaDES παρουσιάζουν μια βιώσιμη εναλλακτική λύση, καθώς είναι φθηνότερα, βιοαποικοδομήσιμα και βιοσυμβατά.[42]

Η έρευνα πάνω στα NaDESs ειδικότερα αναπτύσσεται εκθετικά. Τυπικά συστατικά των NaDESs που δρουν ως δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου είναι: άλατα (χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη κ. ά.), σάκχαρα (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη κ. ά.), πολυόλες (γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη, 1,2-προπυλενογλυκόλη, ξυλιτόλη, σορβιτόλη κ. ά.), αμινοξέα (αλανίνη, προλίνη, σερίνη, γλουταμινικό οξύ κ. ά.) και οργανικά οξέα (γαλακτικό, μηλονικό, μηλεϊνικό, οξαλικό, κιτρικό, μηλικό, τρυγικό οξύ κ. ά.).[67][72][77]

Η παγκόσμια στροφή προς την Πράσινη Χημεία αποτελεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση κατά των συμβατικών χημικών πρακτικών. Ακολουθώντας την τάση αυτή, γίνεται επανεκτίμηση τόσο των πρώτων υλών όσο και των διεργασιών από το μηδέν, συνδυάζοντας την έρευνα για φυσικής προέλευσης βιώσιμων πρώτων υλών και ανανεώσιμων υλικών, με περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτικές βιομηχανικές διεργασίες και εφαρμογές.[70]

Για παράδειγμα, τα τελευταία χρόνια, πραγματοποιούνται έρευνες πάνω στη διαμόρφωση «πράσινων», αποτελεσματικών και οικονομικών στρατηγικών εκχύλισης.



Καταβάλλεται συνεχώς προσπάθεια να μειωθεί η χρησιμοποιούμενη ποσότητα διαλύτη και ο χρόνος εκχύλισης, αλλά ταυτόχρονα να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα και η εκλεκτικότητα και να προκύπτουν εκχυλίσματα υψηλής ποιότητας. Η πράσινη τεχνολογία εδώ στοχεύει στην ανάπτυξη μιας οικονομικά αποδοτικής και οικολογικά βιώσιμης μεθόδου εκχύλισης φυτοχημικών υψηλής αξίας για να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα περιποίησης και εναλλακτικά προϊόντα. Με άλλα λόγια, οι τεχνικές πράσινης εκχύλισης αναπτύσσονται με βάση το σχεδιασμό διεργασιών εκχύλισης με στόχο την ελάττωση της κατανάλωσης ενέργειας και της οικονομικής δαπάνης στο ελάχιστο και τη μείωση της χρήσης πτητικών οργανικών διαλυτών (Volatile Organic Solvents, VOSs).[71][72][75]

Οι διαλύτες είναι συχνά ο καθοριστικός παράγοντας του κόστους, του περιβαλλοντικού αποτυπώματος και της ασφάλειας διαφόρων χημικών και φαρμακευτικών διεργασιών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι εκχύλισης και απομόνωσης που μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση πλήθους οργανικών διαλυτών και να δώσουν πολυάριθμες νέες ενώσεις, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται σε φάρμακα, τρόφιμα και ροφήματα, καλλυντικά κλπ. Οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης συνήθως συνδέονται με μεγάλους χρόνους διάρκειας της διεργασίας, κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών και την πιθανή θερμική υποβάθμιση των πολυφαινολών. Οι περισσότεροι οργανικοί διαλύτες (και τα υδατικά τους διαλύματα), όπως η ακετόνη, το χλωροφόρμιο και το εξάνιο, που βρίσκουν εφαρμογή στην απομόνωση φυσικών προϊόντων, μπορεί να είναι εύφλεκτοι, πτητικοί, εκρηκτικοί, ακριβοί, έντονα τοξικοί, υπεύθυνοι για τη μόλυνση του περιβάλλοντος και το φαινόμενο του θερμοκηπίου (συσσωρεύονται στην ατμόσφαιρα λόγω των χαμηλών σημείων βρασμού τους), μη βιοαποικοδομήσιμοι και μπορεί να προκαλούν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Για αυτό, δεν είναι συμβατοί με τις αρχές των «πράσινων» διεργασιών εκχύλισης και η ανάγκη απομάκρυνσής τους από τα εκχυλίσματα είναι επιτακτική, οδηγώντας σε υψηλότερο ενεργειακό και οικονομικό κόστος. Το γεγονός αυτό αποτελούσε σημαντικό πρόβλημα τις προηγούμενες δεκαετίες, αλλά σήμερα είναι γνωστό ότι μπορεί να επιλυθεί μέχρι ενός σημείου με τη χρήση πράσινων διαλυτών.[72][73][74][75]

Σε παγκόσμιο επίπεδο, λοιπόν, πραγματοποιείται έρευνα πάνω σε διάφορες ομάδες ενώσεων, για το αν και πώς μπορούν να λειτουργήσουν ως ασφαλέστεροι διαλύτες, με στόχο το διαχωρισμό ουσιών, με σημαντικά πλεονεκτήματα για την υγεία και την ευεξία,

από φυσικούς πόρους με πράσινες μεθόδους. Σε αυτά τα πλαίσια, τα ιοντικά υγρά και οι ευτηκτικοί διαλύτες έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς διαλύτες. Στη μελέτη αυτή, το επίκεντρο του ενδιαφέροντος θα αποτελέσουν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DES).[75][76]

### 3.1.1 Μέθοδοι παρασκευής DES

Οι επικρατέστερες μέθοδοι παρασκευής ενός DES είναι συνήθως απλές, φθηνές, «πράσινες» και περιλαμβάνουν την ανάμιξη δύο ενώσεων (του δότη και του δέκτη δεσμών υδρογόνων) σε συγκεκριμένη αναλογία υπό ανάδευση και θέρμανση ή εξάτμιση υπό κενό για μεγάλο χρονικό διάστημα, μέχρι να παραληφθεί καθαρό ομογενές υγρό. Ωστόσο, είναι δυνατή η παρασκευή DES με τη χρήση λουτρού υπερήχων, καθώς και με λυοφιλίωση (freeze-drying). [67][71][72][76]

Η πιο συχνή μέθοδος θέρμανσης, πιο αναλυτικά, περιλαμβάνει τη θέρμανση και μαγνητική ανάδευση του μίγματος των δύο συστατικών που θα αποτελέσουν το DES. Συνήθως, εφαρμόζονται θερμοκρασίες χαμηλότερες από τους 50 °C, για χρόνο διάρκειας 30-90min, μέχρις ότου σχηματιστεί διαυγές, ομογενές και άχρωμο ρευστό. Σύμφωνα με τη μέθοδο της εξάτμισης υπό κενό για την παρασκευή NaDES, τα συστατικά διαλύονται σε νερό και ύστερα πραγματοποιείται εξάτμιση αυτού στους 50 °C σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Το παραληφθέν ρευστό τοποθετείται σε ξηραντήρα, μέχρι σταθερού βάρους. Στη μέθοδο της λυοφιλίωσης, τα συστατικά διαλύονται σε νερό πριν την πραγματοποίησή της. Το νερό εξαχνώνεται και παραλαμβάνεται καθαρός διαλύτης. Συγκριτικά μιλώντας, η μέθοδος θέρμανσης είναι η φθηνότερη και η ασφαλέστερη από τις τρεις που έχουν αναφερθεί [71][73][75][77][78].

### 3.1.2 Πλεονεκτήματα των DES

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες επιδεικνύουν πολλά προτερήματα, όπως η αμελητέα πτητικότητα (χαμηλή τάση ατμών) που μειώνει το περιβαλλοντικό αποτύπωμά τους, η

ικανότητα να διαλυτοποιούν μια πληθώρα ενώσεων, η δυνατότητα αλλαγής του ιξώδους τους, το χαμηλό κόστος (ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα) και οι απλές, οικονομικές και γρήγορες διαδικασίες παρασκευής τους, κατά τις οποίες δεν παράγονται απόβλητα. Οι ιδιότητες των NaDESs που τα καθιστούν «πράσινους» διαλύτες είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα, η μη ευφλεκτότητα, η χαμηλή (ή και μηδαμινή) τοξικότητα και η φυσική τους προέλευση [72][76][79].

Στην περίπτωση που τα συστατικά των DESs έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (U. S. Food and Drug Administration), τα DESs θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε εφαρμογές της φαρμακευτικής και της κοσμετολογίας. Κατ' επέκταση, και τα φυτικά εκχυλίσματα που προκύπτουν με τη χρήση DES, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε αυτές τις βιομηχανίες, χωρίς να είναι απαραίτητα επιπρόσθετα στάδια απομόνωσης του επιθυμητού προϊόντος από το διαλύτη, με την προϋπόθεση βέβαια ότι έχουν πραγματοποιηθεί κατάλληλες δοκιμές τοξικότητας και βιοσυμβατότητας.

Η ανάκτηση του διαλύτη θα ήταν δύσκολη, δεδομένης της χαμηλής τάσης ατμών των DESs. Το τελικό προϊόν της εκχύλισης, που αποτελείται από το χρησιμοποιηθέν NaDES και τις εκχυλισθείσες ενώσεις, είναι και αυτό εξ ολοκλήρου φυσικής προέλευσης. Τα NaDESs με αυτόν τον τρόπο παρέχουν σταθερότητα στις βιοδραστικές ενώσεις και λειτουργούν, παρά το υψηλό ιξώδες τους, ως συστήματα αποθήκευσης για αυτά τα ευαίσθητα μόρια ή ακόμα ως συστήματα διαμόρφωσης, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατευθείαν σε συγκεκριμένες εφαρμογές (κοσμετολογία, συμπληρώματα διατροφής, διατροφικά και άλλα φαρμακευτικά προϊόντα), σε τελικά προς κατανάλωση προϊόντα. Γενικά, η εξέλιξη των DESs και, κυρίως, των NaDESs, σημαίνει ότι ο σχεδιασμός των καινούριων διαλυτών μπορεί να εστιάσει σε ένα διαλύτη που αποτελεί ικανό και βιοσυμβατό μέσο αποθήκευσης, ένα άμεσα διαθέσιμο ενεργό συστατικό, έναν πολύ αποτελεσματικό καταλύτη, ή έναν μεταφορέα μορίων στα επόμενα στάδια, που ενδεχομένως παίζει βοηθητικό ρόλο στις αντιδράσεις που μπορεί να λαμβάνει μέρος το εκχύλισμα ή στο συνολικό περιβάλλον που πρόκειται να τοποθετηθεί. Η παράκαμψη του τελευταίου σταδίου της εκχύλισης (του διαχωρισμού του DES από το εκχύλισμα) φαίνεται ότι είναι δυνατή από την ικανοποιητική συμπεριφορά του συστήματος εκχυλίσματος με DES σε αναλυτικές μεθόδους ή χημικές διεργασίες [67][71][76].

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεταβλητών, όπως το πλήθος των συστατικών του DES, οι αναλογίες αυτών, καθώς και τα ίδια τα συστατικά, που δίνουν τη δυνατότητα στον ερευνητή να σχεδιάσει και να χρησιμοποιήσει οποιοδήποτε DES σε οποιοδήποτε σύστημα μέσω οποιασδήποτε μεθόδου, με την υπόσχεση ότι η προκύπτουσα εκχύλιση θα είναι αποτελεσματική αλλά ταυτόχρονα πράσινη, δεδομένων των γενικών ιδιοτήτων των DESs (για αυτό και αποκαλούνται designer solvents). Το σχετικά χαμηλό κόστος των συστατικών των DESs, σε συνδυασμό με την αυξημένη εκλεκτικότητα μετά από προσεκτικό σχεδιασμό, σημαίνει ότι το μέλλον των πράσινων διεργασιών θα περιλαμβάνει σίγουρα τα DESs στην επιτομή των εκχυλίσεων. Επιπλέον, σημαντικά πλεονεκτήματα των μεθοδολογιών εκχύλισης με τη χρήση DESs και τεχνικών υψηλής ενέργειας ταυτόχρονα είναι η απουσία τοξικών παραπροϊόντων (που παρατηρείται στην περίπτωση των συστημάτων κλασικών οργανικών διαλυτών) και οι μικροί χρόνοι εκχύλισης [67][76][77].

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Αντιοξειδωτική δράση

Με τον όρο αντιοξειδωτικά αναφερόμαστε στις φυσικές ουσίες που περιέχονται στα τρόφιμα, οι οποίες δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό, αλλά και στα πρόσθετα (χημικά ή φυσικά) που περιέχονται σε τρόφιμα του εμπορίου με συνήθη σκοπό τη συντήρησή τους.[59]

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ως απενεργοποιητές ελεύθερων ριζών και των υδροξυλιωμένων ελεύθερων ριζών, είναι να εμποδίσουν στα συστατικά του κυττάρου την καταστροφή που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Πρόσφατα, σημαντικός αριθμός στοιχείων έχει δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν κεντρικό ρόλο ως συντελεστές στο γήρας και σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η φθορά του ανοσοποιητικού συστήματος και οι εγκεφαλικές δυσλειτουργίες [59][60]. Ευτυχώς, η δημιουργία ελεύθερων ριζών ελέγχεται από πολλές ευεργετικές ενώσεις, τα αντιοξειδωτικά. Όταν η διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών είναι μειωμένη, αυτή η καταστροφή μπορεί να συσσωρευτεί και να επιφέρει αποτελέσματα οξειδωτικού stress. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την δυνατότητα να σταθεροποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους. Έτσι είναι κρίσιμα για την διατήρηση της ιδανικής υγείας του κυττάρου και του οργανισμού [61].

### 4.1 Φυσικά Αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυτικής προέλευσης με αντιοξειδωτική δράση. Η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών εξαρτάται κυρίως από τα φυτά από τα οποία προέρχονται και από τον τρόπο παραλαβής τους. Παραλαμβάνονται λοιπόν είτε σε μορφή αιθέριου ελαίου ή ως εκχυλίσματα (extracts). Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τα οποία παραλαμβάνονται από τα φυτά, επηρεάζεται σημαντικά από:

- Τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται για την παραλαβή τους και
- Την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή τους.

Αρκετά γνωστά φυσικά αντιοξειδωτικά, όπως βιταμίνες Α, C και Ε και οι πολυφαινόλες, ουσίες που περιέχονται σε ελιά και ελαιόλαδο, έχουν αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν από καρκινογένεσεις. Αντιπροσωπευτικές είναι το β-καροτένιο και η βιταμίνη-Ε που απαντάται στα φρούτα, κυρίως τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, κίτρα) και τα λαχανικά, ιδιαίτερα τα κίτρινα και πορτοκαλί (καρότα, πιπεριές). Β-καροτένιο και φαινολικά μελετώνται στη παρούσα διπλωματική εργασία.

## 4.2 Αντιοξειδωτική δράση του φύκου *U. lactuca*

Σήμερα, οι βιομηχανικές εφαρμογές που βασίζονται σε υλνans είναι περιορισμένες, αν και είναι γνωστό ότι σχηματίζουν θερμοαναστρέψιμες γέλες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και ότι έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων. Θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ως αντιυπερλιπιδαιμικό, αντιικό, αντικαρκινικό, αντιπηκτικό και αντιοξειδωτικό [62].

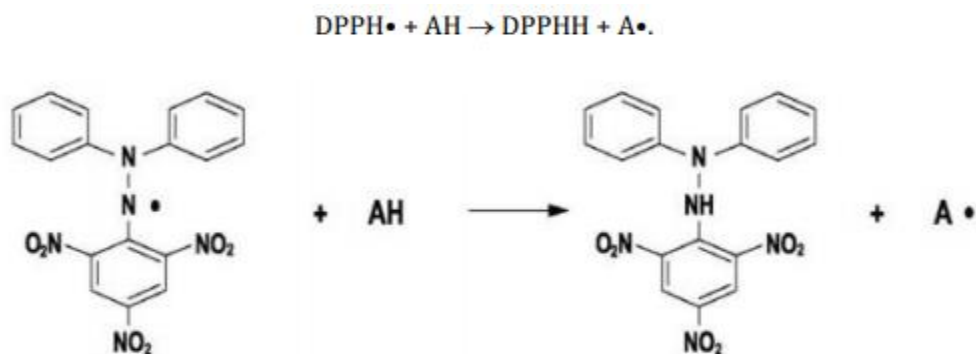
Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του υλvan έχει προσελκύσει όλο και περισσότερο την προσοχή των ερευνητών λόγω των αυξανόμενων απαιτήσεων από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων να παράγουν φυσικές βιοδραστικές ενώσεις από ανανεώσιμους πόρους. Αρκετές έρευνες αποκάλυψαν ότι οι θειούχοι πολυσακχαρίτες από πράσινα φύκια άσκησαν σημαντικές *in vitro* αντιοξειδωτικές δραστηριότητες [63][64]. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν πολύ περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με το αντιοξειδωτικό δυναμικό του *ulvan* από το μακροφύκος *U. lactuca* [68].

Μελέτες σχετικά με τις βιοενεργότητες των θαλάσσιων φυκιών έχουν αποκαλύψει πολυάριθμες επιδράσεις προαγωγής της υγείας, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών επιδράσεων.[83] Πολλά θαλάσσια φυσικά προϊόντα που περιέχουν αντιοξειδωτικά είναι γνωστό ότι έχουν αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα.[24][25][66] Ένα από αυτά, είναι το μακρόφυκος *U. lactuca*, το οποίο έχει αντιφλεγμονώδεις ουσίες και είναι πιθανώς πλούσια πηγή φυσικών χρωστικών με αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό συστατικό στα τρόφιμα και στη φαρμακευτική βιομηχανία.[22]

### 4.3 Αντιοξειδωτική δράση με τη ΜΕΘΟΔΟ DPPH

Η ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH είναι μια συνηθισμένη τεχνική και αποτελεί την πρότυπη χρωματομετρική μέθοδο, που εφαρμόζεται σε εργαστήρια για τον προσδιορισμό της δυνατότητας αδρανοποίησης ελευθέρων ριζών, τόσο καθαρών φαινολικών ενώσεων, όσο και φυτικών εκχυλισμάτων, γιατί είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική. Μετρά την ικανότητα μιας ένωσης να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Τα αποτελέσματα συνήθως συγκρίνονται με την ικανότητα καταστροφής ενός γνωστού αντιοξειδωτικού[67].

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



Εικόνα 4: Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του χρώματος του αλκοολικού διαλύματος DPPH, από βαθύ ιώδες σε ανοιχτό κίτρινο. Η ικανότητα σάρωσης ριζών εκφράζεται μέσω του δείκτη IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration), που ορίζεται ως η δόση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για την ελάττωση κατά 50% της απορρόφησης του DPPH. Υψηλότερη τιμή IC<sub>50</sub> αντιστοιχεί σε χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.[68][69]

## **B.Πειραματικό Μέρος**

### **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Κλασσική εκχύλιση *U. lactuca***

#### **I. Σκοπός**

Σκοπός της διεξαγωγής των πειραμάτων, είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου κλασσικής εκχύλισης, μελετώντας την επίδραση των παραμέτρων του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας βιομάζας/διαλύτη στην ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων, στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και στην απόδοση της εκχύλισης, με τη χρήση του κλασσικού διαλύτη αιθανόλη/νερό(70:30 w/w), αιθανικού αιθυλεστέρα και των πράσινων διαλυτών DES. Η θερμοκρασία εκχύλισης διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C.

Οι συνθήκες οι οποίες εξετάστηκαν: :

- Διάρκεια εκχύλισης (h):6-10-12-16-24
- Αναλογία βιομάζας/διαλύτη (w/mL): 1/10-1/20-1/40

Σε κάθε εκχύλιση οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν:

- Οι βιοδραστικές ουσίες της ulva (χλωροφύλλη, β-καροτένιο, λουτεΐνη, ασταξανθίνη)
- Η αντιοξειδωτική της δράση με DPPH
- Τα φαινολικά

Οι χρόνοι εκχύλισης που εξετάστηκαν ήταν 6 h, 10h, 12h, 16h και 24h.

#### **II. Όργανα και αντιδραστήρια**

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

<b>Εργαστηριακό όργανο/συσκευή</b>
Ζυγός ακρίβειας
Αναδευτήρας τύπου Vortex



Λουτρό υπερήχων(Ultrasound)
Φυγόκεντρος
Φασματόμετρο UV-Vis
Ψυκτήρας Απόσταξης με Σπειροειδή Σωλήνα
Περιστροφικός εξατμιστήρας
Ογκομετρικοί σωλήνες(10 ml, 50 ml, 100ml)
Ποτήρια ζέσεως( 10 ml,50 ml)
Σφαιρική ογκομετρική φιάλη(100ml)
Κυψελίδες χαλαζία
Εργαστηριακός φούρνος ξήρανσης και αποστείρωσης
Ψυκτικό εργαστηρίου χαμηλής θερμοκρασίας
Αυτόματη πιπέτα(100μl-1000μl)
Μαγνητικός αναδευτήρας

**Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος**

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Μοριακός Τύπος</b>
Απιονισμένο νερό	H <sub>2</sub> O
DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Folin–Ciocalteu	-
Αιθανόλη	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Μεθανόλη	CH <sub>3</sub> OH
Ανθρακικό νάτριο	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

## 5.1 Πειραματική Διαδικασία

Η κλασσική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού υάλινου σκεύους διπλού τοιχώματος ώστε να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία εκχύλισης με χρήση εργαστηριακού θερμοστατούμενου λουτρού με ανακυκλοφορία.

Η επιλογή του διαλύτη έγινε με βάση τη βιβλιογραφία αλλά και μέσα από πειραματικές μελέτες στο εργαστήριο. Προτεινόμενοι διαλύτες για την καλύτερη απόδοση της θερμοκρασίας ήταν κυρίως το εξάνιο, η μεθανόλη, η αιθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate).[24]

Μετά το πέρας των εκχυλίσεων, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την μέθοδο MAE για τον προσδιορισμό των τιμών των εξαρτημένων μεταβλητών που μελετήθηκαν.

