



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

Διπλωματική εργασία

**Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης καρπών
άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.) με χρήση φυσικών βαθέως
ευτηκτικών διαλυτών**

Μπον Αδαμαντία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δέτση Αναστασία, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, 2022

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά το Ακαδημαϊκό Έτος 2021-2022 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ.Αναστασίας Δέτση.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας Διπλωματικής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του θέματος και τη συνεχή καθοδήγησή της καθόλη την ενασχόλησή μου με αυτό. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διδάκτορα Ανδρομάχη Τζάνη και την Υποψήφια Διδάκτορα Στυλιανή Καλαφατέλη για τη συνεργασία, την καθοδήγηση σε κάθε στάδιο και τη συνεχή βοήθεια σε ό,τι χρειαζόμουν. Επιπλέον, ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Άννα Καραδένδρου για τη βοήθεια στο Εργαστήριο καθώς και όλη την εργαστηριακή ομάδα της κυρίας Δέτση, που σε οτιδήποτε χρειαζόμουν ήταν δίπλα μου. Ακόμη, ευχαριστώ την οικογένεια, τους φίλους μου και όλους τους προαναφερθέντες για τη ψυχολογική και ηθική στήριξη. Τέλος, ευχαριστώ θερμά τη Βιομηχανία KORRES A.E. Φυσικά Προϊόντα για την προσφορά της πρώτης ύλης.

Περίληψη

Το άγριο τριαντάφυλλο είναι μια φυτική πρώτη ύλη που αξιοποιείται από την αρχαιότητα για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, ενώ τα τελευταία χρόνια βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, αρωμάτων και καλλυντικών.

Οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) είναι μείγματα δύο ή περισσότερων φυσικών συστατικών που αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου, με αποτέλεσμα το σημείο τήξης των NaDES να είναι πολύ χαμηλότερο από αυτό των επιμέρους συστατικών. Έτσι, τα NaDES είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι διαλύτες φθινοί, εύκολα βιοαποικοδομήσιμοι, χαμηλής τοξικότητας, μη πτητικοί, χημικά και θερμικά σταθεροί, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πράσινους διαλύτες. Τα NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε διαδικασίες εκχύλισης, λόγω της ικανότητάς τους να διαλυτοποιούν τις ενώσεις-στόχους, έχοντας σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερη απόδοση από τους συμβατικούς διαλύτες, ενώ ταυτόχρονα δρουν σταθεροποιητικά και προστατευτικά για τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται. Επιπλέον, μπορούν να αποκτήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες (π.χ. πολικότητα, ιξώδες) μέσω του κατάλληλου συνδυασμού των συστατικών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη σε εργαστηριακή κλίμακα και η βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης καρπών άγριου τριαντάφυλλου (πιο συγκεκριμένα του υπανθίου) με χρήση ενός φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη ως εκχυλιστικού και αποθηκευτικού μέσου για τις ενώσεις-στόχους. Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τριών NaDES με τη μέθοδο θέρμανσης και ανάδευσης, που αποτελούνται από βεταΐνη ως δέκτη δεσμών υδρογόνου, γαλακτικό οξύ και γλυκερόλη ως δότες, ενώ ως τρίτο συστατικό στο ένα NaDES χρησιμοποιείται το νερό.

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε κάθε περίπτωση με βάση το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content, TFC) με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και τέλος την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη μέθοδο DPPH. Μετά από δοκιμές, επιλέχθηκε ο πιο κατάλληλος διαλύτης από τους τρεις, το NaDES Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό, για το οποίο διεξήχθησαν περαιτέρω πειράματα, για τη μελέτη των σημαντικότερων παραμέτρων εκχύλισης, με στόχο τη βελτιστοποίηση μέσω πειραματικού σχεδιασμού. Έγινε χαρακτηρισμός της δομής του NaDES αυτού με φασματοσκοπία υπερύθρου και προσδιορισμός της πολικότητάς του με χρήση του δείκτη Nile Red.

Τέλος, η διεργασία βελτιστοποιήθηκε μέσω πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiment, DoE) τύπου Box-Behnken, έχοντας τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές (χρόνος εκχύλισης, περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό και αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη) για τις αποκρίσεις που προαναφέρθηκαν. Ως σημαντικότερος παράγοντας κρίθηκε η αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη.