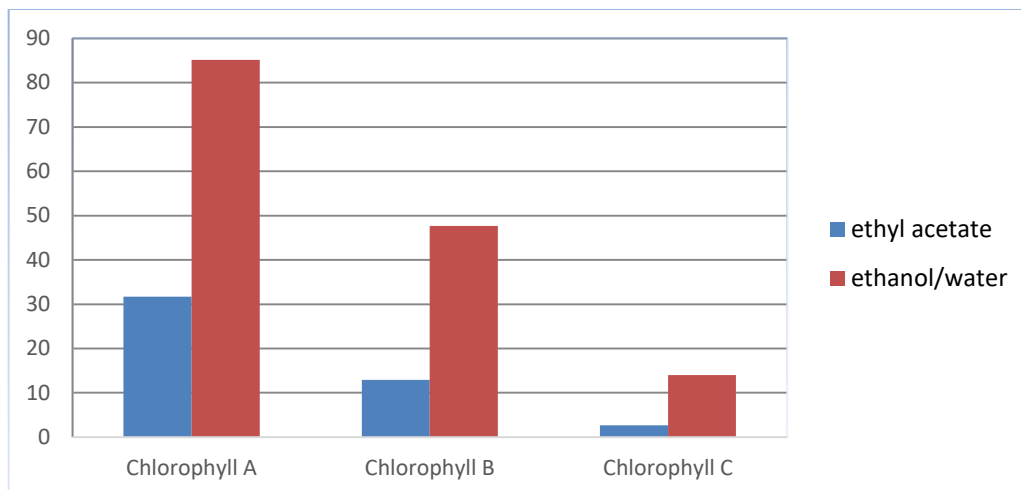
## 5.2 Σύγκριση διαλυτών για κλασσική εκχύλιση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη επιλογής του βέλτιστου διαλύτη. Οι διαλύτες που εξετάστηκαν ήταν το μίγμα αιθανόλη-νερό (70/30 w/w) και αιθανικός αιθυλεστέρας. Οι εκχυλίσεις έγιναν σε θερμοκρασία 30 °C και η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 12h.

### 5.2.1 Συγκέντρωση χλωροφύλλης A, B, Γ

Πίνακας 3: Συγκέντρωση χλωροφύλλης A, B, Γ για κάθε διαλύτη

	Χλωροφύλλη A C μg/L	Χλωροφύλλη B C μg/L	Χλωροφύλλη Γ C μg/L
αιθανόλη-νερό	85,17	47,67	14,04
Αιθανικός αιθυλεστέρας	31,73	12,95	2,69

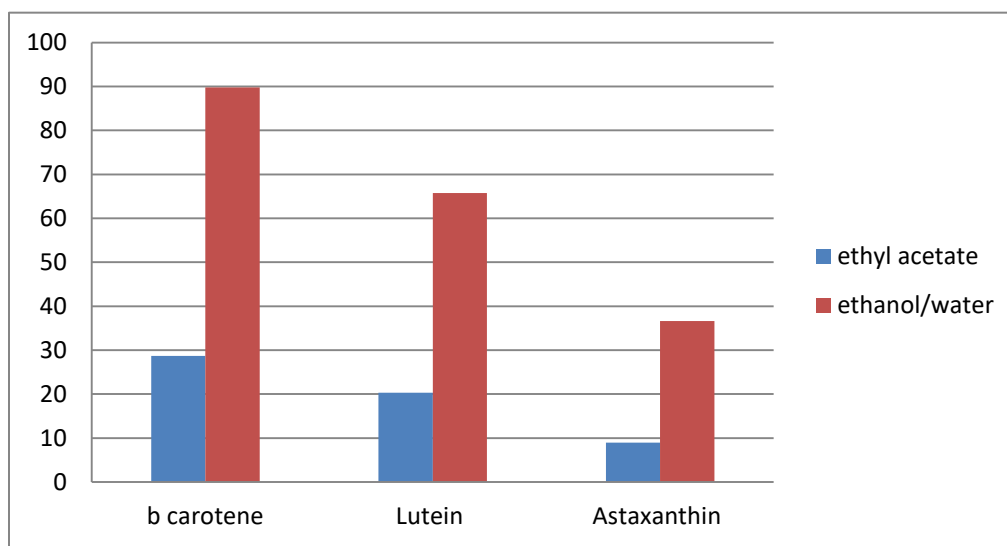


Διάγραμμα 1: Συγκέντρωση χλωροφύλλης Α, Β, Γ για κάθε διαλύτη

## 5.2.2 Συγκεντρώσεις καροτενοειδών

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών για κάθε διαλύτη

	b carotene C μg/L	Lutein C μg/L	Astaxanthin C μg/L
αιθανόλη-νερό	89,77	65,76	36,62
Αιθανικός αιθυλεστέρας	28,73	20,35	8,95

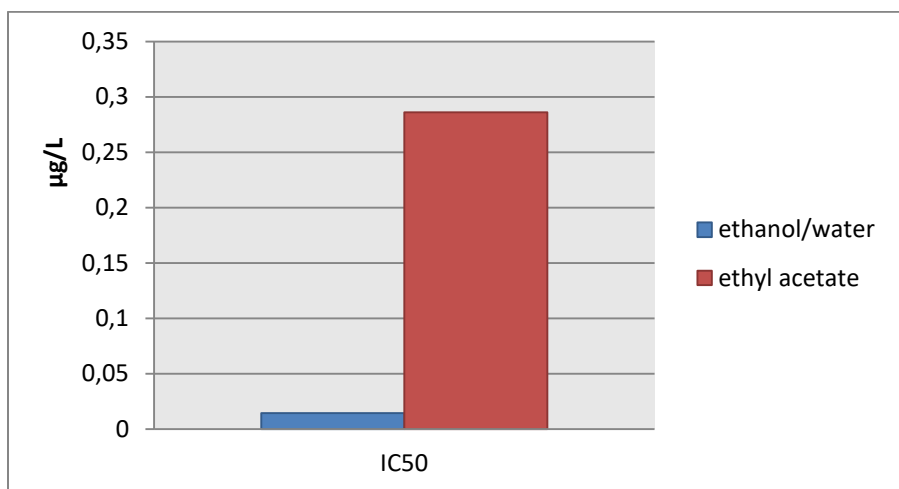


Διάγραμμα 2: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών για κάθε διαλύτη

### 5.2.3 Αντιοξειδωτική δράση

Πίνακας 5: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε διαλύτη

	IC50(μg/L)
αιθανόλη-νερό	0,014
Αιθανικός αιθυλεστέρας	0,28

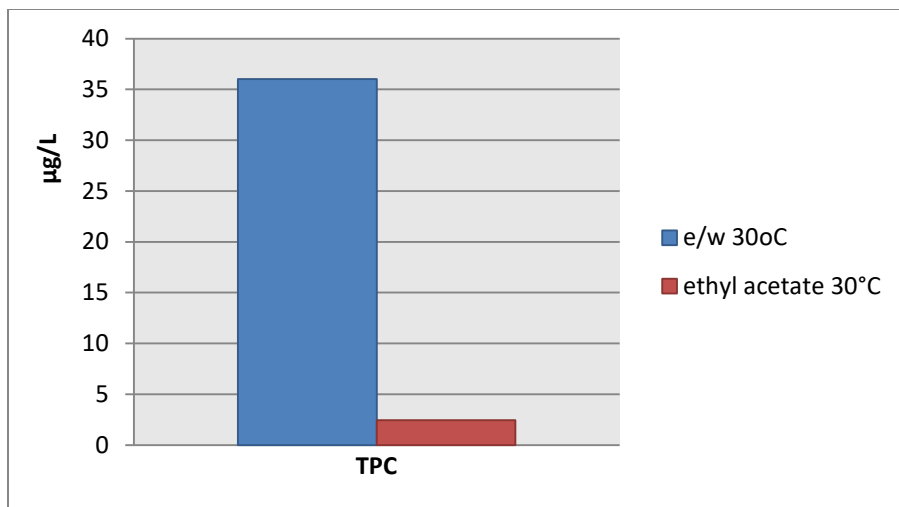


Διάγραμμα 3: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε διαλύτη

### 5.2.4 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών TPC για κάθε διαλύτη

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών για κάθε διαλύτη

	TPC(μg/L)
αιθανόλη-νερό	36,02
Αιθανικός αιθυλεστέρας	2,45

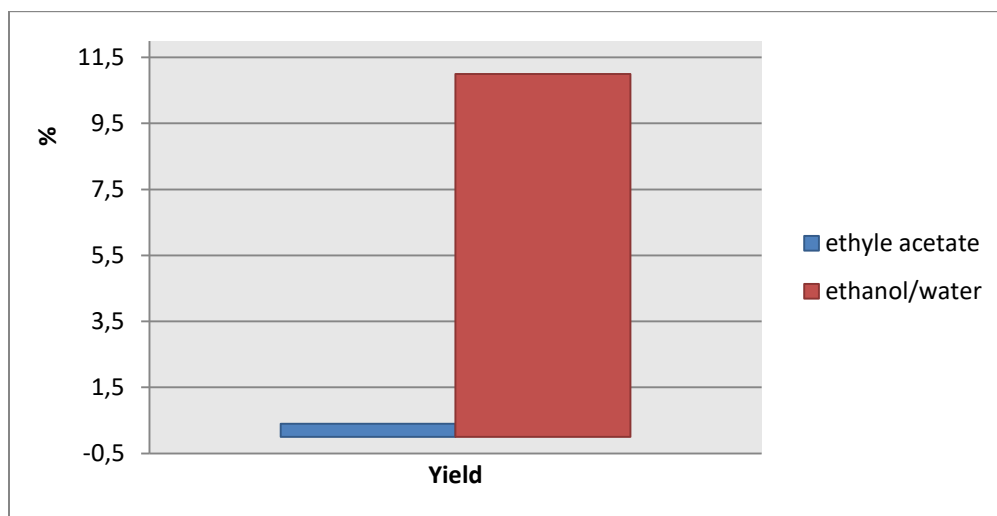


Διάγραμμα 4: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών για κάθε διαλύτη

### 5.2.5 Απόδοση εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη

Πίνακας 7: Απόδοση εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη

	Απόδοση(%)
αιθανόλη-νερό 30°C	11
Αιθανικός αιθυλεστέρας 30°C	0,4



Διάγραμμα 5: Απόδοση εκχυλίσεων για κάθε διαλύτη

### 5.3.6 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Οι πιο πάνω επιπλέον μετρήσεις αποδεικνύουν ότι, ο πλέον ιδανικός διαλύτης για την εκχύλιση της *U. lactuca* είναι το μίγμα αιθανόλη-νερό (70/30 w/w). Επομένως, οι εκχυλίσεις για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου της κλασσικής εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν με διαλύτη αιθανόλη νερό (70/30 w/w).

### 5.3 Πειραματικά Αποτελέσματα κλασσική εκχύλισης με αιθανόλη-νερό

### 5.3.1 Σύγκριση χρόνου εκχύλισης

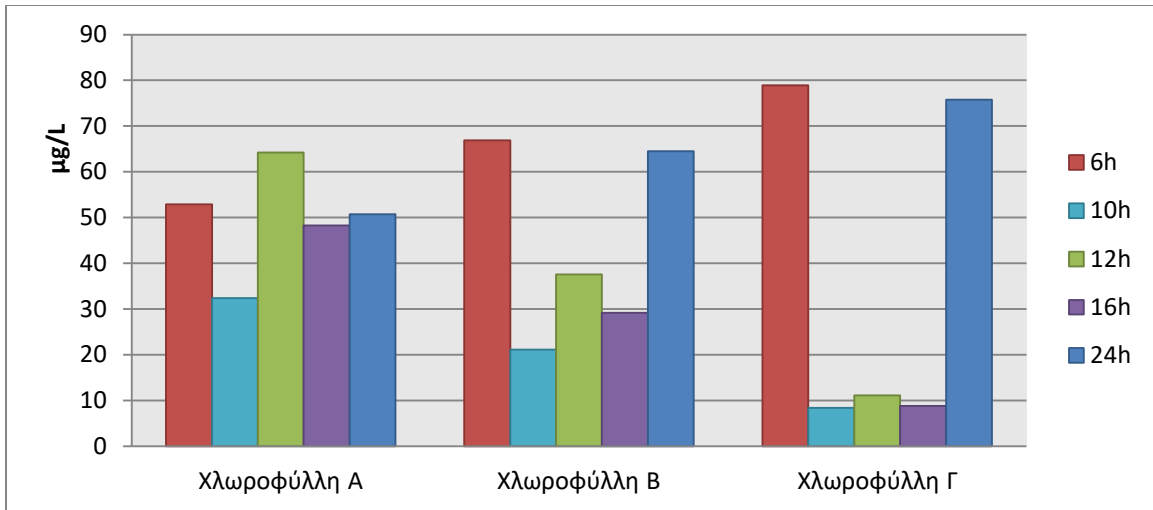
Σταθερές συνθήκες :

- Θερμοκρασία: 25 °C,
- διαλύτη αιθανόλη-νερό (70-30w/w)
- αναλογία 1/10 (υίνα/διαλύτης, 10 g υίνα και 100ml διαλύτη).

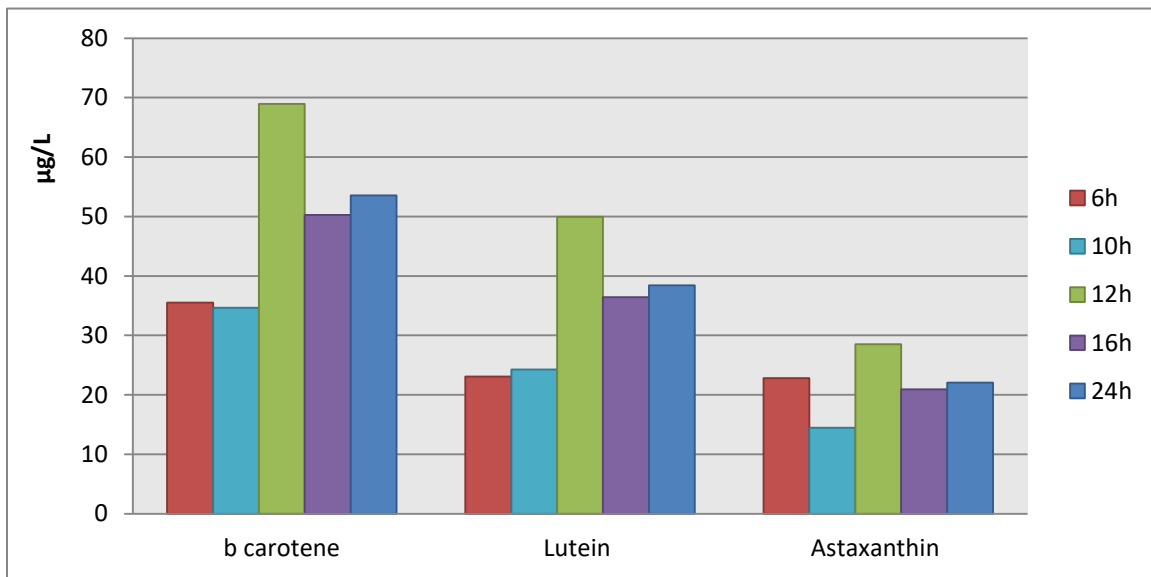
### 5.3.2 Βιοδραστικές ουσίες συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

Πίνακας 8: Βιοδραστικές ουσίες συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

	Χλωρο φύλλη Α C μg/L	Χλωρο φύλλη Β C μg/L	Χλωρο φύλλη Γ C μg/L	Ολικά Καροτενοειδή C μg/L	b carotene C μg/L	Lutein C μg/L	Astaxanthin C μg/L
ethanol/water 25 °C 6h	52,86	66,87	78,92	31,76	35,49	23,09	22,80
ethanol/water 25° C 10h	32,17	13,94	74,30	7,52	34,63	24,28	14,48
ethanol/water 25 °C 12h	64,24	37,57	11,09	33,36	68,92	49,92	28,50
ethanol/water 25 °C 16h	48,29	29,15	8,79	24,47	50,24	36,40	20,90
ethanol/water 25° C 24h	50,69	64,49	75,76	30,33	53,57	38,42	22,048



Διάγραμμα 6: Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης Α, Β, Γ συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης



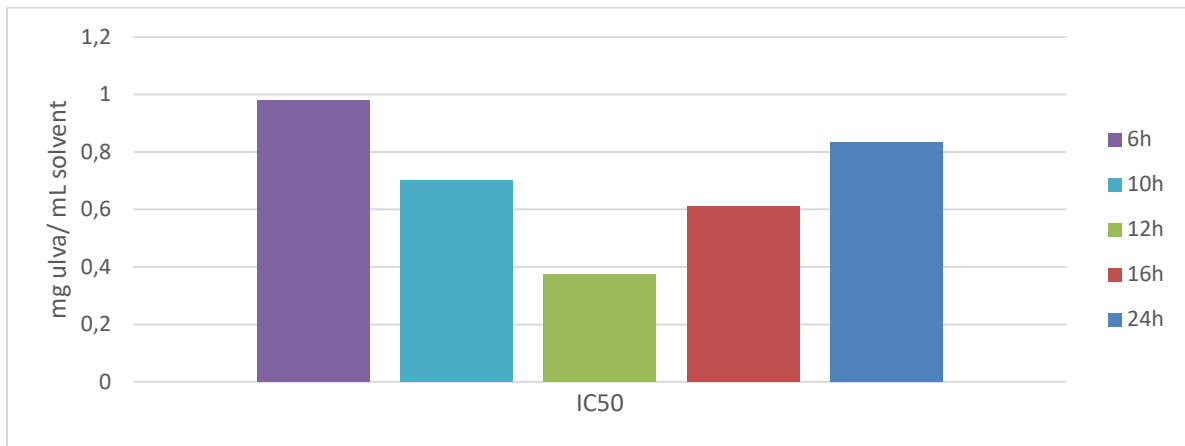
Διάγραμμα 7: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών συναρτήσει χρόνου εκχύλισης



### 5.3.3 Αντιοξειδωτική δράση συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

Πίνακας 9: Αντιοξειδωτική δράση συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

	IC50 (mg ulva/ml solvent)
ethanol/water 25 °C 6h	0,98
ethanol/water 25° C 10h	0,70
ethanol/water 25 °C 12h	0,37
ethanol/water 25 °C 16h	0,61
ethanol/water 25 °C 24h	0,83

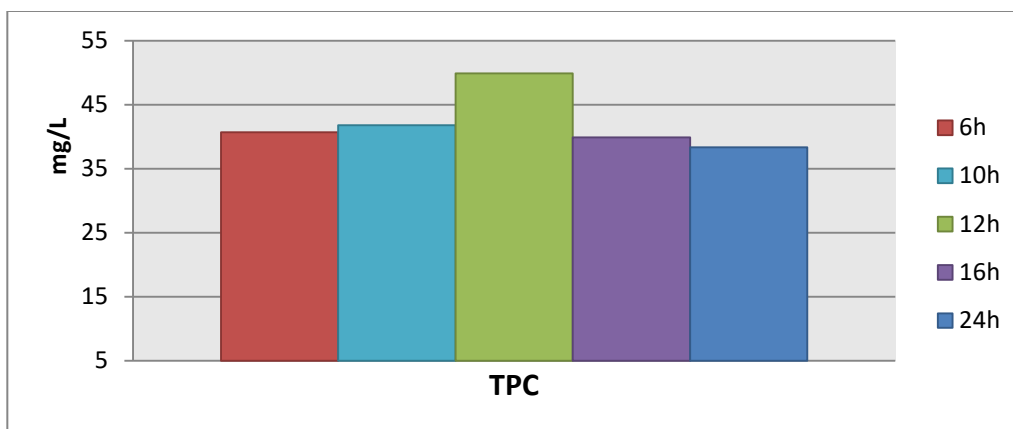


Διάγραμμα 8: Αντιοξειδωτική δράση συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

### 5.3.4 Ολικά Φαινολικά (TPC) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις Ολικών Φαινολικών (TPC) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

	Total Phenolics mg/L
ethanol/water 25°C 6h	40,68
ethanol/water 25°C 10h	41,79
ethanol/water 25°C 12h	49,87
ethanol/water 25°C 16h	39,87
ethanol/water 25°C 24h	38,34



Διάγραμμα 9: Συγκεντρώσεις Ολικών Φαινολικών (TPC) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης

### 5.3.5 Συζήτηση

Συμπερασματικά, όσον αφορά στις κύριες παραμέτρους στις οποίες δίνεται έμφαση (TPC, IC50 και β-καροτένιο), η 12h εκχύλισης φαίνεται να είναι ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης του μακροφύκου *U. lactuca*.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, έδωσε έμφαση στις τρεις αυτές παραμέτρους, λόγω του ότι αρχικά οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την υψηλή αντιοξειδωτική τους δράση, έχει αποδειχθεί ότι βρίσκονται σε διάφορα είδη φυκών της θάλασσας, όπως *U. lactuca* και εφόσον ανακτηθούν, είναι δυνατόν να αξιοποιηθούν εμπορικά, δεδομένου του ότι χρησιμοποιούνται σε πολύ σημαντικούς τομείς όπως στην προστασία της υγείας του ανθρώπου (προστασία από τον διαβήτη, τον καρκίνο, κλπ).[55][58]. Το β-καροτένιο είναι επίσης μια ουσία με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι ανάλογη της βιταμίνης C και E και προστατεύει το εσωτερικό των φυτών, από τις ελεύθερες ρίζες, που σχηματίζονται όταν αυτά εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία. Χωρίς την ύπαρξή τους τα φυτά θα καταστρέφονταν λίγο μετά την ανατολή του ηλίου. Το μακρόφυκος *U. lactuca* αποτελεί πλούσια πηγή καροτενοειδών.[37][80][84] Το ενδιαφέρον της μελέτης εστιάστηκε στο φύκος *U. lactuca*, το οποίο αποτελεί πλούσια πηγή σε φυσικά αντιοξειδωτικά, που μπορούν να συμβάλλει στον έλεγχο της εξέλιξης ορισμένων τύπων καρκίνου στον άνθρωπο.[23][24][25]

Μεγαλύτερη συγκέντρωση καροτενοειδών παρατηρείται σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης.

Μια μελέτη των *Eismann, Alejandra Irina, et al 2020* είχε σκοπό τη μελέτη διάφορων τύπων Ulna και την απόδοση τους σε χρωστικές ουσίες και καροτενοειδή υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και επεξεργασίας της βιομάζας. Οι περισσότερες μελέτες έγιναν σε χρόνους εκχύλισης 12 h, 14 h, 16 h και 24 h. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μελετήθηκαν και χρόνοι εκχύλισης 6 h. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν είναι ότι για τους τέσσερις μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης, προκύπτουν οι καλύτερες αποδόσεις στα καροτενοειδή και στις χρωστικές ουσίες.[79]

Σε ότι αφορά στα ολικά φαινολικά, και οι πέντε διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης που μελετήθηκαν παρουσίασαν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, με τη 12h να είναι σε υψηλότερο επίπεδο.

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, φαίνεται ότι καθώς αυξάνεται η διάρκεια εκχύλισης η τιμή του IC50 μειώνεται, ενώ μετά την 12ωρη εκχύλιση όπου προκύπτει η ελάχιστη τιμή, το IC50 αυξάνεται.

Συνεπώς, η 12ώρη εκχύλιση είναι η βέλτιστη διάρκεια εκχύλισης για την κλασσική μέθοδο εκχύλισης του μακροφύκους *U. lactuca*.

Ωστόσο, για πρακτικούς λόγους πρόσβασης στο εργαστήριο, για την εύρεση της καλύτερης αναλογίας βιομάζας/διαλύτη, οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με διάρκεια εκχύλισης 16 h, δηλαδή τον αμέσως επόμενο καλύτερο χρόνο εκχύλισης.

#### **5.4 Σύγκριση αναλογίας βιομάζας/διαλύτη (w/w)**

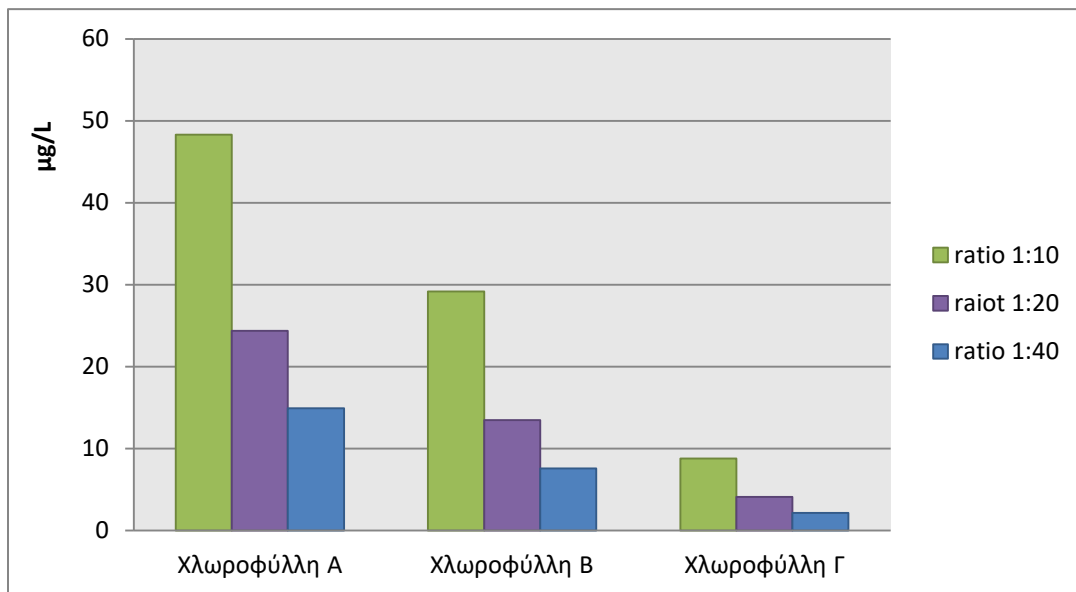
Σταθερές συνθήκες :

- Θερμοκρασία: 25° C,
- διαλύτη αιθανόλη-νερό (70-30 w/w)
- Διάρκεια εκχύλισης, 16 h

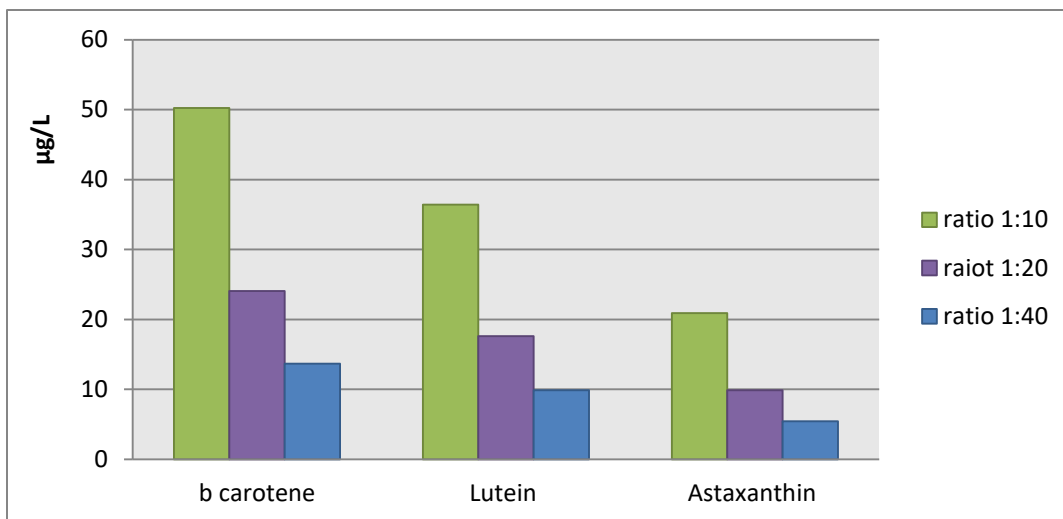
### 5.4.1 Βιοδραστικές ουσίες

Πίνακας 11: Βιοδραστικές ουσίες για κάθε αναλογία βιομάζα/διαλύτη

	Χλωροφύλλη Α C μg/L	Χλωροφύλλη Β C μg/L	Χλωροφύλλη Γ C μg/L	Ολικά Καροτενοειδή C μg/L	b carotene C μg/L	Lutein C μg/L	Astaxanthin C μg/L
ratio 1:10	48,29	29,15	8,79	24,47	50,24	36,41	20,90
ratio 1:20	24,36	13,47	4,11	11,47	24,05	17,60	9,89
ratio 1:40	14,89	7,57	2,15	6,34	13,67	9,85	5,43



Διάγραμμα 10: Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης Α, Β, Γ για κάθε αναλογία βιομάζα/διαλύτη

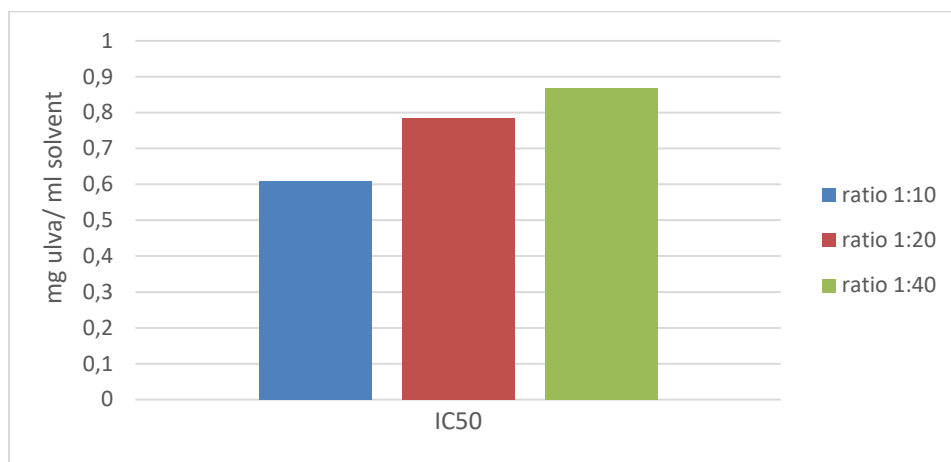


Διάγραμμα 11: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

#### 5.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Πίνακας 12: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

	IC50 (mg ulva/ml solvent)
ratio 1:10	0,61
ratio 1:20	0,78
ratio 1:40	0,87

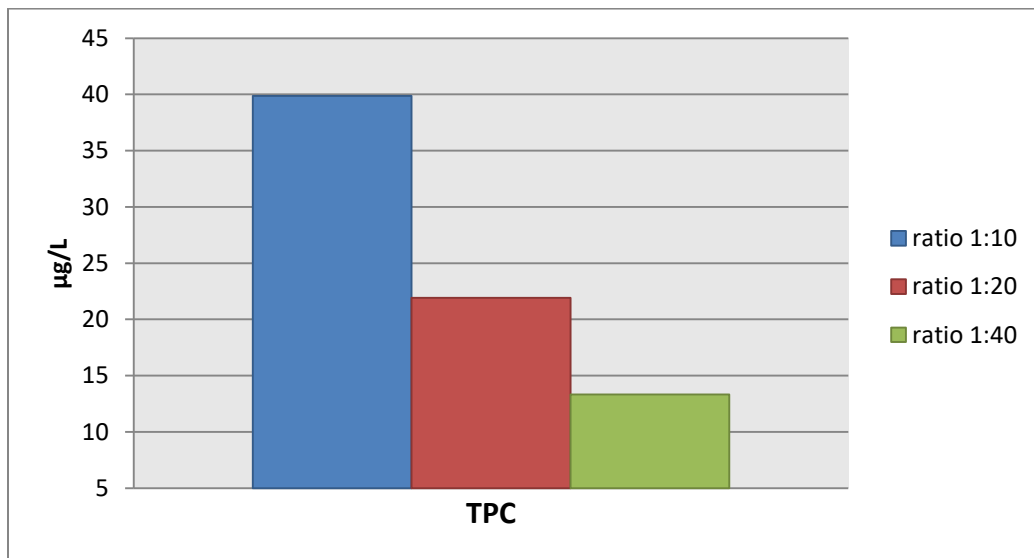


Διάγραμμα 12: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

### 5.4.3 Ολικά Φαινολικά (TPC) για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις Ολικών Φαινολικών (TPC) για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

	TPC mg/L
ratio 1:10	39,87
ratio 1:20	21,93
ratio 1:40	13,34



Διάγραμμα 13: Συγκεντρώσεις Ολικών Φαινολικών (TPC) για κάθε αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Αρχικά, Επισημάνεται ότι, στις πιο πάνω μετρήσεις εξετάστηκε και η επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Και στη σύγκριση διάρκειας εκχύλισης αλλά και στη σύγκριση αναλογίας βιομάζας/διαλύτη, τα πειράματα έχουν επαναληφθεί και αφού, οι τιμές προέκυψαν παραπλήσιες, βγήκε ο μέσος όρος τους ο οποίος παρουσιάζεται παραπάνω

#### 5.4.4 Συζήτηση

Η αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1/10 (w/w), φαίνεται να έχει καλύτερη απόδοση σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Μια μελέτη με σκοπό την επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη για την εξαγωγή λαδιού από το είδος φυκών *Euglena sanguinea*, μελέτησε την επίδραση σε ένα ευρύ φάσμα αναλογίας μίγματος διαλύτη προς ξηρή βιομάζα (v/w) από 5:1 έως 15:1 (v/w). Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι ο λόγος μεθανόλης προς ξηρή βιομάζα 11: 1 (v/w) έλαβε το υψηλότερο ποσοστό % απόδοσης της εκχύλισης.[76]

Επίσης, σε έρευνα του ο *Tunvikene, R et al 2006*, όπου μελέτησε την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από κόκκινα φύκια, προτείνει αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1:20 w/v.[91]

### 5.5 Σύγκριση Πράσινων διαλυτών DES

#### I. Σκοπός

Η μελέτη επτά διαφορετικών DES στην ανάκτηση ολικών καροτενοειδών και ολικών φαινολικών, καθώς και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

#### 5.5.1 Πειραματική Διαδικασία

Για τη μελέτη των διαλυτών DES, οι οποίοι παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε κλασική εκχύλιση σε σταθερές παραμέτρους, ίδιους και για τους εφτά, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση μεταξύ τους και να οδηγηθούμε στην επιλογή του καλύτερου εξ' αυτών. Επίσης, για την χρήση των συγκεκριμένων διαλυτών, πριν την εκχύλιση τους, προστέθηκε 30% H<sub>2</sub>O αναλογία w/w. σε Η μελέτη επτά

διαφορετικών DES στην ανάκτηση ολικών καροτενοειδών και ολικών φαινολικών, καθώς και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

Οι παράμετροι ήταν:

- Σταθερή θερμοκρασία, 60 °C
- Διάρκεια εκχύλισης, 3 h
- Αναλογία βιομάζας/διαλύτη, 1:10 (w/v)

Οι διαλύτες DES, που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν είναι: choline chloride/urea 1:2, choline chloride/ethylene glycol 1:4, choline chloride/citric 1:1, choline chloride/citric 1:2, choline chloride/glycerol 1:2, choline chloride/butanediol 1:2, choline chloride/ethylene glycol 1:2

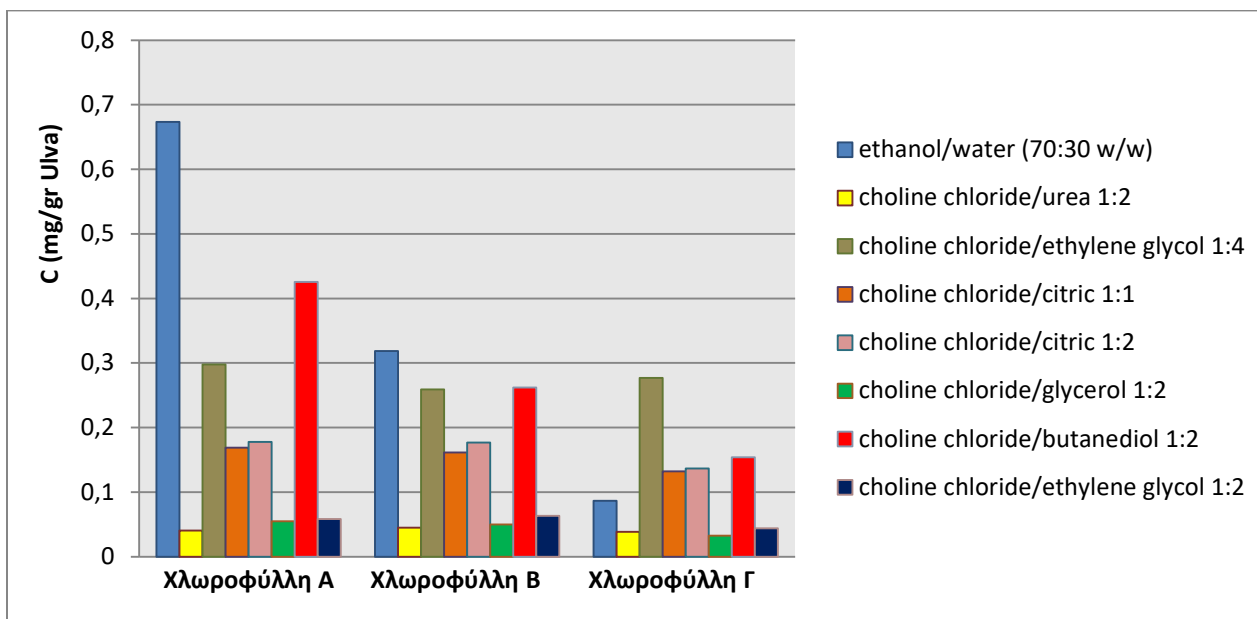
## 5.5.2 Πειραματικά Αποτελέσματα-Σύγκριση διαλυτών DES

### 5.5.3 Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης για κάθε εκχύλιση

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης A, B, Γ για κάθε εκχύλιση με DES

Διαλύτες	Χλωροφύλλη A C μg/gr Ulva	Χλωροφύλλη B C μg/gr Ulva	Χλωροφύλλη Γ C μg/gr Ulva
ethanol/water (70:30 w/w)	0,67	0,32	0,086
choline chloride/urea 1:2	0,041	0,045	0,039
choline chloride/ethylene glycol 1:4	0,298	0,26	0,28
choline chloride/citric 1:1	0,17	0,16	0,13
choline chloride/citric 1:2	0,18	0,18	0,14
choline chloride/glycerol 1:2	0,055	0,049	0,032
choline chloride/butanediol 1:2	0,42	0,26	0,15
choline chloride/ethylene glycol 1:2	0,058	0,063	0,044



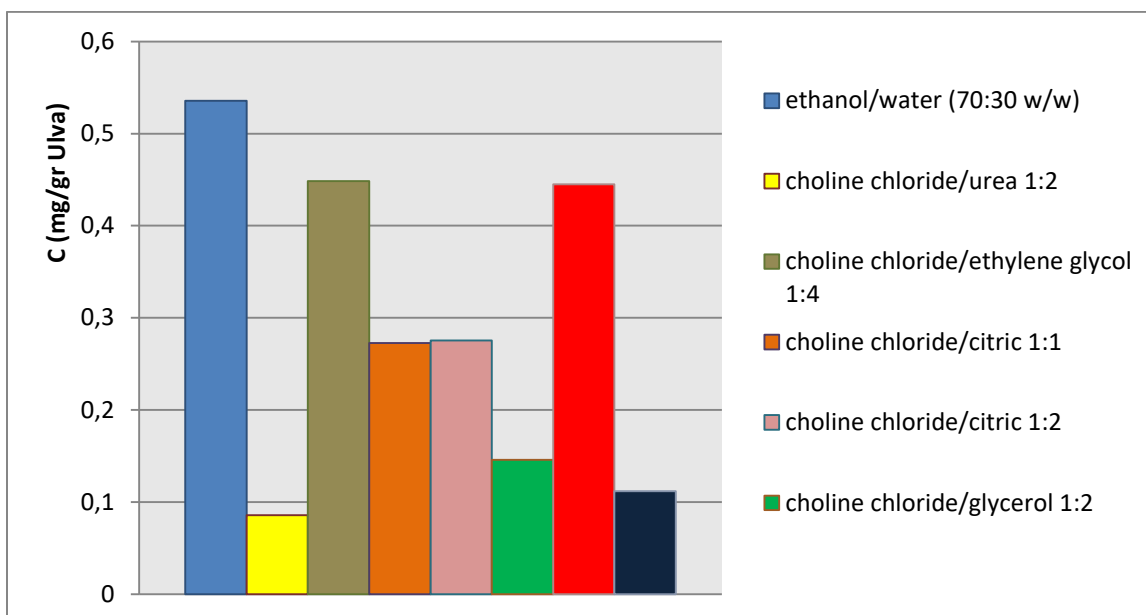


Διάγραμμα 14: Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης για κάθε εκχύλιση με DES

#### 5.5.4 Συγκεντρώσεις ολικών καροτενοειδών για κάθε εκχύλιση με DES

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών για κάθε εκχύλιση με DES

Διαλύτες	Ολικά καροτενοειδή C μg/gr Ulva
ethanol/water (70:30 w/w)	0,53
choline chloride/urea 1:2	0,086
choline chloride/ethylene glycol 1:4	0,45
choline chloride/citric 1:1	0,27
choline chloride/citric 1:2	0,28
choline chloride/glycerol 1:2	0,15
choline chloride/butanediol 1:2	0,44
choline chloride/ethylene glycol 1:2	0,11

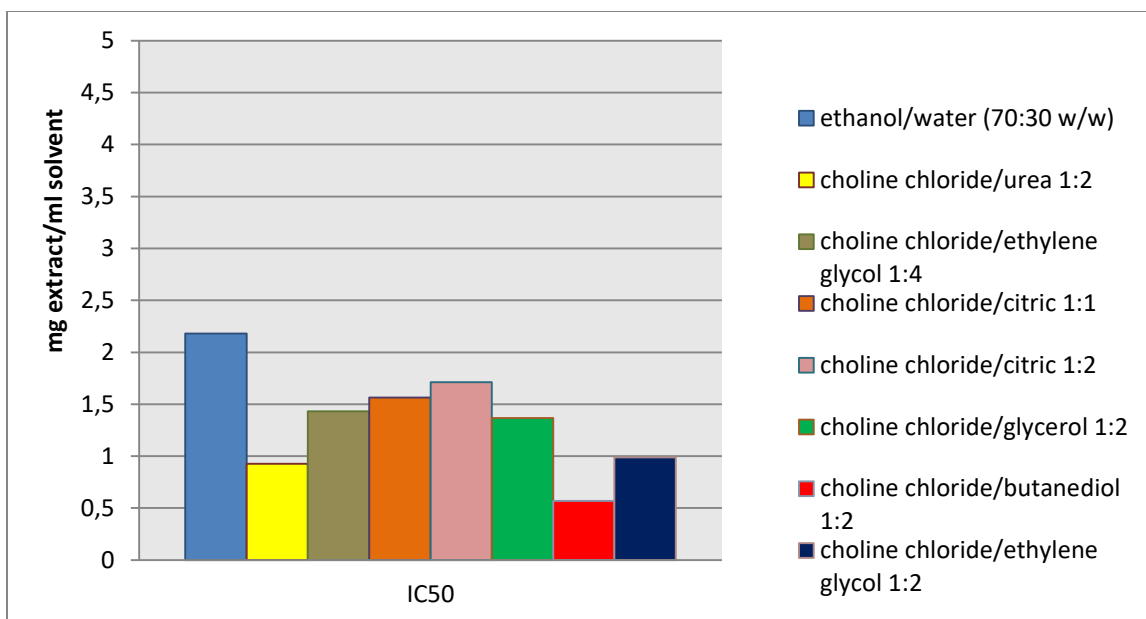


Διάγραμμα 15: Συγκεντρώσεις καροτενοειδών για κάθε εκχύλιση με DES

### 5.5.5 Αντιοξειδωτική δράση για κάθε εκχύλιση με DES

Πίνακας 16: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε εκχύλιση με DES