Λέξεις Κλειδιά: Άγριο Τριαντάφυλλο (*Rosa canina* L.), Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES), Εκχύλιση, Φαινολικές ενώσεις, Φλαβονοειδή, Αντιοξειδωτική δράση, Πειραματικός Σχεδιασμός Box-Behnken

Abstract

Wild rose is a plant raw material which has been used since antiquity for its antioxidant and anti-inflammatory properties, while in recent years it is applied in food, perfume and cosmetics industry.

Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) are mixtures of two or more ingredients of natural origin, which interact through hydrogen bonds, resulting in the melting point of NaDES being much lower than those of each component. Thus, NaDES are liquid at room temperature. They are low-cost solvents, easily biodegradable, of negligible toxicity, non-volatile, chemically and thermally stable. These characteristics make them green solvents. NaDES have been used extensively in extraction processes due to their ability to solubilize target compounds, having in some cases higher efficiency than conventional solvents, while at the same time protect and stabilize the phytochemicals of the extracts. In addition, they can acquire the desired properties (e.g. polarity, viscosity) through the appropriate combination of components.

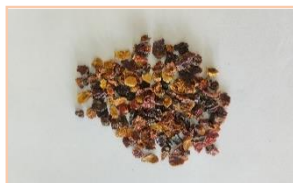
The aim of this diploma thesis is the development optimization of a process for the extraction of wild rose fruits (specifically hypanthium) using a natural deep eutectic solvent as an extraction and storage medium for the target compounds. Three NaDES were synthesized by heating and stirring method, consisting of betaine as the hydrogen bond acceptor, lactic acid and glycerol as donors, and water as the third component in one of the NaDES.

The extracts were assessed in each case based on their Total Phenolic Content (TPC) by Folin-Ciocalteu method, Total Flavonoid Content (TFC) by Aluminum Chloride method and their antioxidant activity by the DPPH method. After screening, the most suitable solvent was selected from the three above, specifically the NaDES Betaine: Glycerol: Water, which was used for further experiments, in order to study the most important extraction parameters, and to finally optimize the process by Design of Experiment. This NaDES was structurally characterized by infrared spectroscopy and its polarity was determined using the Nile Red dye.

Finally, the process was optimized through Box-Behnken Design of Experiment (DoE), with three independent variables (extraction time, water content in extraction solvent and raw material to solvent ratio) for the aforementioned responses. The most significant factor was found to be the raw material to solvent ratio.

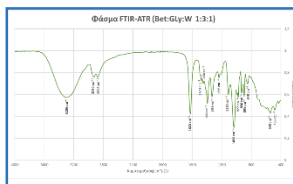
Keywords: Wild Rose (*Rosa canina* L.), Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES), Extraction, Phenolic compounds, Flavonoids, Antioxidant activity, Box-Behnken Design

Γραφική Απεικόνιση



Rosa canina L.

- ✓ Παραλαβή υπανθίου του καρπού
- ✓ Κονιοποίηση υπανθίου



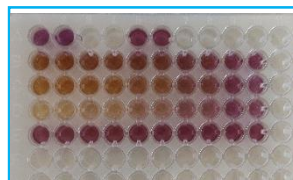
NaDES

- ✓ Παρασκευή με μέθοδο θέρμανσης και ανάδευσης
- ✓ Διάφοροι συνδιασμοί HBA - HBD
- ✓ Ανάλυση FTIR-ATR



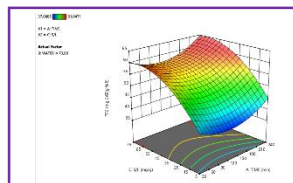
Εκχύλιση υπανθίου *R. canina* L.