Διαλύτες	IC50 mg extract/ml solvent
ethanol/water (70:30 w/w)	2,18
choline chloride/urea 1:2	0,93
choline chloride/ethylene glycol 1:4	1,43
choline chloride/citric 1:1	1,57
choline chloride/citric 1:2	1,71
choline chloride/glycerol 1:2	1,37
choline chloride/butanediol 1:2	0,57
choline chloride/ethylene glycol 1:2	0,99

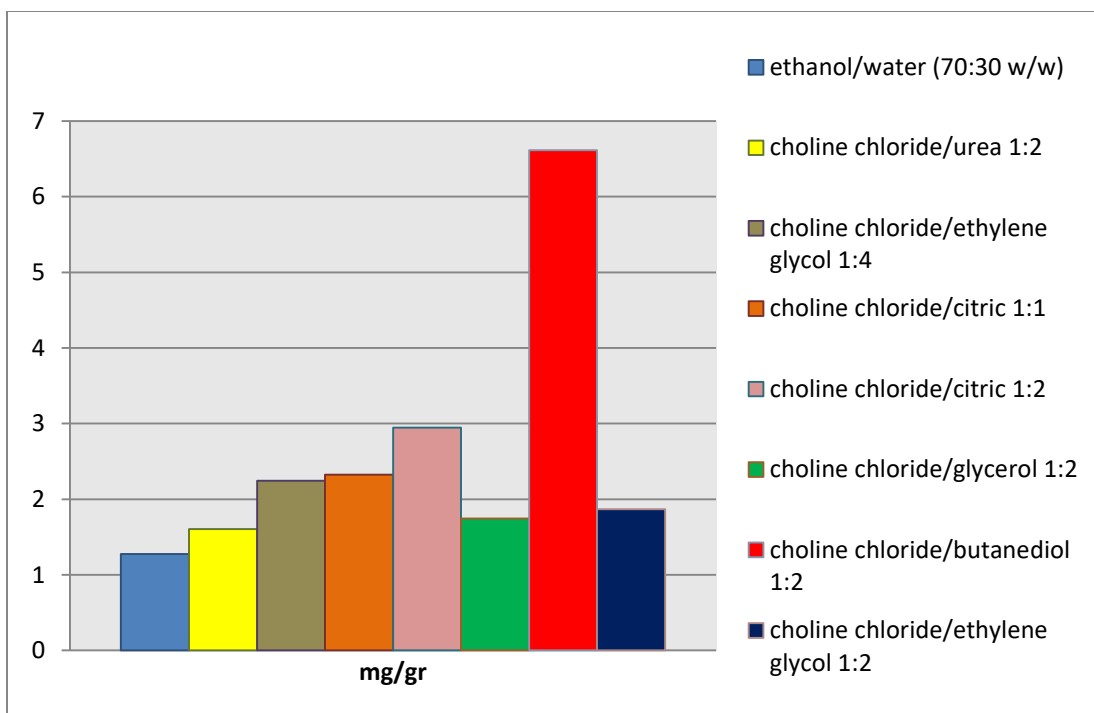


Διάγραμμα 16: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε εκχύλιση με DES

### 5.5.6 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών (TPC) για κάθε εκχύλιση με DES

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών(TPC) για κάθε εκχύλιση με DES

Διαλύτες	Ολικά φαινολικά(TPC) C μg/gr Uiva
ethanol/water (70:30 w/w)	1,27
choline chloride/urea 1:2	1,6
choline chloride/ethylene glycol 1:4	2,24
choline chloride/citric 1:1	2,32
choline chloride/citric 1:2	2,95
choline chloride/glycerol 1:2	1,74
choline chloride/butanediol 1:2	6,61
choline chloride/ethylene glycol 1:2	1,87



Διάγραμμα 17: Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών(TPC) για κάθε εκχύλιση με DES

### 5.5.7 Συζήτηση

Από τις πιο πάνω πειραματικές μετρήσεις, συμπεραίνεται ότι, ο διαλύτης DES Choline chloride/ butanediol 1:2 έχει τη βέλτιστη απόδοση στις παραμέτρους, οι οποίες εξετάζονται.

Επίσης, έχει μελετηθεί βιβλιογραφικά η ανάκτηση β-καροτένιου σε συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC) μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού γαλακτώματος, χρησιμοποιώντας διαλύτες βαθιού ευτικτικού (DES) ως διαλύτες. Τα 4 σκευάσματα των DES, που χρησιμοποιήθηκαν είχαν βάση μίγματα χλωριούχου χολίνης με DES1 προπανοδιόλη: νερό(1:1:1), DES2 γλυκόζη: νερό (5:2:5), DES3 γλυκερόλη (1:2) και DES4 βουτανοδιόλη(1:2).

Το συμπέρασμα της έρευνας του *Basar, Ahmet Ozan, et al 2020* ήταν ότι, το DES που περιέχει χλωριούχο χολίνη και βουτανοδιόλη (1:2) δημιούργησε σταθερά γαλακτώματα και ανακτήθηκε η υψηλότερη ποσότητα β-καροτενίου.[76]

Επίσης, μια ακόμη έρευνητική εργασία από τους οι *Zahrina, Ida, et al. 2018*, μελέτησε μια σειρά DES με διαφορετικές αναλογίες βουτανοδιόλης/ χλωριούχου χολίνης για να επιλέξει το καλύτερο DES του μίγματος βουτανοδιόλης και χλωριούχου χολίνης. Το συμπέρασμα ήταν ότι, η αναλογία βουτανοδιόλης/χλωριούχου χολίνης 6:1, είχε την μεγαλύτερη απόδοση σε φαινολικές ενώσεις αλλά και καροτενοειδή.[77]

Γενικότερα, ο DES choline chloride/butanediol, έχει παρατηρηθεί ότι έχει καλύτερες αποδόσεις στην ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών(καροτενοειδή και φαινολικές ουσίες) από βιομάζα σε υψηλότερες αναλογίες βουτανοδιόλης, κάτι που θα μπορούσε να αποτελέσει μελλοντικές πειραματικές μελέτες στο εργαστήριο.

Μια εξίσου σημαντική μελέτη, η οποία στόχος της ήταν η εξαγωγή βιοδραστικών ουσιών από βιομάζα (*Curcuma longa*), χρησιμοποίησε για την εκχύλιση βαθέως ευτικτικούς διαλύτες (DES) εκ των οποίων 3 εξ' αυτών είναι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική έρευνα: choline chloride/glycerol 1:2, choline chloride/ethylene glycol 1:1 και choline chloride/butanediol 1:3 [78]. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι, ο διαλύτης DES choline/βουτανοδιόλη) είχε τη καλύτερη απόδοση στα εκχυλίσματα κουρκουμα ανάκτηση διάφορων δραστικών και αντιοξειδωτικών ουσιών.

Ακόμα, οι *García, Aránzazu, et al. 2016*, στη δικής τους πειραματική έρευνα, μελετήθηκε η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από παρθένο ελαιόλαδο με βαθέους ευτικτικούς διαλύτες. Το πόρισμα της συγκεκριμένης βιβλιογραφικής μελέτης είναι ότι, γενικότερα οι διαλύτες DES, στην κλασική εκχύλιση, είναι πιο αποτελεσματικοί στην ανάκτηση φαινολικών ενώσεων από βιομάζα σε σχέση με το διαλύτη αλκόολη/νερό. Συμπέρασμα που θεωρείται να προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας [79]

## **Κεφάλαιο 6°: Εκχύλιση *U. lactuca* υποβοηθούμενη με μικροκύματα (microwave assisted extraction - MAE)**

### **I. Σκοπός**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (microwave assisted extraction - MAE), από το μικρόφυκος *U. lactuca*, με τη χρήση πράσινου διαλύτη, αιθανόλη-νερό (70:30 w/w). Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου μελετήθηκαν οι συνθήκες:

- Ισχύς(W): 300, 550, 800
- Αναλογία βιομάζας/διαλύτη(w/w): 1/10-1/25-1/40
- Θερμοκρασία(°C): 40, 50, 60
- Διάρκεια εκχύλισης(mins): 5, 17, 30

Οι παράμετροι, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήριο για εύρεση των καλύτερων συνθηκών ήταν η μέγιστη απόδοση (yield), ανάκτηση καροτενοειδών (TCC), ολικών φαινολικών (TPC) και η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (IC50). Για τη βελτιστοποίηση και την εύρεση των σημαντικών πειραματικών παραμέτρων της διεργασίας, διενεργήθηκε πειραματικός σχεδιασμός με τη χρήση της μεθόδου RSM (Response surface methodology).

### **II. Όργανα και αντιδραστήρια**

Στους παρακάτω δύο πίνακες παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών.

**Πίνακας 18: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος**

<b>Εργαστηριακό όργανο/συσκευή</b>
Ζυγός ακρίβειας
Μαγνητικός αναδευτήρας
Αναδευτήρας τύπου Vortex
Λουτρό υπερήχων(Ultrasound)
Φυγόκεντρος
Φασματόμετρο UV-Vis
Ψυκτήρας Απόσταξης με Σπειροειδή Σωλήνα
Συσκευή microwave assisted extraction
Περιστροφικός εξατμιστήρας
Ογκομετρικοί σωλήνες(10 ml, 50 ml, 100ml)
Ποτήρια ζέσεως( 10 ml,50 ml)
Σφαιρική ογκομετρική φιάλη(100ml)
Κυψελίδες χαλαζία
Εργαστηριακός φούρνος ξήρανσης και αποστείρωσης
Ψυκτικό εργαστηρίου χαμηλής θερμοκρασίας
Αυτόματη πιπέτα(10μl-1000μl)

**Πίνακας 19: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος**

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Μοριακός Τύπος</b>
Απιονισμένο νερό	H <sub>2</sub> O

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$
Folin–Ciocalteu	-
Αιθανόλη	$C_2H_6O$
Μεθανόλη	$CH_3OH$
Ανθρακικό νάτριο	$Na_2CO_3$

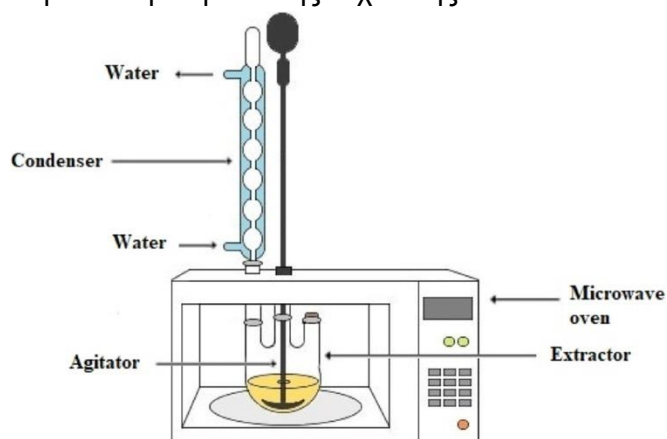
## 6.1 Πειραματική Διαδικασία

### 6.1.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (microwave assisted extraction - MAE)

Αρχικά, με τη χρήση της μεθόδου RSM, έγινε ο πειραματικός σχεδιασμός και πραγματοποιήθηκε μια σειρά εισαγωγικών πειραμάτων.

Αρχικά, παρασκευάζεται ο πράσινος διαλύτης αιθανόλη-νερό με αναλογία 70:30 w/w, που χρησιμοποιείται για τις εκχυλίσεις. Στη συνέχεια, ζυγίζεται η βιομάζα (*U. lactuca*), ανάλογα κάθε φορά με την αναλογία βιομάζας-διαλύτη, που εξετάζεται. Σε ένα ειδικό γυάλινο δοχείο διπλού τοιχώματος μεταφέρεται η βιομάζα και ο διαλύτης και προστίθεται μαγνήτης για να πραγματοποιηθεί η ανάδευση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

Ακολούθως, προετοιμάζεται η συσκευή μικροκυμάτων για την εκχύλιση. Με τη χρήση ενός ψυκτήρα και την ενεργοποίηση ενός ψυκτικού μέσου, η εκχύλιση πραγματοποιείται στην επιθυμητή θερμοκρασία. Αφού τοποθετηθεί, το δοχείο διπλού τοιχώματος με τη βιομάζα και τον διαλύτη, γίνεται η σύνδεση του με το



Εικόνα 4: Συσκευή μικροκυμάτων για εκχύλιση

ψυκτικό και το ψυκτήρα, έτσι ώστε να μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία εκχύλισης. Στην



οθόνη της συσκευής μικροκυμάτων, ρυθμίζονται οι συνθήκες (ισχύς, θερμοκρασία, διάρκεια εκχύλισης) και είναι έτοιμο για εκχύλιση.

Με την ολοκλήρωση της εκχύλισης, απομονώνεται το εκχύλισμα και μεταφέρεται σε φυγόκεντρο, για το διαχωρισμό στερεού (στο πυθμένα του σωληναρίου) και υγρού εκχυλίσματος. Τέλος, το υγρό εκχύλισμα είναι έτοιμο για την επεξεργασία των μετρήσεων.

### 6.1.2 Προσδιορισμός βιοδραστικών ενώσεων

Ο προσδιορισμός των ενώσεων, εξετάζεται αφού πραγματοποιηθεί αραίωση(y), έτσι ώστε οι μετρήσεις να βρίσκονται μέσα στις καμπύλες αναφοράς των πρότυπων ουσιών. Συνήθως η αραίωση ήταν 1:3(1 ml εκχυλίσματος σε 3 ml διαλύτη). Ακολούθως, μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και τέλος, φωτομετράται σε φασματόμετρο UV-Vis, σε διάφορα μήκη κύματος, έτσι ώστε να εξεταστεί η συγκέντρωση των ενώσεων που περιέχει το μακροφύκος. Τα ολικά καροτενοειδή φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 450 nm(x).

Εξίσωση 1: 
$$TCC = ((6,9691 * x) - 0,1286) * y$$

### 6.1.3 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών, TPC

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών, αρχικά, μεταφέρονται 7,9 ml απιονισμένου νερού και 0,1 ml εκχυλίσματος σε φιαλίδια. Τα φιαλίδια αυτά, περνούν από vortex έτσι ώστε να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Στη συνέχεια, προστίθεται 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu, περνούν ξανά από vortex και αφήνονται για 2 min. Τέλος, προστίθεται 1,5ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (το οποίο παρασκευάζεται από την προηγούμενη ημέρα) και το διάλυμα αφήνεται σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 30 min και ακολούθως φωτομετράται με UV-Vis. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για το τυφλό δείγμα με 8 ml απιονισμένου νερού, χωρίς τη πρόσθεση εκχυλίσματος.

Η φωτομέτρηση των ολικών φαινολικών γίνεται στα 765 nm, (x).

Οπτικά, η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ολικών φαινολικών φαίνεται από το μπλε του χρώματος του διαλύματος μετά τα 30 min, που βρίσκεται σε υδατόλουτρο. Όσο πιο έντονο μπλε χρώμα, τόσο υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών.

Εξίσωση 2: 
$$TPC = (641,58 * x) + 0,3677$$

#### 6.1.4 Προσδιορισμός απόδοσης της εκχύλισης

Η απόδοση εξετάζεται, αφού πραγματοποιηθούν οι πιο πάνω μετρήσεις. Το εκχύλισμα που απόμεινε μεταφέρεται στον εξατμιστήρα, έτσι ώστε να παραμείνει το ξηρό βάρος του εκχυλίσματός. Η απόδοση υπολογίζεται:

Εξίσωση 3: 
$$yield = \frac{\text{ξηρό βάρος του εκχυλίσματος}}{\text{αρχικό βάρος βιομάζας}} * 100 \%$$

#### 6.1.5 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με DPPH

Αρχικά, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, παρασκευάζεται ένα διάλυμα με DPPH, με 50ml μεθανόλη και 0,0015g DPPH και γίνεται ανάδευση. Το συγκεκριμένο διάλυμα τυλίγεται με ασημόχαρτο, λόγω του ότι είναι αρκετά φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται οι αραιώσεις:

1:0,1ml εκχυλίσματος+0ml διαλύτη

2:0,1ml εκχυλίσματος+0,1ml διαλύτη

4:0,1ml εκχυλίσματος+0,3ml διαλύτη

8 : 0,1ml εκχυλίσματος+0,7 ml διαλύτη

Ακολουθως, προστίθενται 3ml DPPH σε 0,1 ml κάθε ενός από τα παραπάνω διαλύματα, το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος και φωτομετράται 515 nm έπειτα από 20 min.

Σημειώνεται ότι, το εκχύλισμα που χρησιμοποιείται για την παραπάνω μέτρηση, είναι το ξηρό στο οποίο προστίθενται 10 ml μεθανόλης. Αυτό γίνεται γιατί, η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης επιθυμείται να γίνεται στο ξηρό εκχύλισμα, το οποίο θα διατίθενται προς χρήση στα διάφορα προϊόντα.

Οπτικά το διάλυμα DPPH, έχει ένα έντονο ιώδες χρώμα. Μετά τα 20 min, που βρίσκεται στο φωτόμετρο με το αραιωμένο εκχύλισμα, τα διαλύματα αποχρωματίζονται. Όσο πιο πολύ αποχρωματίζονται, τόσο πιο έντονη αντιοξειδωτική δράση έχει το εκχύλισμα.

## Πειραματικά Αποτελέσματα

Πίνακας 20: Πειραματικός σχεδιασμός πειραμάτων με τη χρήση της μεθόδου RSM(Response surface methodology).

	Power (W)	Ratio (w/w)	Temp (°C)	Time (min)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)	TCC (mg/ g Ulva)	TPC (mg/g Ulva)	YIELD (%)	CHLA (mg/g Ulva)
1	300	1/10	40	5	0,12	0,12	0,61	8,8	0,13
2	800	1/10	40	5	0,68	0,16	0,74	10,9	0,17
3	300	1/40	40	5	0,26	0,06	0,80	13,2	0,073
4	800	1/40	40	5	1,12	0,11	1,03	14	0,12
5	300	1/10	60	5	0,2	0,12	0,25	9	0,13
6	800	1/10	60	5	0,37	0,45	0,67	11	0,18
7	300	1/40	60	5	0,21	0,13	0,95	13,2	0,14
8	800	1/40	60	5	0,41	0,17	0,53	18,8	0,19
9	300	1/10	40	30	0,34	0,2	0,73	10,6	0,21
10	800	1/10	40	30	0,25	0,18	0,79	12	0,19
11	300	1/40	40	30	0,33	0,14	0,79	15,2	0,16
12	800	1/40	40	30	0,19	0,12	1,05	12,4	0,14
13	300	1/10	60	30	0,16	0,93	0,80	9,6	0,3
14	800	1/10	60	30	0,21	1,04	0,70	11,8	0,38
15	300	1/40	60	30	0,33	0,27	1,91	15,6	0,27
16	800	1/40	60	30	1,3	0,3	1,07	20,4	0,31
17	300	1/25	50	17,5	0,4	0,14	0,44	11,75	0,16
18	800	1/25	50	17,5	0,25	0,21	0,60	12,75	0,23
19	550	1/10	50	17,5	0,45	0,21	0,71	10,1	0,22
20	550	1/40	50	17,5	0,61	0,22	1,00	17,6	0,23
21	550	1/25	40	17,5	0,87	0,13	0,99	14,75	0,14
22	550	1/25	60	17,5	0,81	0,24	1,20	15,5	0,25
23	550	1/25	50	5	0,32	0,2	0,93	14	0,23
24	550	1/25	50	30	0,6	0,17	0,66	14,5	0,18
25	550	1/25	50	17,5	0,5	0,22	0,88	14,5	0,24
26	550	1/25	50	17,5	0,81	0,17	0,87	15,5	0,18
27	550	1/25	50	17,5	0,58	0,18	0,78	15,25	0,2

Στον Πίνακα 20 περιλαμβάνεται το σύνολο των εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο MAE. Ο πειραματικός σχεδιασμός έγινε με τη χρήση της μεθόδου RSM (Response surface methodology). Για την μελέτη των καλύτερων συνθηκών, ως προς την ισχύ, αναλογία βιομάζας/διαλύτη, θερμοκρασία και χρόνο εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια η μέγιστη απόδοση (yield), οι μέγιστη ανάκτηση ολικών καροτενοειδών (TCC) και φαινολικών (TPC) και η βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση (IC50).

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες επιπλέον εκχυλίσεις για τη καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων και ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

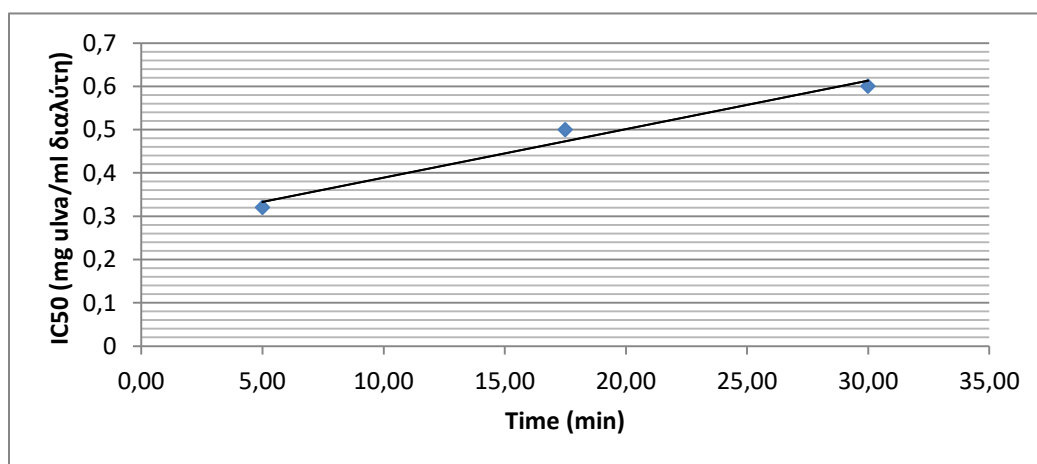
## 6.2 Αντιοξειδωτική δράση (IC50)

### 6.2.1 Σε σχέση με το χρόνο εκχύλιση

Σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w - 50°C.

Πίνακας 21: Εξάρτηση IC50 από το χρόνο εκχύλισης

Time (min)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
5	0,32
17	0,5
30	0,6



Διάγραμμα 46: Εξάρτηση IC50 από το χρόνο

Παρατηρείται μία γραμμική σχέση μεταξύ του χρόνου εκχύλισης και της αντιοξειδωτικής δράσης, για ισχύ 550W, θερμοκρασία 50°C και αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1/25 w/w. . Πιο συγκεκριμένα, σε πιο μικρό χρόνο διάρκειας εκχύλισης παρατηρείται μικρότερη τιμή

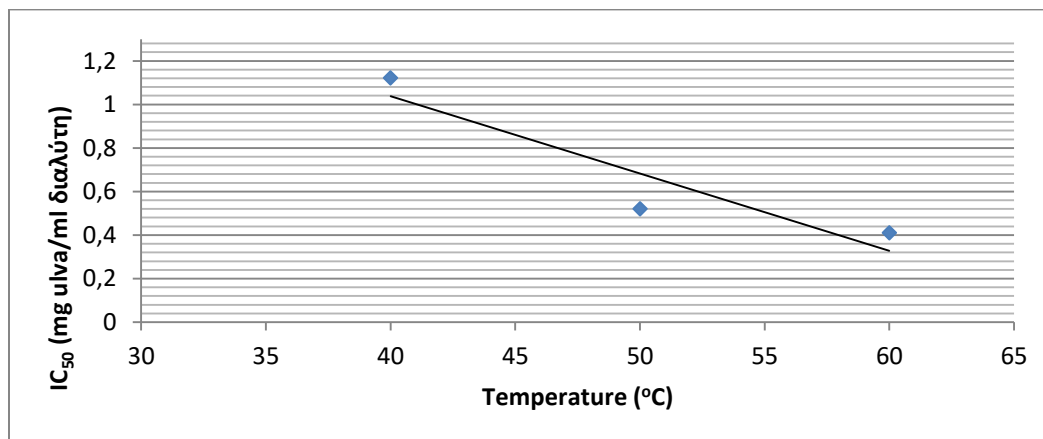
IC50, άρα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Συμπεραίνεται ότι ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης είναι τα 5 min.

## 6.2.2 Σε σχέση με τη θερμοκρασία εκχύλισης

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 800W – 1/40 w/w – 5 min.

Πίνακας 22: Εξάρτηση IC50 από τη θερμοκρασία εκχύλισης

Temperature (°C)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
40	1,12
50	0,52
60	0,41

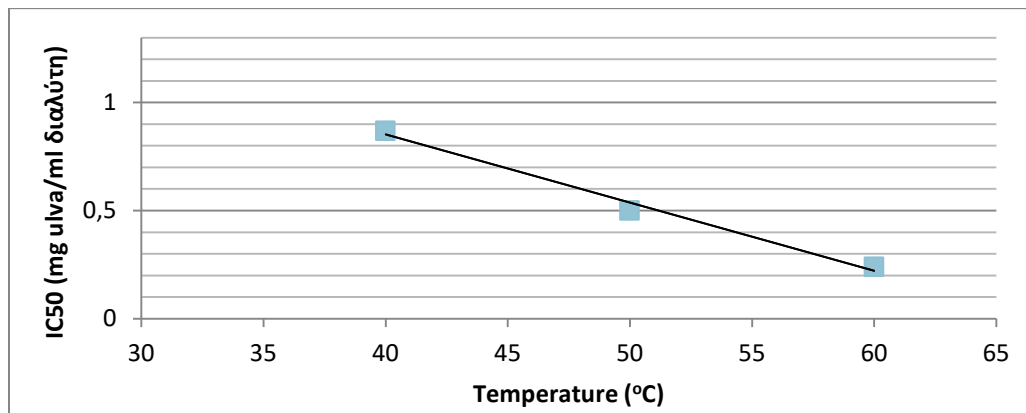


Διάγραμμα 18: Εξάρτηση IC50 από τη θερμοκρασία

2<sup>η</sup> σύγκριση (επαναληπτική) με σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w - 17 min.

Πίνακας 23: Εξάρτηση IC50 από τη θερμοκρασία

Temperature (°C)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
40	0,87
50	0,5
60	0,24



Διάγραμμα 19: Εξάρτηση IC50 από τη θερμοκρασία

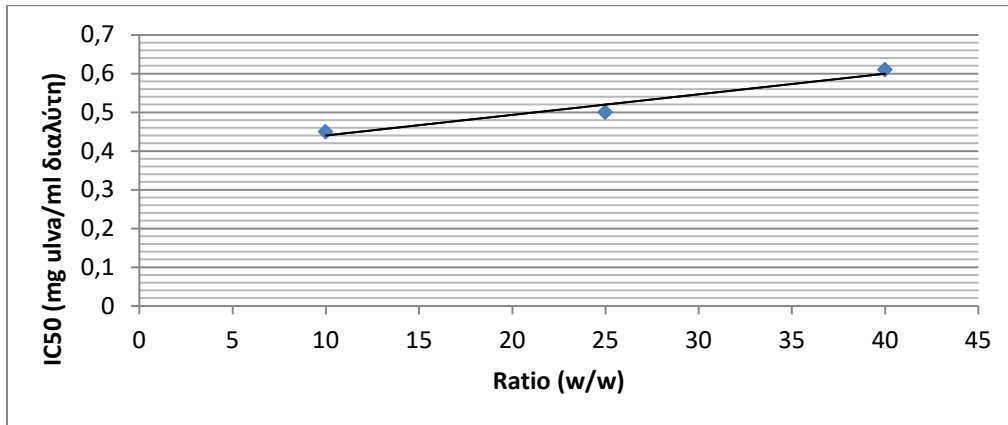
Στη πρώτη σύγκριση, παρατηρείται βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση στους 50°C και 60°C, χωρίς να υπάρχει καλή συσχέτιση, ενώ στην επαναληπτική παρατηρείται μια πιο ξεκάθαρη γραμμική σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του IC50, όπου όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, έχουμε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με αυτές η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 60°C. Παρά το γεγονός ότι οι εκχυλίσεις έγιναν σε διαφορετικές συνθήκες όπου στη μια περίπτωση έχουμε 800W – 1/40 w/w – 5 mins και στη δεύτερη 550W - 1/25 w/w - 17 min, προκύπτει το ίδιο συμπέρασμα.

### 6.2.3 Σε σχέση με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Σταθερές συνθήκες: 550W - 50°C - 17 min.

Πίνακας 24: Εξάρτηση IC50 από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Ratio (w/w)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
1/10	0,45
1/25	0,5
1/40	0,61



Διάγραμμα 20: Εξάρτηση IC50 από την αναλογία

Παρατηρείται, μια γραμμική σχέση μεταξύ αναλογίας βιομάζας/διαλύτη και του IC50, όπου σε μικρότερες αναλογίες, έχουμε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Άρα βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη θεωρείται η 1/10 w/w.

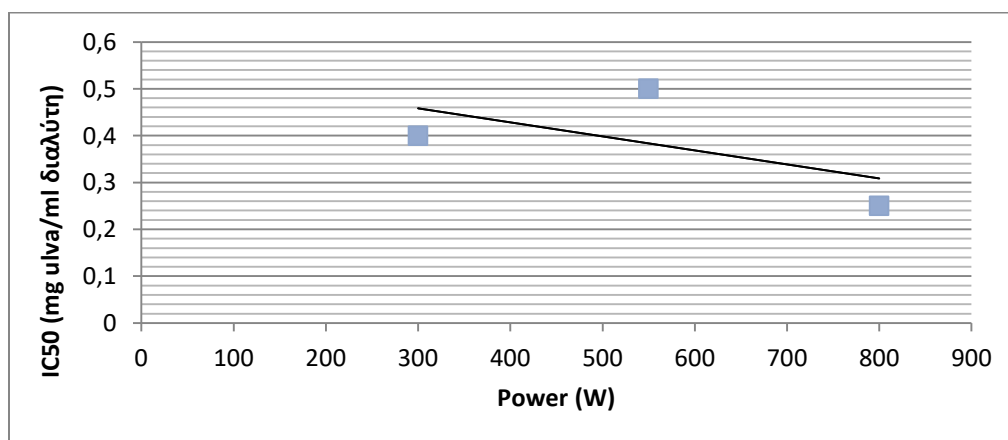


## 6.2.4 Σε σχέση με την ισχύ των μικροκυμάτων

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/25 w/w - 50°C - 17 min.

Πίνακας 25: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

Power (W)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
300	0,4
550	0,5
800	0,25

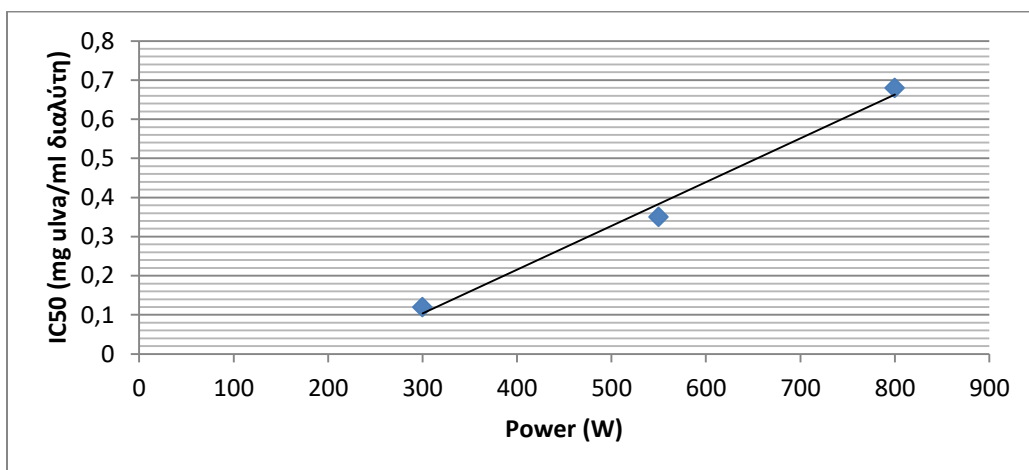


Διάγραμμα 21: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/10 w/w – 40 °C - 5 min.

Πίνακας 26: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

Power (W)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
300	0,12
550	0,35
800	0,68

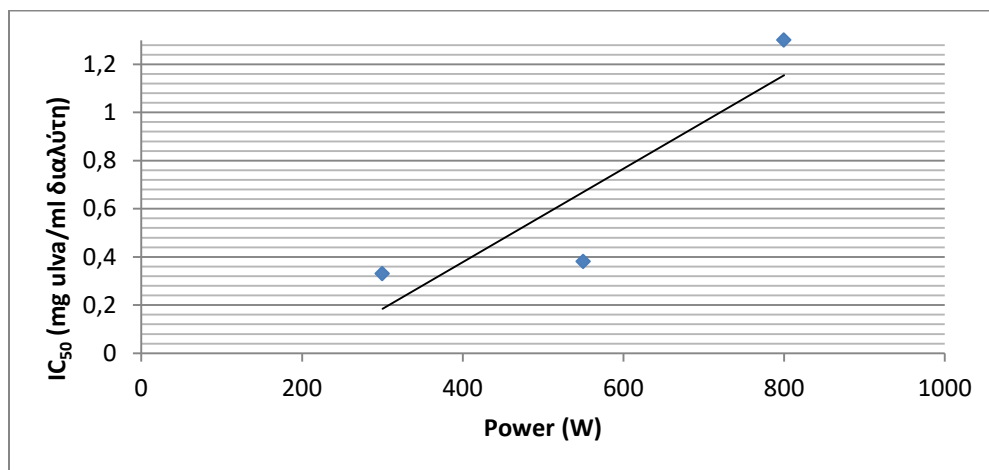


Διάγραμμα 22: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

3<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/40 w/w - 60°C -30 min.

Πίνακας 27: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

Power (W)	IC50 (mg Ulva/ml solvent)
300	0,33
550	0,38
800	1,3



Διάγραμμα 23: Εξάρτηση IC50 από την ισχύ

Στη πρώτη σύγκριση δεν φαίνεται μία καλή γραμμική σχέση. Σε αντίθεση, οι επόμενες δύο συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, δείχνουν ότι η μείωση της ισχύος έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του IC50 και επομένως ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Η δεύτερη σύγκριση δίνει μια πιο ξεκάθαρη σχέση μεταξύ ισχύος-IC50, η οποία θεωρείται ότι πραγματοποιείται στο βέλτιστο χρόνο εκχύλισης (5 min) και στη βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη (1/10 w/w). Άρα η βέλτιστη ισχύς θεωρείται 300W.

Συμπέρασμα: Καλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχουμε όταν η εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται στις συνθήκες: 5 min – 60 °C - 1/10 w/w -300 W.

### 6.3 Ολικά καροτενοειδή (TCC)

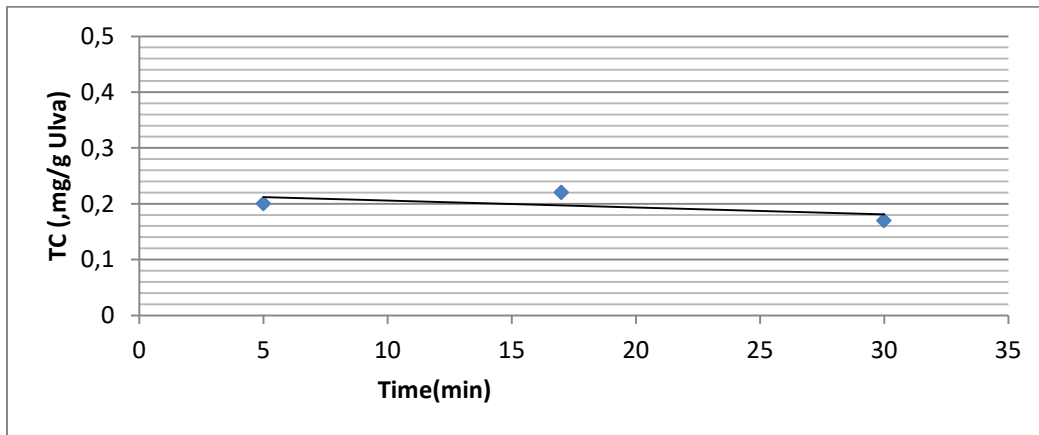
#### 6.3.1 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με το χρόνο εκχύλισης

Όσον αφορά τον χρόνο έχουν πραγματοποιηθεί επιπλέον εκχυλίσεις για την μελέτη της σχέσης χρόνου-TCC.

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w - 50°C.

Πίνακας 28: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο εκχύλισης

Time (mins)	TCC (mg/g Ulva)
5	0,20
17	0,22
30	0,17

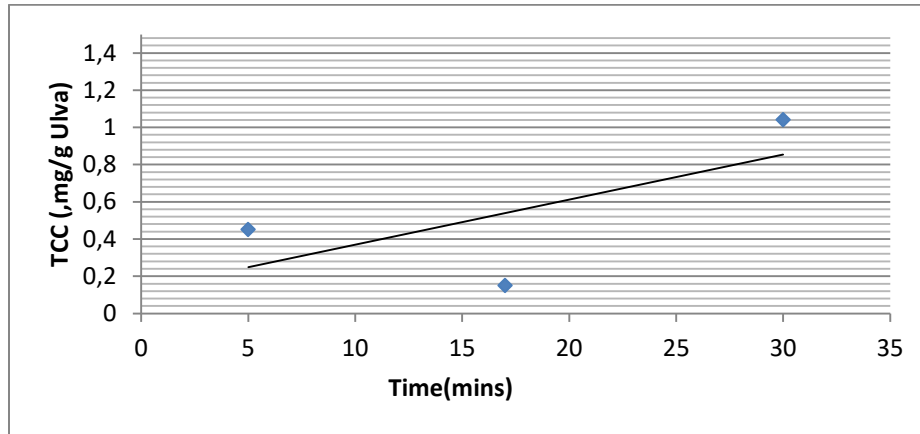


Διάγραμμα 24: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 800W - 1/10 w/w - 60°C.

**Πίνακας 29: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο εκχύλισης**

Time (mins)	TCC (mg/g Ulva)
5	0,45
17	0.15
30	1.04

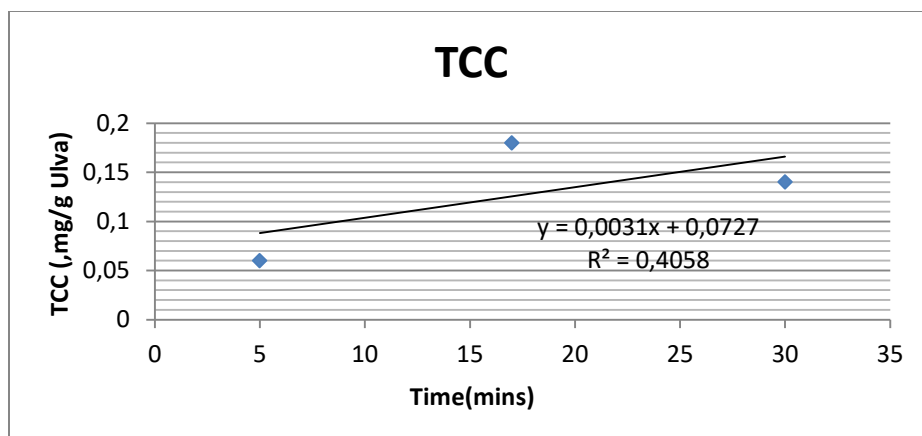


**Διάγραμμα 25: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο εκχύλισης**

3<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 300W - 1/40 w/w - 40°C.

**Πίνακας 30: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο εκχύλισης**

Time (mins)	TCC (mg/g Ulva)
5	0,06
17	0,18
30	0,14



**Διάγραμμα 26: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από το χρόνο εκχύλισης**

Στη σχέση χρόνου-TCC, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις αναμεσα στις τρεις συγκρίσεις. Στη 1<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> σύγκριση φαίνεται να υπάρχει καλύτερη ανάκτηση καροτενοειδών στα 17 λεπτά, με μικρή διαφορά κυρίως στην 1<sup>η</sup> σύγκριση από τους άλλους χρόνους και στα όρια της τυπικής απόκλισης (τυπική απόκλιση για TC: 0,022 mg/g Ulva). Ωστόσο, στη 2<sup>η</sup> σύγκριση παρατηρείται με διαφορά ότι η καλύτερη ανάκτηση καροτενοειδών γίνεται στα 30 λεπτά, όπου υπάρχουν διαφορές μεταξύ των άλλων εκχυλίσεων. Η δεύτερη σύγκριση πραγματοποιείται στα 800\_W, ενώ οι άλλες δύο σε λιγότερα Watt και επίσης, βρίσκεται σε αναλογία 1/10 w/w με θερμοκρασία 60 °C, όπου παρακάτω φαίνεται να είναι οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση ολικών καροτενοειδών.

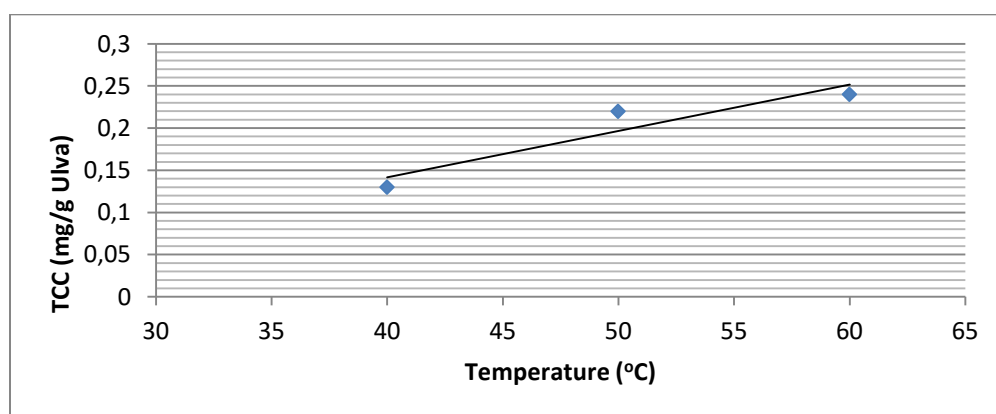
Άρα, βέλτιστος χρόνος εκχύλισης, για τα ολικά καροτενοειδή θεωρείται ότι είναι τα 30 λεπτά, με την επισήμανση ότι υπάρχουν και περιπτώσεις συνθηκών όπου ο χρόνος δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάκτηση των ολικών καροτενοειδών.

### **6.3.2 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με τη θερμοκρασία εκχύλισης**

Σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w - 17 min.

**Πίνακας 31: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από τη θερμοκρασία εκχύλισης**

Temperature (°C)	TCC (mg/g Ulva)
40	0,13
50	0,22
60	0,24



**Διάγραμμα 27: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από τη θερμοκρασία εκχύλισης**

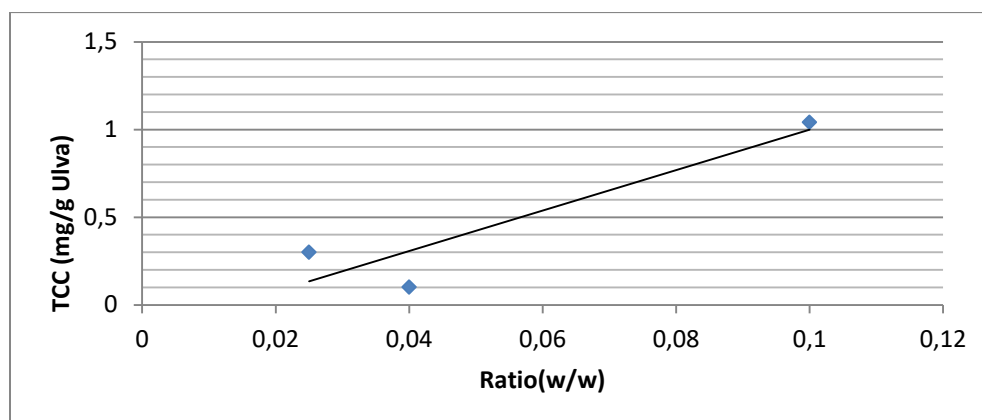
Παρατηρείται μια καλή συσχέτιση μεταξύ της σχέσης θερμοκρασία-TCC. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών. Άρα βέλτιστη θερμοκρασία σύμφωνα με την παρούσα μελέτη και συνθήκες είναι οι 60 °C.