- ✓ Χρήση NaDES ως διαλυτών
- ✓ Εύρεση του βέλτιστου NaDES για την εκχύλιση
- ✓ Συμβατική διαδικασία εκχύλισης



Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

- ✓ Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC)
- ✓ Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC)
- ✓ Αντιοξειδωτική Δράση



Σχεδιασμός Πειραμάτων (DoE)

- ✓ Σχεδιασμός Box Behnken
- ✓ Διαδικασία Βελτιστοποίησης

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος	1
Περίληψη	2
Abstract	3
Γραφική Απεικόνιση	4
Κατάλογος Γραφημάτων	10
Κατάλογος Εικόνων	16
Κατάλογος Πινάκων	16
Κατάλογος Σχημάτων	18
1 Θεωρητικό μέρος.....	19
1.1 Εισαγωγή.....	19
1.1.1 Βιοδραστικές ενώσεις	19
1.1.2 Αντιοξειδωτικές ενώσεις	19
1.2 <i>Rosa canina</i> L.....	21
1.2.1 Ιστορική αναδρομή	22
1.2.2 Γνωστές ενώσεις που περιέχονται στο <i>R. canina</i> L.....	22
1.2.2.1 Βιταμίνες.....	23
1.2.2.2 Καροτενοειδή.....	23
1.2.2.3 Φαινολικές ενώσεις.....	24
1.2.2.3.1 Φαινολικά οξέα	25
1.2.2.3.2 Φλαβονοειδή	25
1.2.2.4 Τριτερπενικά οξέα.....	27
1.2.2.5 Λιπαρά οξέα και γαλακτολιπίδια	27
1.2.2.5.1 Λιπαρά οξέα	27
1.2.2.5.2 Γαλακτολιπίδια.....	28
1.2.2.6 Άλλες ενώσεις.....	29
1.2.3 Ιδιότητες στα διάφορα μέρη του <i>R. canina</i>	30
1.2.4 Σύγκριση ενεργών συστατικών σε σπόρους και υπάνθιο	30
1.2.5 Διαφορές στα δραστικά συστατικά μεταξύ των ειδών	31
1.2.6 Βιολογικές δράσεις του <i>R. canina</i> L.....	31
1.2.6.1 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες	31
1.2.6.2 Αντιβακτηριδιακές Ιδιότητες	32
1.2.6.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες	32
1.2.6.4 Ιδιότητες στα μαλλιά και το δέρμα	32

1.2.6.5	Άλλες ιδιότητες	33
1.2.6.6	Τοξικότητα και παρενέργειες.....	34
1.2.7	Μέθοδοι εκχύλισης <i>Rosa canina</i> L.....	34
1.2.8	Μέθοδοι χαρακτηρισμού εκχυλισμάτων <i>Rosa canina</i> L.....	36
1.2.8.1	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων- Μέθοδος Folin-Ciocalteu	36
1.2.8.2	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων- Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου	37
1.2.8.3	Αντιοξειδωτική ικανότητα- Μέθοδος αναστολής της ρίζας DPPH...	37
1.3	Ανάγκη χρήσης πράσινων διαλυτών	38
1.3.1	Βαθέως ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)	39
1.3.2	Φυσικοί Βαθέως ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES)	40
1.3.3	Συστατικά και παρασκευή NaDES	41
1.3.3.1	Συστατικά NaDES	41
1.3.3.2	Μέθοδοι παρασκευής NaDES.....	42
1.3.4	Φυσικοχημικές ιδιότητες των NaDES	43
1.3.4.1	Θερμική συμπεριφορά	44
1.3.4.2	Πυκνότητα.....	44
1.3.4.3	Ιξώδες.....	45
1.3.4.4	Επιφανειακή τάση	46
1.3.4.5	Δείκτης διάθλασης	46
1.3.4.6	Αγωγιμότητα	47
1.3.4.7	Πολικότητα	47
1.3.4.8	Διαλυτοποιητική Ισχύς.....	48
1.3.4.9	Επίδραση του νερού.....	48
1.3.4.10	Τιμή pH.....	49
1.3.4.11	Πτητικότητα NaDES.....	49
1.3.5	Βιοαποικοδομησιμότητα NaDES	50
1.3.6	Τοξικότητα NaDES.....	50
1.4	Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων.....	51
1.4.1	Μέθοδοι εκχύλισης	52
1.4.1.1	Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	53
1.4.1.1.1	Διαβροχή	53
1.4.1.1.2	Χώνευση.....	53
1.4.1.1.3	Έγχυση	53