### 6.3.3 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 800W 60°C – 30 min.

Πίνακας 32: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Ratio (w/w)	TCC (mg/g Ulva)
1/10	1,04
1/25	0,1
1/40	0,3



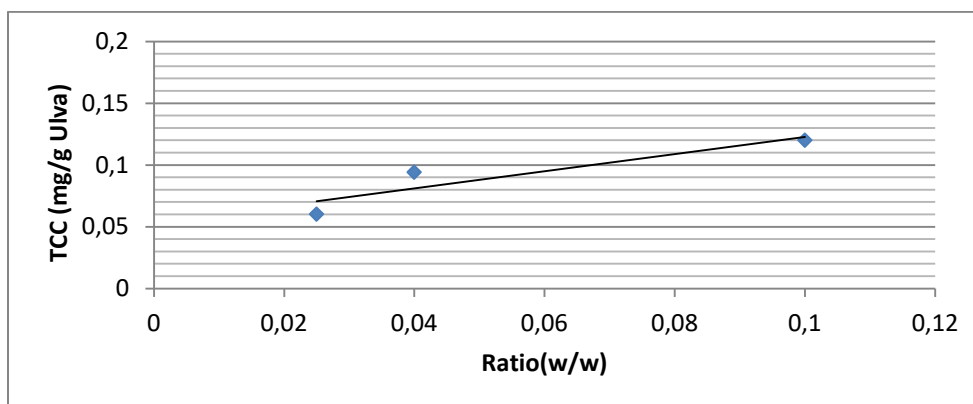
Διάγραμμα 28: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 300W - 40°C – 5 min.

Πίνακας 33: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Ratio (w/w)	TCC (mg/g Ulva)
1/10	0,12
1/25	0,094
1/40	0,06





**Διάγραμμα 29: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη**

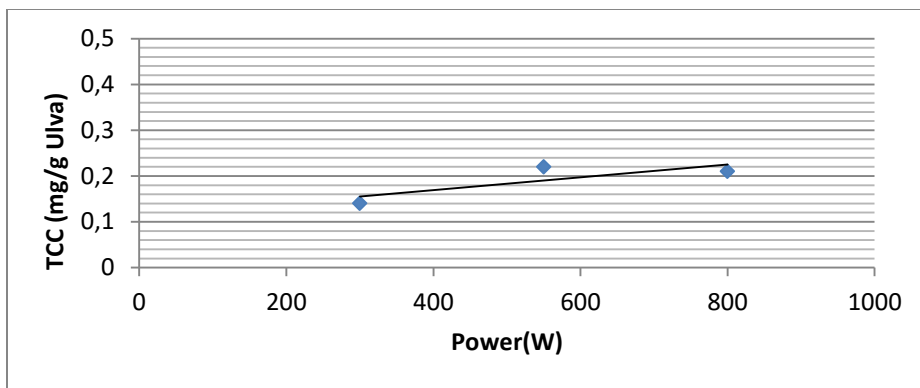
Στη πρώτη σύγκριση, υπάρχει μια ξεκάθαρη εικόνα, με την αναλογία 1/10 να αποδίδει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών καροτενοειδών και με την τρίτη σύγκριση να το επιβεβαιώνει, καθώς παρατηρείται γραμμική σχέση αναλογίας-TC και πιο συγκεκριμένα όσο αυξάνεται η αναλογία τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών. Άρα η βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη φαίνεται να είναι 1/10 w/w.

### **6.3.4 Εξάρτηση της ανάκτησης καροτενοειδών με την ισχύ των μικροκυμάτων**

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/25 w/w - 50°C – 17 min.

**Πίνακας 34: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την ισχύ των μικροκυμάτων**

Power (W)	TCC (mg/g Ulva)
300	0,14
550	0,22
800	0,21

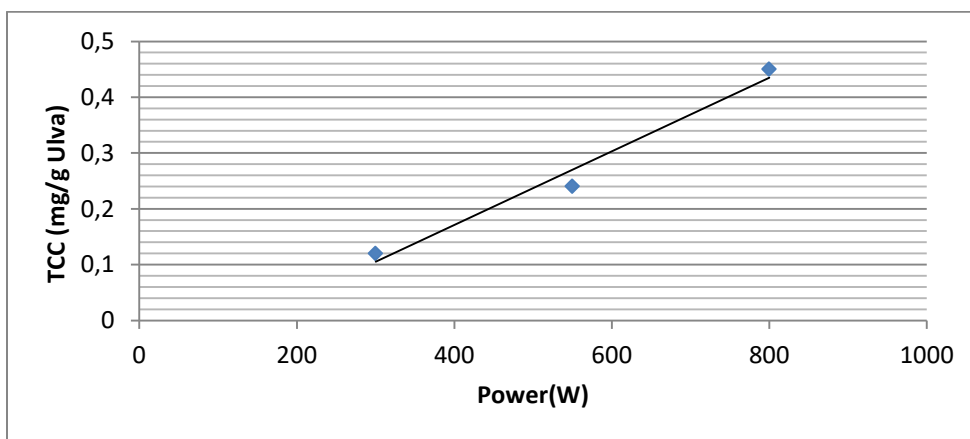


Διάγραμμα 30: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την ισχύ των μικροκυμάτων

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/10 w/w - 60°C – 5 min.

Πίνακας 35: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την ισχύ των μικροκυμάτων

Power (W)	TCC (mg/g Ulva)
300	0,12
550	0,24
800	0,45



Διάγραμμα 31: Εξάρτηση ολικών καροτενοειδών από την ισχύ των μικροκυμάτων

Στη πρώτη σύγκριση δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά , αφού οι τιμές των συγκεντρώσεων των ολικών καροτενοειδών είναι σχεδόν παρόμοιες. Με τη δεύτερη σύγκριση συμπεραίνεται ότι με την αύξηση της τιμής της ισχύος υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών καροτενοειδών. Επίσης, στη δεύτερη σύγκριση, πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες για την αναλογία (1/10 w/w) και την θερμοκρασία (60 °C). Άρα η βέλτιστη ισχύς θεωρείται τα 800W.

Συμπέρασμα: Καλύτερη ανάκτηση ολικών καροτενοειδών έχουμε όταν η εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται στις συνθήκες: 30 min - 60°C -1/10 w/w - 800W.

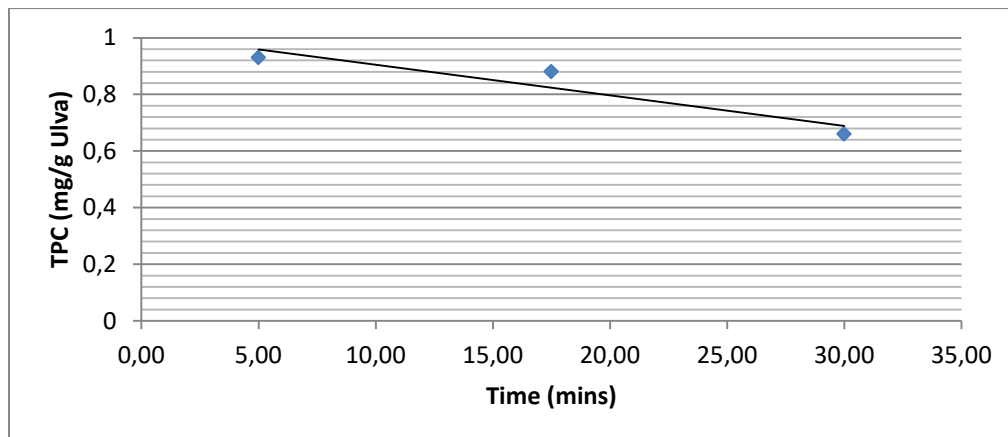
## 6.4 Ολικά φαινολικά (TPC)

### 6.4.1 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με το χρόνο

Σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w- 50°C.

Πίνακας 36: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από το χρόνο

Time (mins)	TPC (mg/g Ulva)
5	0,93
17	0,88
30	0,66



Διάγραμμα 32: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από το χρόνο

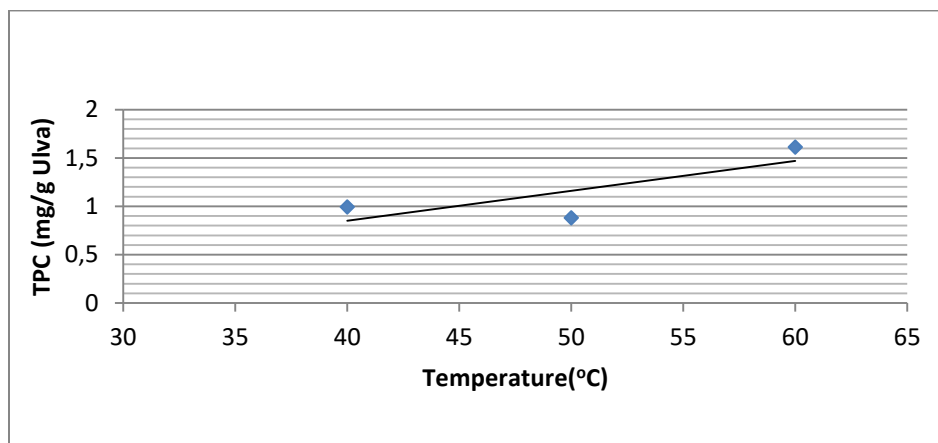
Σε αυτή τη σύγκριση φαίνεται μια γραμμική σχέση μεταξύ χρόνου-TPC, με αρνητική κλίση, που σημαίνει ότι η αύξηση του χρόνου εκχύλισης μειώνει τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Άρα ο βέλτιστος χρόνος είναι τα 5 min.

## 6.4.2 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με τη θερμοκρασία.

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w – 17 min.

Πίνακας 37: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από τη θερμοκρασία

Temperature(°C)	TPC(mg/g Ulva)
40	0,99
50	0,88
60	1,61

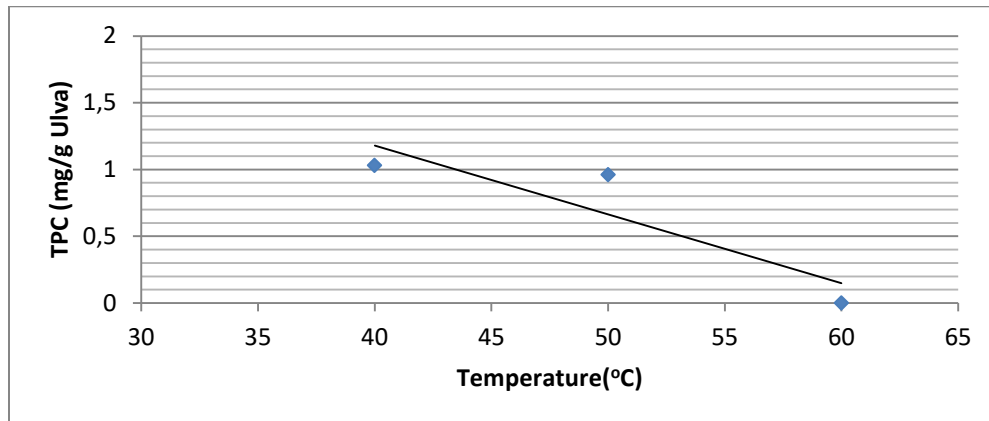


Διάγραμμα 33: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από τη θερμοκρασία

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 800W - 1/40 w/w – 5 min.

Πίνακας 38: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από τη θερμοκρασία

Temperature (°C)	TPC (mg/g Ulva)
40	1.03
50	0,96
60	0.53



**Διάγραμμα 34: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από τη θερμοκρασία**

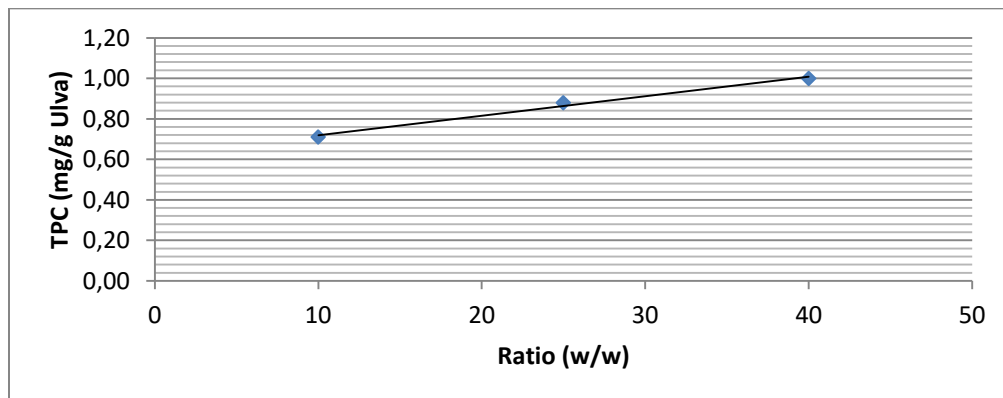
Στη πρώτη σύγκριση, με μεσαία εφαρμογή ισχύος και χρόνου, παρατηρείται καλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών στους 40°C, ενώ στη δεύτερη σύγκριση όπου χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη ισχύς, για πολύ σύντομη διάρκεια, παρατηρείται μια γραμμική σχέση, όπου με τη μείωση της θερμοκρασίας αυξάνεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Αυτό δείχνει για άλλη μια φορά ότι, η συσχέτιση των εξαρτημένων μεταβλητών με τις ανεξάρτητες μεταβλητές μπορεί να αλλάξει δραματικά.

### 6.4.3 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Σταθερές συνθήκες: 550W - 50°C – 17 min.

Πίνακας 39: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Ratio (w/w)	TPC (mg/g Ulva)
1/10	0,71
1/25	0,88
1/40	1,00



Διάγραμμα 35: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

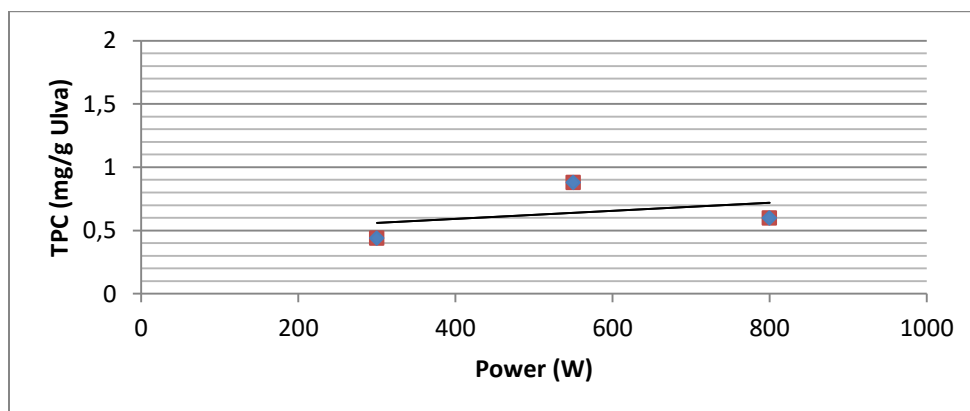
Στη σχέση αναλογία βιομάζας/διαλύτη-TPC, παρατηρείται μια ξεκάθαρη γραμμική σχέση μεταξύ τους. Με την αύξηση της αναλογίας διαλύτη, έχουμε μεγαλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών. Άρα η βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη είναι 1/40 w/w.

### 6.4.4 Εξάρτηση της ανάκτησης ολικών φαινολικών με την ισχύ των μικροκυμάτων

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/25 w/w - 50°C – 17 min.

**Πίνακας 40: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την ισχύ μικροκυμάτων**

Power (W)	TPC (mg/g Ulva)
300	0,44
550	0,88
800	0,60



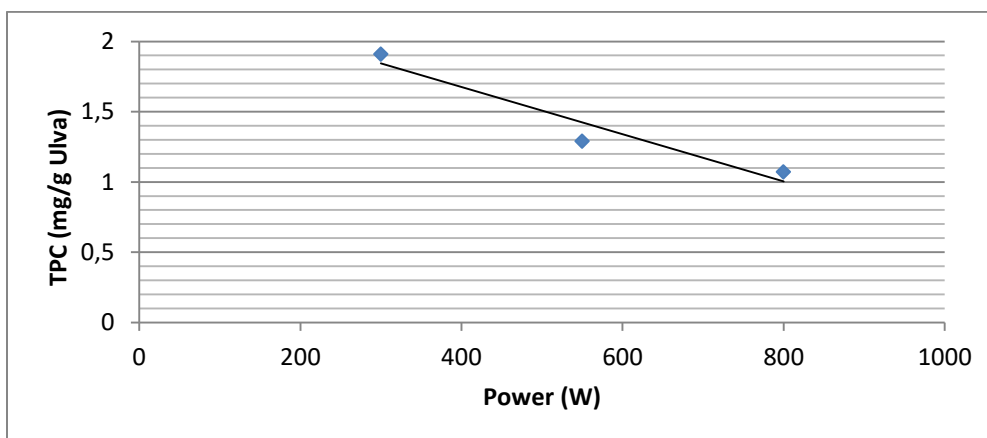
**Διάγραμμα 36: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την ισχύ μικροκυμάτων**

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/40 w/w - 60°C - 30 min.

**Πίνακας 41: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την ισχύ μικροκυμάτων**

Power (W)	TPC (mg/g Ulva)
300	1,91
550	1,29
800	1,07





**Διάγραμμα 37: Εξάρτηση ολικών φαινολικών από την ισχύ μικροκυμάτων**

Στην πρώτη σύγκριση, δεν παρατηρείται ικανοποιητική γραμμική συσχέτιση και δεν είναι εμφανές κάποιο συμπέρασμα. Το γεγονός αυτό, οδήγησε σε μια δεύτερη σύγκριση, όπου οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται στη βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη, η οποία δείχνει πιο ξεκάθαρα μία γραμμική σχέση, με αρνητική κλίση, δηλαδή όσο αυξάνεται η τιμή της ισχύος, τόσο η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών μειώνεται. Άρα η βέλτιστη ισχύς είναι 300W.

Συμπέρασμα: Καλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών έχουμε όταν η εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται στις συνθήκες: 5 λεπτά-60 °C-1/40-300 W, με την θερμοκρασία να χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

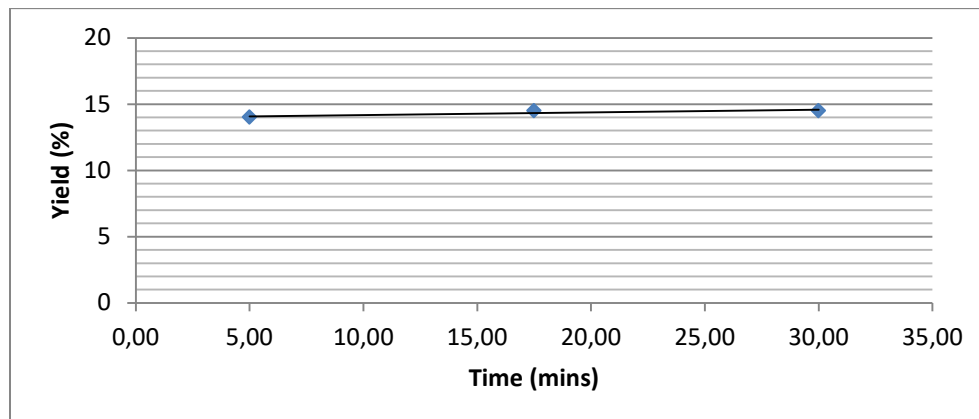
## 6.5 Απόδοση εκχύλισης (Yield)

### 6.5.1 Σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης

Σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w - 50°C.

Πίνακας 42: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από το χρόνο εκχύλισης

Time (mins)	Yield (%)
5	14
17	14,5
30	14,5



Διάγραμμα 38: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από το χρόνο εκχύλισης

Δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη διαφορά της απόδοσης σε σχέση με τη διάρκεια εκχύλισης. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι, οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης δίνουν μεγαλύτερες αποδόσεις[18]. Άρα ο βέλτιστος χρόνος φαίνεται να είναι τα 30 min. Ένας λόγος ο οποίος δεν παρουσιάζονται ξεκάθαρα συμπεράσματα είναι το γεγονός ότι οι υπόλοιπες συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν οι εκχυλίσεις δεν είναι οι βέλτιστες, σύμφωνα με τα παρακάτω αποτελέσματα. Επίσης, στα στατιστικά αποτελέσματα που

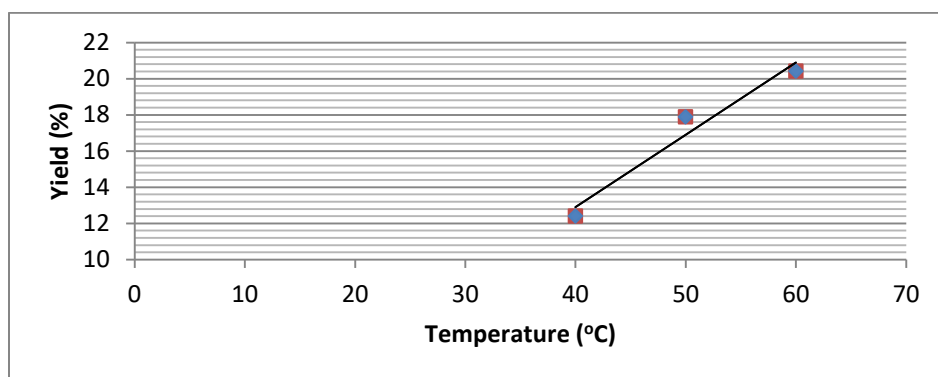
εξάχθηκαν παρακάτω, δείχνουν ότι η αύξηση του χρόνου οδηγεί στην αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης.

### 6.5.2 Σε σχέση με τη θερμοκρασία εκχύλισης

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 550W - 1/25 w/w – 17 min.

Πίνακας 43: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από τη θερμοκρασία εκχύλισης

Temperature (°C)	Yield (%)
40	14,75
50	14,5
60	15,5

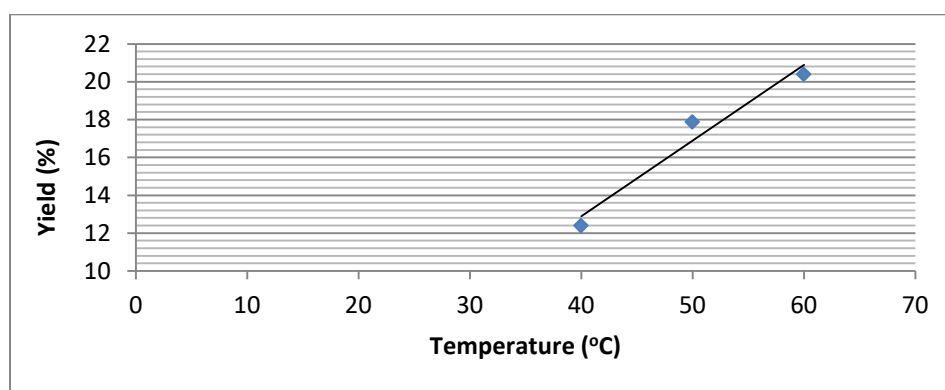


Διάγραμμα 39: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από τη θερμοκρασία εκχύλισης

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 800W - 1/40 w/w – 30 min.

Πίνακας 44: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από τη θερμοκρασία εκχύλισης

Temperature (°C)	Yield (%)
40	12,4
50	17,87
60	20,4



Διάγραμμα 40: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από τη θερμοκρασία

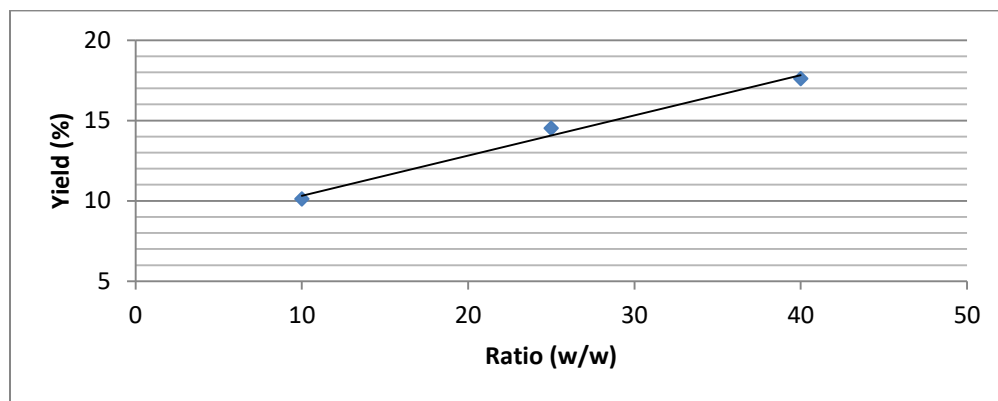
Στην πρώτη σύγκριση δεν φαίνεται κάποια σαφής ένδειξη, για το κατά πόσο επηρεάζει η θερμοκρασία την απόδοση της εκχύλισης. Στη δεύτερη σύγκριση όμως, παρατηρείται η επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση, λόγω του ότι, όπως παρουσιάζεται και πιο κάτω, οι υπόλοιπες σταθερές (ισχύς μικροκυμάτων – αναλογία βιομάζας/διαλύτη και χρόνος εκχύλισης) με βάση τα συμπεράσματα φαίνονται να είναι οι βέλτιστες συνθήκες για την απόδοση. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης επομένως, η βέλτιστη θερμοκρασία θεωρείται αυτή των 60 °C.

### 6.5.3 Σε σχέση με την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Σταθερές συνθήκες: 550W - 50°C – 17 min.

Πίνακας 45: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη

Ratio (w/w)	Yield (%)
1/10	10,1
1/25	14,5
1/40	17,6



Διάγραμμα 41: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από τη θερμοκρασία της εκχύλισης

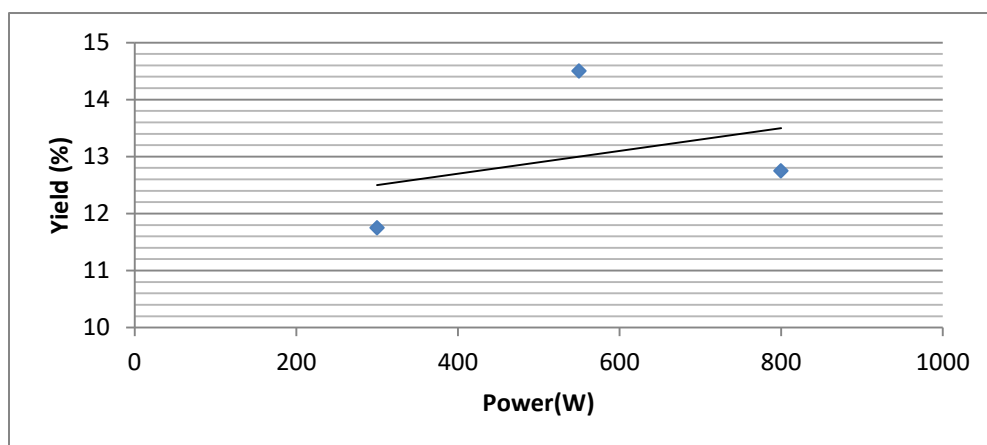
Στη σχέση αναλογία βιομάζας/διαλύτη-απόδοση εκχύλισης, φαίνεται να υπάρχει μια πιο διακριτή γραμμική σχέση. Με την αύξηση της αναλογίας βιομάζας/διαλύτη έχουμε αύξηση της απόδοσης. Άρα η βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη είναι 1/40 w/w.

#### 6.5.4 Σε σχέση με την ισχύ των μικροκυμάτων

1<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/25 w/w - 50°C - 17 min.

Πίνακας 46: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από την ισχύ των μικροκυμάτων

Power (W)	Yield (%)
300	11,75
550	14,5
800	12,75

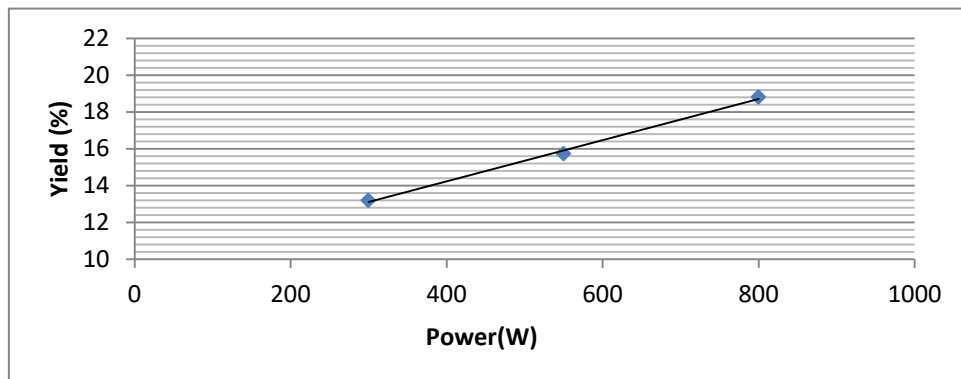


Διάγραμμα 42: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από την ισχύ των μικροκυμάτων

2<sup>η</sup> σύγκριση με σταθερές συνθήκες: 1/40 w/w - 60°C – 5 min.

Πίνακας 47: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από την ισχύ των μικροκυμάτων

Power (W)	Yield (%)
300	13,2
550	15,73
800	18,8



**Διάγραμμα 43: Εξάρτηση απόδοσης της εκχύλισης από την ισχύ των μικροκυμάτων**

Από τη πρώτη σύγκριση δεν προκύπτει κάποιο συγκεκριμένο συμπέρασμα. Στη δεύτερη σύγκριση, όπου έχει πραγματοποιηθεί στις δύο από τις τρεις βέλτιστες συνθήκες, με αναλογία 1/40 w/w και θερμοκρασία 60 °C, συμπεραίνεται ότι με αύξηση της τιμής της ισχύος, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης. Άρα η βέλτιστη τιμή της ισχύος είναι 800 W.

Συμπέρασμα: Καλύτερη απόδοση της εκχύλισης έχουμε όταν η εκχύλιση με μικροκύματα, πραγματοποιείται στις συνθήκες: 30 λεπτά – 60 °C - 1/40 w/w -800 W.

## 6.6 Στατιστική Ανάλυση των Αποτελεσμάτων

Με βάση τις πειραματικές εκχυλίσεις που έγιναν με τη βοήθεια της μεθόδου RSM (Response surface methodology) για τον πειραματικά σχεδιασμό αλλά και με τις επιπλέον εκχυλίσεις που έγιναν για καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων, εξάχθηκαν τα παρακάτω στατιστικά αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζουν τη γραμμική συσχέτιση των παραμέτρων, που μελετήθηκαν, με τις συνθήκες, που εξετάστηκαν με τη στατιστική μέθοδο linear regression με τη στατιστική ανάλυση δεδομένων που προσφέρει το excel

### Yield

#### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,91228366
Adjusted R Square	0,89279114

ANOVA		
	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	46,80173	2,831E-09

	<i>Coefficients</i>	<i>P-value</i>
Intercept	4,54218926	0,008184
Power	0,00649558	1,31E-05
Ratio	0,22249186	3,9E-10
Temp	0,00679334	0,80678
Time	0,04052016	0,069321

#### Regression Equation:

$$\text{Yield} = 4,542 + 0,0405\text{Time} + 0,00679 \text{Temp} + 0,222 \text{Ratio} - 0,00649 \text{Power}$$



Με βάση την στατιστική επεξεργασία ( $R^2=0.91$ ) αλλά και μέσα από την πειραματική μελέτη στο excel, η απόδοση παρουσιάζει καλή συσχέτιση με τις συνθήκες τις οποίες εξετάζονται.

## TPC

### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
R Square	0,332863	
Adjusted R Square	0,18461	

ANOVA		
	<i>Significance</i>	
	<i>F</i>	<i>F</i>
Regression	2,245242	0,104601

	<i>Coefficients</i>	<i>P-value</i>
Intercept	0,225271	0,608028
Power	-1,2E-05	0,968488
Ratio	0,011277	0,041969
Temp	0,003451	0,660449
Time	0,009556	0,123984

### Regression Equation

$$\text{TPC} = 0,225 + 0,00956\text{Time} + 0,00345 \text{Temp} + 0,113 \text{Ratio} - 1,2 \cdot 10^{-5} \text{Power}$$

Τα ολικά φαινοτικά, παρουσιάζουν σχετικά μικρή συσχέτιση τις παραμέτρους των συνθηκών εκχύλισης. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων ταυτίζεται με την επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων στο excel.

## TCC

### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
R Square	0,616711	
Adjusted R Square	0,531536	

ANOVA		
	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	7,240493	0,00117

	<i>Coefficients</i>	<i>P-value</i>
Intercept	-0,6670516	0,01509
Power	0,00014634	0,42176
Ratio	-0,0094345	0,00515
Temp	0,01715175	0,00115
Time	0,01074287	0,00551

### Regression Equation

$$\text{TCC} = -0,667 + 0,0107\text{Time} + 0,0171\text{Temp} - 0,00943\text{Ratio} - 0,000146\text{Power}$$

Τα ολικά καροτενοειδή, έδειξαν μια καλύτερη γραμμική συσχέτιση και πλήρη ταύτιση με την επεξεργασία των μετρήσεων στο excel.

## IC50

### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
R Square	0,3733	
Adjusted R Square	0,234033	

ANOVA		
	<i>F</i>	<i>Significance F</i>

Regression            2,680465      0,065012

	<i>Coefficients</i>	<i>P-value</i>
Intercept	0,06275062	0,868729
Power	0,00068169	0,020489
Ratio	0,00982236	0,041208
Temp	0,00462243	0,499095
Time	0,00336443	0,520722

### Regression Equation

$$IC50 = -0,0627 + 0,00336Time + 0,00462 Temp - 0,00982 Ratio - 0,000682Power$$

Η αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε επίσης, σχετικά χαμηλή συσχέτιση, μέσα από την στατιστική επεξεργασία, ωστόσο στις πειραματικές επεξεργασίες, που έγιναν στο excel, παρουσιάστηκαν καλύτερες συσχετίσεις των συνθηκών με αυτήν.

## **CHLA**

### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>		
R Square	0,6622037	
Adjusted R Square	0,5871378	
ANOVA		
	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	8,82163618	0,000399
Residual		
Total		
<i>Coefficients</i>		
Intercept	0,095387443	0,13675327

Power	9,14718E-05	0,05171377
	-	
Ratio	0,000646649	0,38798159
Temp	0,003969974	0,00195386
Time	0,003724292	0,00032211

---

### Regression Equation

$$\text{CHLA} = 0,0953 + 0,00372\text{Time} + 0,00397\text{Temp} - 0,000647\text{Ratio} - 9,15 \cdot 10^{-5}\text{Power}$$

Τα στατιστικά δείχνουν σχετικά μέτρια καλή συσχέτιση μεταξύ της χλωροφύλλης και των συνθηκών.

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup>: Συζήτηση Συνολικών Αποτελεσμάτων

Συμπερασματικά, η θερμοκρασία των 60 °C είναι η βέλτιστη για την μέγιστη απόδοση (yield), τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση (IC50), και την μέγιστη ανάκτηση ολικών καροτενοειδών (TCC).

Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία η οποία αναφέρει ότι, στην εκχύλιση με μικροκύματα, η θερμοκρασία του μίγματος εκχύλισης αυξάνεται καθώς αυτό απορροφά ενέργεια που παρέχεται από τα μικροκύματα.

Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στο χαμηλότερο ιξώδες του διαλύτη, που προάγει τον ρυθμό διάχυσης των επιθυμητών ενώσεων από τις ουσίες, που εκχυλίζονται προς το μέσο εκχύλισης, δηλαδή τον διαλύτη[36]. Επίσης, οι ψηλές θερμοκρασίες, επιτρέπουν στον διαλύτη εκχύλισης να διεισδύσει στο στερεό μέρος με πιο γρήγορο ρυθμό, οδηγώντας έτσι, στην αποτελεσματικότερη απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων, που βρίσκονται εντός των κυττάρων στην υγρή φάση [41]. Ωστόσο, ένα από τα εμπόδια της μεθόδου είναι η ταχεία αύξηση της θερμοκρασίας του μίγματος που μπορεί να τερματίσει τη διαδικασία εκχύλισης γρήγορα λόγω του βρασμού του διαλύτη. Όταν η εκχύλιση τερματίζεται νωρίς, οι επιθυμητές ενώσεις δεν διαχέονται επαρκώς από το υλικό στον διαλύτη και κατά συνέπεια μειώνεται η απόδοση εκχύλισης [43], κάτι που θεωρείται να συμβαίνει στην ανάκτηση των ολικών φαινολικών, στην παρούσα έρευνα.

Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι *Michalak et al (2015)*, όπου μελέτησαν το εκχύλισμα φυκιών, με εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Οι συνθήκες εκχύλισης ήταν 1000 W, αναλογία υγρού/στερεού (15 mL/5,0 g ξηρής βιομάζας), χρόνος εκχύλισης 30 λεπτά και τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες εκχύλισης, 25, 40 και 60 °C. Παρατηρήθηκε ότι στο τελικό εκχύλισμα, υπήρχε συσχέτιση της θερμοκρασίας εκχύλισης, με την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων και μακροστοιχείων (άγαρ). Συγκεκριμένα, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, παρατηρήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ευνόησαν την ανάκτηση πολυφαινολών, καθώς υψηλότερες θερμοκρασίες προκάλεσαν την αποσύνθεση των φαινολικών ενώσεων [40].

Αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης, η απόδοση της εκχύλισης καθώς και τα ολικά καροτενοειδή βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστο το μέγιστο χρόνο κατεργασίας, δηλαδή τα 30 λεπτά. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστο τον ελάχιστο χρόνο κατεργασίας, δηλαδή τα 5 λεπτά.

Συνήθως οι παραδοσιακές τεχνικές απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης, με αποτέλεσμα να υπάρχει σοβαρός κίνδυνος θερμικής αποδόμησης, για τα περισσότερα από τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών, κάτι που μπορεί να αποφευχθεί με την χρήση μικροκυμάτων [39].

Γενικά, αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης με μικροκύματα, αυξάνεται η ποσότητα των εκχυλισθέντων ουσιών, αν και υπάρχει ο κίνδυνος να προκληθεί υποβάθμισή τους. Συχνά, 15 - 20 λεπτά έχει αποδειχθεί ότι έχουν δώσει εξαιρετική απόδοση. Η απόδοση της μεθόδου για τις πολυφαινόλες βρέθηκε να αυξάνεται έως και τα 4 λεπτά, ενώ μειώνεται με περεταίρω αύξηση του χρόνου, σύμφωνα με την έρευνα των *Mandal et al, 2007*, αποτέλεσμα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.[39]

Ακόμα, σε μελέτη που έγινε Βελτιστοποίηση της εκχύλισης φυκοκυανίνης από *Spirulina platensis* χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές [81], το TPC επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία βιομάζας/διαλύτη σε όλες τις μεθόδους εκχύλισης που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα στην εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, το TPC μειώθηκε καθώς μειώθηκε η ποσότητα του διαλύτη. Λιγότερος διαλύτης εμπόδιζε τη διάχυση των φαινολικών στο εκχύλισμα [63]. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι η αύξηση της ποσότητας του διαλύτη, βελτιώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ διαλύτη και βιομάζας φυκών και αυξάνει τη μεταφορά μάζας [82].

Επιπλέον η απόδοση της εκχύλισης, καθώς και τα ολικά καροτενοειδή, βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές όταν χρησιμοποιείται η μέγιστη τιμή ισχύος των μικροκυμάτων, δηλαδή 800 W. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στην ελάχιστη ισχύ, δηλαδή 300 W.

Η ισχύς πρέπει να επιλέγεται σωστά, για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της ποιότητας των ανακτώμενων βιοδραστικών ουσιών και υπερπίεση στο εσωτερικό του δοχείου. Η ταχεία ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος λαμβάνει χώρα σε υψηλότερη θερμοκρασία όταν

επιβάλεται υψηλότερη ισχύς, με αποτέλεσμα μαζί με τις επιθυμητές ανακτώμενες ουσίες, και άλλες μη επιθυμητές να εκπλένονται επίσης στο διαλύτη. Σε χαμηλά επίπεδα ισχύος, η ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να λάβει χώρα σταδιακά, κάτι που επιτρέπει επιλεκτική εκχύλιση με την μέθοδο των μικροκυμάτων [39].

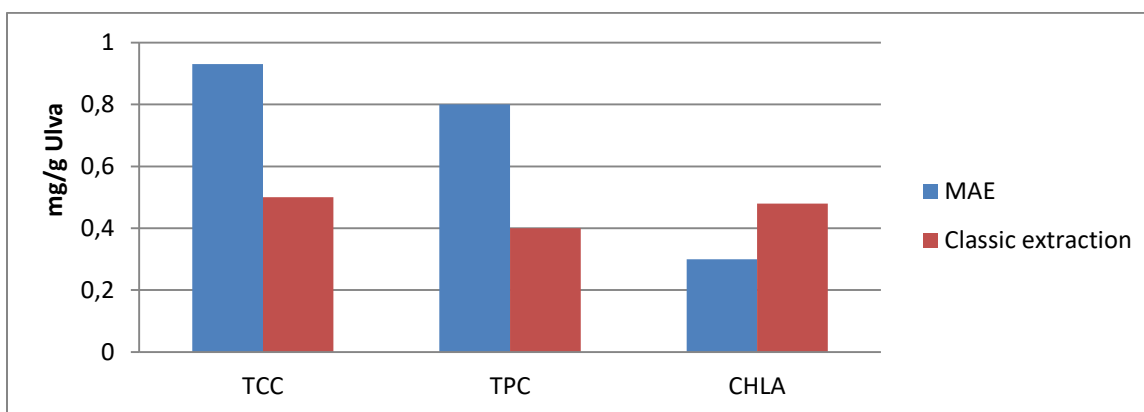
Στην εργασία των *Fabrowska et al (2018)*[38] μελετήθηκε η απομόνωση καροτενοειδών από φύκια γλυκού νερού (*Ulva flexuosa*). Για τη σύγκριση της απόδοσης, όλοι οι τύποι εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν υπό τις ακόλουθες συνθήκες: χρόνος 60 λεπτά και θερμοκρασία 40 °C. Στην εκχύλιση με μικροκύματα εφαρμόστηκε ισχύς μικροκυμάτων 800 W, και τα αποτελέσματα ταυτίζονται με αυτά της παρούσας εργασίας. Η συγκεκριμένη έρευνα είχε σκοπό την σύγκριση τεσσάρων μεθόδων εκχύλισης, μικροκυμάτων (MAE), εξαγωγή με υποβοήθηση ομογενοποίησης (HAE), η υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE) και κλασσική εκχύλιση με αιθανόλη ως διαλύτη, μελετώντας την ανάκτηση ολικών καροτενοειδών και χλωροφύλλης σε διάφορα είδη φυκιών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τα πλεονεκτήματα της τεχνικής εξαγωγής MAE, περιλαμβάνουν υψηλότερη απόδοση και, κατά συνέπεια, χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές εξαγωγής διαλυτών. Αυτή η μέθοδος ήταν πολύ πιο αποτελεσματική στην ανάκτηση χρωστικών πράσινων φυκιών γλυκού νερού από την κλασσική εκχύλιση καθώς και το SFE.

Η απόδοση της εκχύλισης καθώς και τα ολικά καροτενοειδή, βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στη μεγαλύτερη αναλογία βιομάζας/διαλύτη, 1/40 w/w. Αντιθέτως, η αντιοξειδωτική δράση καθώς και τα ολικά φαινολικά βρέθηκε ότι έχουν βέλτιστες τιμές στην ελάχιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη, δηλαδή 1/10 w/w.

Ένας ακόμα στόχος που επιτεύχθηκε μέσα από την παρούσα διπλωματική εργασία είναι η σύγκριση των δύο μεθόδων εκχύλισης για το μακρόφυκος *U. lactuca*. Στα πιο κάτω γραφήματα παρουσιάζεται η σύγκριση των μεθόδων. Οι συνθήκες της κλασσικής εκχύλισης είναι : διαλύτης αιθανόλη/νερό(70:30 w/w) με χρόνο εκχύλισης 12h σε θερμοκρασία 25 °C, με αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1:10 w/w. Οι συνθήκες της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα είναι: θερμοκρασία 60 °C, αναλογία βιομάζας/διαλύτη 1:10 w/w, διάρκεια εκχύλισης 30 λεπτά και ισχύς 300 W. Οι συνθήκες, που επιλέχθηκαν, είναι οι βέλτιστες συνθήκες για την κάθε εκχύλιση, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση

**Πίνακας 48: Συγκεντρώσεις βιοδραστικών ουσιών για κάθε μέθοδο εκχύλισης**

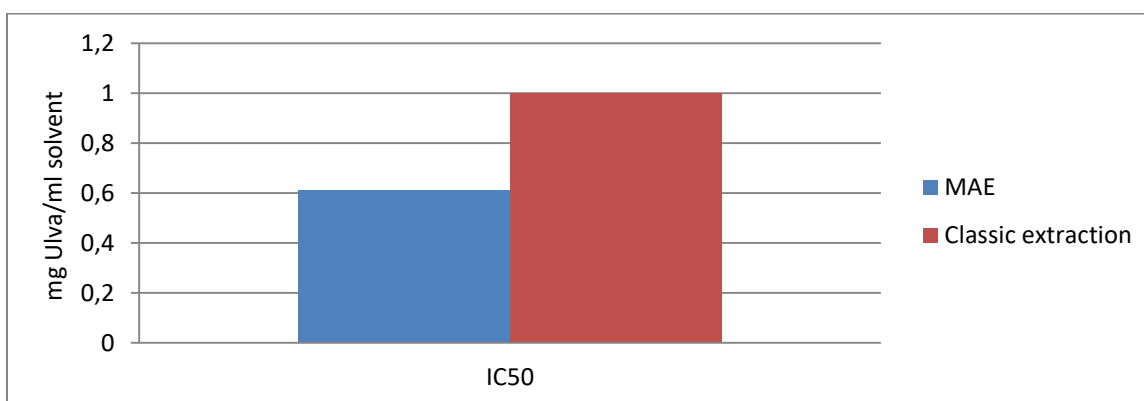
	MAE	Classic extraction
TCC(mg/g Ulva)	0,93	0,5
TPC(mg/g Ulva)	0,8	0,4
CHLA(mg/g Ulva)	0,3	0,48



**Διάγραμμα 44: Συγκεντρώσεις βιοδραστικών ουσιών για κάθε μέθοδο εκχύλισης**

**Πίνακας 49: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε μέθοδο εκχύλισης**

	MAE	Classic extraction
IC50(mg Ulva/ml solvent)	0,16	0,61



**Διάγραμμα 45: Αντιοξειδωτική δράση για κάθε μέθοδο εκχύλισης**



Στα πιο πάνω πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι, η τεχνική εκχύλισης MAE σε σύγκριση με την κλασική μέθοδο, παρουσιάζει καλύτερη ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών στα εκχυλίσματα του μακροφύκου *U. lactuca*, με καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, επιβεβαιώνοντας την βιβλιογραφία που προτείνει τη συγκεκριμένη μέθοδο για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων για το φύκος.

## Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα

Αρχικά, η κλασική εκχύλιση του μακροφύκους μπορεί να χαρακτηριστεί ως “πράσινη”, αφού γίνεται χρήση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, αντικαθιστώντας τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, που προτείνονται για την εκχύλιση του μακροφύκους *U. lactuca*. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα στην παρούσα διπλωματική έρευνα έδειξαν ότι από τους διαλύτες DES που εξετάστηκαν, ο διαλύτης DES choline chloride/butanediol 1:2 φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από το μακροφύκος και σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες DES αλλά και σε σχέση με τον κλασικό διαλύτη αιθανόλη/νερό 70:30 w/w, που θεωρείται ο πλέον ιδανικός διαλύτης για την εκχύλιση του φύκους *U. lactuca*.

Αρκετές βιβλιογραφίες κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα για την αποδοτικότητα του διαλύτη DES choline chloride/butanediol, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση βιοδραστικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων από μακροφύκη, ωστόσο η πρόταση τους, είναι ότι η χρήση του συγκεκριμένου διαλύτη DES αποδίδει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων και καροτενοειδών σε μεγαλύτερες αναλογίες [77][78][79], κάτι που μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον πειραματική έρευνα στο εργαστήριο

Στη κλασική εκχύλιση, η βέλτιστη διάρκεια κλασικής εκχύλισης ως προς την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από το μακροφύκος προκύπτει να είναι η 12h, κάτι που μελετάται στη κλασική μέθοδο εκχύλισης, αφού η ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών πραγματοποιείται σε μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης(12h-24h) [79], ενώ η βέλτιστη αναλογία βιομάζας/διαλύτη ως προς την ανάκτηση των ουσιών του φύκους θεωρείται ότι είναι 1:10 (w/w), συμπεράσματα που προκύπτει από μελέτη ενός είδος φυκών *Euglena sanguinea*, όπου προτείνει για την χρήση διαλυτών αλκοόλης/νερό, ένα φάσμα αναλογίας βιομάζας/διαλύτη μεταξύ 1:5-1:15.[85]

Στις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μικροκυμάτων, με διαλύτη αιθανόλη/νερό 70:30 w/w, έχει διαπιστώθει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων όταν η εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται στις συνθήκες: 5 min - 60 °C - 1/10 w/w - 300 W

Καλύτερη ανάκτηση ολικών καροτενοειδών έχουμε όταν η εκχύλιση με μικροκύματα πραγματοποιείται στις συνθήκες: 30 min - 60°C - 1/10 w/w - 800W.

Η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών διαπιστώθηκε ότι αυξάνει γραμμικά με την αύξηση της τιμής ισχύος των μικροκυμάτων. Αυτό έχει αποδειχθεί από δημοσιευμένες έρευνες που μελέτησαν την ανάκτηση καροτενοειδών με τη μέθοδο MAE, οι οποίες προτείνουν μεγαλύτερες τιμές ισχύος για την ανάκτηση ολικών καροτενοειδών από εκχυλίσματα φυκών. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει μια πρόταση για μελλοντικές δοκιμές στο εργαστήριο.

Στις συνθήκες 5 min - 40 °C- 1/40 - 300 W, παρατηρήθηκε η μέγιστη ανάκτηση ολικών φαινολικών. Δεν διαπιστώθηκε κάποια σαφής συσχέτιση των ολικών φαινολικών με τη θερμοκρασία εκχύλισης, ωστόσο, η μεγαλύτερη ανάκτηση τους σημειώθηκε σε θερμοκρασία 40 °C. Άλλες μελέτες, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι χαμηλές θερμοκρασίες στην μέθοδο MAE έχουν ως αποτέλεσμα μέγιστη ανάκτηση πολυφαινολών, καθώς υψηλές θερμοκρασίες δύνανται να προκαλέσουν αποσύνθεση των φαινολικών ενώσεων.[40][43]

Η μεγαλύτερη τιμή απόδοσης της εκχύλισης με μικροκύματα, προέκυψε στις συνθήκες: 30 λεπτά - 60 °C - 1/40 w/w - 800 W.

Γενικότερα, η κλασική μέθοδος εκχύλισης και η εκχύλιση MAE, αποτελούν τις πιο συχνές μεθόδους για την μελέτη εκχυλισμάτων βιομάζας. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιοδραστικών ουσιών με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα μακροφύκους. Μια επιπλέον ενδιαφέρουσα έρευνα που θα μπορούσε να διενεργηθεί στο εργαστήριο της Θερμοδυναμικής είναι, η μελέτη των εκχυλισμάτων του μακροφύκους με τη μέθοδο εκχύλισης MAE, και τη χρήση των πράσινων εναλλακτικών διαλυτών DES.

## Βιβλιογραφία

1. Bates, Colin. "An introduction to the (macro) algae of British Columbia". *Electronic Atlas of the Flora of British Columbia, University of British Columbia*. Retrieved 29 July 2020
2. Wichard, T., Charrier, B., Mineur, F., Bothwell, J. H., Clerck, O. D., & Coates, J. C. (2015). The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. *Frontiers in plant science*, 6, 72.
3. Patil, S. S., Pathak, A., & Rathod, V. K. (2021). Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, 105267
4. Dominguez, H., & Loret, E. P. (2019). *Ulva lactuca*, a source of troubles and potential riches. *Marine drugs*, 17(6), 357.
5. Rybak, A. S. (2018). Species of *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) as indicators of salinity. *Ecological indicators*, 85, 253-261.
6. Abd El-Baky, H. H., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2008). Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 3(3), 434-44.
7. Burrows, E.M. (1991). *Seaweeds of the British Isles*. 2. London: Natural History Museum. ISBN 978-0-565-00981-6.
8. Anjali, K. P., Sangeetha, B. M., Devi, G., Raghunathan, R., & Dutta, S. (2019). Bioprospecting of seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): The compound characterization and functional applications in medicine-a comparative study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 200, 111622.
9. Osama M. Ahmed, Hanan A. Soliman, Basant Mahmoud, Randa R. Gheryany, *Ulva lactuca* hydroethanolic extract suppresses experimental arthritis via its anti-inflammatory and antioxidant activities, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2017, 394-408.
10. Meital Kazir, Yarden Abuhassira, Arthur Robin, Omri Nahor, Jincheng Luo, Alvaro Israel, Alexander Golberg, Yoav D. Livney, Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates, *Food Hydrocolloids*, 2019, Pages 194-203
11. Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., ... & Livney, Y. D. (2019). Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 87, 194-203.

12. Violle, N., Rozan, P., Demais, H., Nyvall Collen, P., & Bisson, J. F. (2018). Evaluation of the antidepressant-and anxiolytic-like effects of a hydrophilic extract from the green seaweed *Ulva* sp. in rats. *Nutritional neuroscience*, 21(4), 248-256.
13. Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. (2018). Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology advances*, 36(3), 798-817.
14. Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, 9(6), 1056-1100.
15. Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J. P., Jeftić, J., & Benvegnu, T. (2019). Extracted Ulvans from green algae *Ulva linza* of Lebanese origin and amphiphilic derivatives: Evaluation of their physico-chemical and rheological properties. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1931-1946.
16. " ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ", Ελένη Ξενάκη, Αθήνα
17. Deveau, A. M., Miller-Hope, Z., Lloyd, E., Williams, B. S., Bolduc, C., Meader, J. M., ... & Burkholder, K. M. (2016). Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important Staphylococci is impacted by lunar phase of macroalgae harvest. *Letters in applied microbiology*, 62(5), 363-371.
18. Suganya, T., & Renganathan, S. (2012). Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca*. *Bioresource Technology*, 107, 319-326. Τεχνολογία υπέρηχων Hielscher, Γερμανία
19. Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., ... & Sangoro, J. R. (2020). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285.
20. Endo, H., Nakajima, K., Chino, R., & Shirota, M. (1974). Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. *Agricultural and biological chemistry*, 38(1), 9-18.
21. Geng, Y., Xiang, Z., Lv, C., Wang, N., Wang, Y., & Yang, Y. (2019). Recovery of gold from hydrochloric medium by deep eutectic solvents based on quaternary ammonium salts. *Hydrometallurgy*, 188, 264-271.
22. Arbi, B., Ma'ruf, W. F., & Romadhon, R. AKTIVITAS SENYAWA BIOAKTIF SELADA LAUT (*Ulva lactuca*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA MINYAK IKAN The Activity of Bioactive Compounds from Sea Lettuce (*Ulva lactuca*) as Antioxidant in Fish Oil. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 12(1), 12-18.
23. Auricchio, A., Stellbrink, C., Block, M., Sack, S., Vogt, J., Bakker, P., ... & Spinelli, J. (1999). Effect of pacing chamber and atrioventricular delay on acute systolic function of paced patients with congestive heart failure. *Circulation*, 99(23), 2993-3001.

24. Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, 72(9), 1229-1234.
25. Hsieh, Y.-H., Li, Y., Pan, Z., Chen, Z., Lu, J., Yuan, J., et al. (2019). Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104915.
26. Murakami, M., Yoo, S. I., Higuchi, T., Sakai, N., Weltz, J., Koshizuka, N., & Tanaka, S. (1994). Flux pinning in melt-grown NdBa<sub>2</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>y</sub> and SmBa<sub>2</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>y</sub> superconductors. *Japanese journal of applied physics*, 33(5B), L715.
27. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
28. Wang, T., Jonsdottir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food chemistry*, 116(1), 240-248.
29. Boly, R., Lamkani, T., Lompo, M., Dubois, J., & Guissou, I. P. (2016). DPPH Free Radical Scavenging Activity of Two Extracts from *Agelanthus dodoneifolius* (Loranthaceae) Leaves. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9 (1), 29-34
30. Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable, Sources. *Agronomy*, 7 (3), 47-65.
31. Ali, A. M., El-Nour, M. E., & Yagi, S. M. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 (2), 677-682.
32. García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554-561
33. Κανδαράκη, Γ. (2015). *In vitro μελέτη της διεργασίας χώνευσης γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό που περιέχουν ζελατίνη* (Doctoral dissertation).
34. Berna, A., Cháfer, A., Montón, J. B., & Subirats, S. (2001). High-pressure solubility data of system ethanol (1)+ catechin (2)+ CO<sub>2</sub> (3). *The Journal of Supercritical Fluids*, 20(2), 157-162.
35. Machado, B. A. S., Pereira, C. G., Nunes, S. B., Padilha, F. F., & Umsza-Guez, M. A. (2013). Supercritical fluid extraction using CO<sub>2</sub>: main applications and future perspectives. *Separation Science and Technology*, 48(18), 2741-2760.
36. Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography A*, 902(1), 227-250.

37. Fabrowska, J., Messyas, B., Szyling, J., Walkowiak, J., & Łęska, B. (2018). Isolation of chlorophylls and carotenoids from freshwater algae using different extraction methods. *Phycological Research*, 66(1), 52-57.
38. Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17-26.
39. Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
40. Michalak, I., Tuhy, Ł., & Chojnacka, K. (2015). Seaweed extract by microwave assisted extraction as plant growth biostimulant. *Open Chemistry*, 13(1).
41. Zhou, H. Y., & Liu, C. Z. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1129(1), 135-139.
42. Hanie Amin, H. (2019). *Ulva lactuca* as a cheap and safe biopesticide in fields and its chemical composition (in vitro). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(5 (Special Issue)), 415-428.
43. Sánchez, R. J., Fernández, M. B., & Nolasco, S. M. (2018). Hexane-Free Green Solvent Extraction of Canola Oil From Microwave-Pretreated Seeds and of Antioxidant-Rich Byproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1800209.
44. Bourgou, S., Bettaieb Rebey, I., Ben Kaab, S., Hammami, M., Dakhlaoui, S., Sawsen, S & Fauconnier, M. L. (2021). Green Solvent to Substitute Hexane for Bioactive Lipids Extraction from Black Cumin and Basil Seeds. *Foods*, 10(7), 1493
45. Löfgren, L., Forsberg, G. B., & Ståhlman, M. (2016). The BUME method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
46. Kato, S., Soshino, M., Takaichi, S., Ishikawa, T., Nagata, N., Asahina, M., & Shinomura, T. (2017). Suppression of the phytoene synthase gene (*Eg crtB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*. *BMC plant biology*, 17(1), 1-10.
47. Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., ... & Sangoro, J. R. (2020). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285.
48. Li, L., Liu, Y., Wang, Z., Yang, L., & Liu, H. (2021). Development and applications of deep eutectic solvent derived functional materials in chromatographic separation. *Journal of Separation Science*, 44(6), 1098-1121.
49. Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.

50. Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutrition in clinical care*, 5(2), 56-65.
51. Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
52. I.S. Young and J. V. Woodside, "Antioxidants in health and disease. ," *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176 –186, 2001.
53. B. N. Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915 – 7922," 1990.
54. C. Swanson, "Vegetables, Fruits, and Cancer Risk: The Role of Phytochemicals. ," In W. R. Bidlack, S. T. Omaye, M. S. Meskin, & D. Jahmer (Eds.), *Phytochemicals: A New Paradigm* (pp. 1–12). Lancaster, PA: Technomic Publishing., 1998.
55. Yaich, H., Amira, A. B., Abbas, F., Bouaziz, M., Besbes, S., Richel, A., ... & Garna, H. (2017). Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. *International journal of biological macromolecules*, 105, 1430-1439.
56. Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. D. A., Câmara, R. B. G., ... & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28.
57. Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., & Zhang, Q. (2010). Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 118-121.
58. Hussein, U. K., Mahmoud, H. M., Farrag, A. G., & Bishayee, A. (2015). Chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats by sulfated polysaccharides and aqueous extract of *Ulva lactuca*. *Integrative cancer therapies*, 14(6), 525-545.
59. Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X., & Li, Z. (2005). Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International journal of biological macromolecules*, 37(4), 195-199.
60. Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384.
61. Wijayanti, I. I., Budiharjo, A., Pangastuti, A., Prihapsara, F., & Artanti, A. N. (2018). Total phenolic content and antioxidant activity of ginger extract and SNEDDS with eel fish bone oil (*Anguilla* spp.). *Nusantara Bioscience*, 10 (3), 164-169.



62. Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M.-E., Abdelly, C., & Magné, C. (2012). Ultrasound-Assisted Extraction: Effect of Extraction Time and Solvent Power on the Levels of Polyphenols and Antioxidant Activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae Shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (2), 243-249.
63. Škulcová, A., & Jablonský, M. (n.d.). Properties and Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents Based on Lactic Acid. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 25, 75-80.
64. El Kantar, S., N. Rajha, H., Boussetta, N., Vorobiev, E., G. Maroun, R., & Louka, N. (2019).
65. Wang, X., Wu, Y., Li, J., Wang, A., Li, G., Ren, X., et al. (2020). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Industrial Crops & Products*, 151, 112442
66. Erythropel, H. C., Zimmerman, J. B., de Winter, T. M., Petitjean, L., Melnikov, F., Ho Lam, C., et al. (2018). The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry*, 20 (9), 1929-1961.
67. Rajan, M., Prabhavathy, A., & Ramesh, U. (2015). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for *Zingiber officinale* Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. *The Natural Products Journal*, 5 (1), 3-13
68. Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Applied Sciences*, 9, 4169.
69. Yang, Z. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 168, 31-59.
70. Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., et al. (2019). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1- 29
71. Tao, Y., Li, W., Liang, W., & Van Breemen, R. B. (2009). Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21), 10014-10021.
72. Eismann, A. I., Reis, R. P., da Silva, A. F., & Cavalcanti, D. N. (2020). *Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions. *Algal Research*, 48, 101916.
73. İter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88.
74. Chen, M., Liu, T., Chen, X., Chen, L., Zhang, W., Wang, J., ... & Peng, X. (2012). Subcritical co-solvents extraction of lipid from wet microalgae pastes of *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2), 205-212.

75. Papu, N. H., Ahamed, M. S., Kumar, A., & Lingfa, P. (2020, November). Effect of different solvents and solvent to *Euglena sanguinea* biomass ratios on total lipid productivity. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2273, No. 1, p. 020006). AIP Publishing LLC.
76. Basar, A. O., Prieto, C., Durand, E., Villeneuve, P., Sasmazel, H. T., & Lagaron, J. (2020). Encapsulation of  $\beta$ -carotene by emulsion electrospraying using deep eutectic solvents. *Molecules*, 25(4), 981.
77. Zahrina, I., Nasikin, M., Krisanti, E., & Mulia, K. (2018). Deacidification of palm oil using betaine monohydrate-based natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 240, 490-495.
78. Patil, S. S., Pathak, A., & Rathod, V. K. (2021). Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, 105267.
79. Urquiaga, I. N. E. S., & Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, 33(2), 55-64.
80. Abd El-Baky, H. H., El-Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2009). Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *International journal of food science & technology*, 44(9), 1688-1695.
81. Abd El-Baky, H. H., El-Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2009). Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *International journal of food science & technology*, 44(9), 1688-1695.
82. Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
83. Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate polymers*, 56(2), 181-185.
84. Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y., & Chang, H. W. (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13(1), 1-7.
85. Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Fabiano Tixier, A. S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16), 3007.
86. De Jesus, S. S., Ferreira, G. F., Fregolente, L. V., & Maciel Filho, R. (2018). Laboratory extraction of microalgal lipids using sugarcane bagasse derived green solvents. *Algal research*, 35, 292-300.

87. Bermejo A.M., Lopez P., Alvarez I., Tabernero M.J., Fernandez P., (2006). Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 156, 2–8.
88. Teixeira, D. M., Patão, R. F., Coelho, A. V., & da Costa, C. T. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1103(1), 22-28.
89. Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927-934.
90. Newton, M. A., Brazier, J. B., Barreiro, E. M., Parry, S., Emmerich, H., Adrio, L. A., ... & Hii, K. K. M. (2016). Operando XAFS of supported Pd nanoparticles in flowing ethanol/water mixtures: implications for catalysis. *Green Chemistry*, 18(2), 406-411.
91. Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., & Zhang, H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
92. Tuvikene, R., Truus, K., Vaher, M., Kailas, T., Martin, G., & Kersen, P. (2006, March). Extraction and quantification of hybrid carrageenans from the biomass of the red algae *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus*. In *Proceedings-Estonian Academy of Sciences Chemistry* (Vol. 55, No. 1, p. 40). Truekitud Ou.