1.4.1.1.4	Αφέψημα	53
1.4.1.1.5	Εκχύλιση Soxhlet	54
1.4.1.2	Νέες μέθοδοι εκχύλισης	54
1.4.1.2.1	Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων	54
1.4.1.2.2	Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων.....	55
1.4.2	Πλεονεκτήματα χρήσης NaDES ως διαλυτών εκχύλισης	55
1.4.3	Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με χρήση NaDES.....	57
1.4.3.1	Θερμοκρασία.....	57
1.4.3.2	Μοριακή Δομή και Σύνθεση του DES.....	58
1.4.3.3	Ιξώδες.....	58
1.4.3.4	Περιεκτικότητα σε νερό	59
1.4.3.5	Χρόνος εκχύλισης	60
1.4.3.6	Το DES ως πρόσθετο ή πρόσθετο στο DES	60
1.4.3.7	Αναλογία διαλύτη/δείγματος	61
1.4.3.8	Τιμή pH.....	61
1.4.3.9	Ξήρανση, βαθμός άλεσης πρώτης ύλης.....	61
1.5	Εκχύλιση για εφαρμογή σε καλλυντικά	62
1.5.1	Εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες για εφαρμογή σε καλλυντικά	62
1.5.2	Εκχύλιση με NaDES για εφαρμογή σε καλλυντικά.....	63
1.5.3	Συστατικά των υπό μελέτη NaDES	64
1.5.3.1	Βεταΐνη.....	64
1.5.3.2	Γλυκερόλη.....	64
1.5.3.3	Γαλακτικό οξύ.....	65
1.6	Πειραματικός Σχεδιασμός.....	66
1.6.1	Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης.....	66
1.6.2	Σχεδιασμός Box Behnken	67
2	Πειραματικό μέρος	69
2.1	Σκοπός.....	69
2.2	Όργανα και αντιδραστήρια	69
2.3	Σύνθεση NaDES.....	70
2.3.1	Βεταΐνη:Γλυκερόλη 1:3	70
2.3.2	Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό 1:3:1.....	70
2.3.3	Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό* 1:2:2,5.....	70
2.4	Πειραματική διαδικασία.....	72
2.4.1	Εκχύλιση με χρήση NaDES.....	72

2.4.1.1	Άλεση πρώτης ύλης	72
2.4.1.2	Διεργασία εκχύλισης.....	72
2.4.1.2.1	Συνοπτική περιγραφή μεθοδολογίας εκχύλισης.....	72
2.4.1.2.1.1	Μεθοδολογία εκχύλισης με χρήση NaDES ως διαλύτη.....	72
2.4.1.2.1.2	Μεθοδολογία εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες	73
2.4.1.2.2	Επιλογή NaDES ως κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης	73
2.4.1.2.3	Επιλογή εύρους τιμών πειραματικών παραμέτρων εκχύλισης	73
2.4.2	Πειραματικός σχεδιασμός.....	74
2.4.3	Χαρακτηρισμός NaDES.....	75
2.4.3.1	Φασματοσκοπία Υπερύθρου	75
2.4.3.2	Πολικότητα	76
2.4.4	Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων	77
2.4.4.1	Μέτρηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC)	77
2.4.4.2	Μέτρηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	79
2.4.4.3	Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης.....	81
3	Αποτελέσματα και συζήτηση	84
3.1	Χαρακτηρισμός NaDES	84
3.1.1	Πυκνότητα	84
3.1.2	pH.....	84
3.1.3	Ιξώδες.....	86
3.2	Επιλογή NaDES για τη διαδικασία βελτιστοποίησης.....	87
3.3	Χαρακτηρισμός NaDES Bet:Gly:W 1:3:1	90
3.3.1	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (FTIR-ATR) 90	
3.3.2	Πολικότητα	91
3.4	Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων	92
3.4.1	Πρώτη σειρά πειραμάτων – Χρήση NaDES ως διαλύτη εκχύλισης.....	92
3.4.1.1	Προσδιορισμός εύρους περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη.....	92
3.4.1.2	Προσδιορισμός εύρους χρόνου εκχύλισης.....	93
3.4.1.3	Προσδιορισμός εύρους αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη.....	94
3.4.2	Πρώτη σειρά πειραμάτων - Χρήση συμβατικών διαλυτών εκχύλισης..	94
3.4.3	Δεύτερη σειρά πειραμάτων- Πειράματα Πειραματικού σχεδιασμού	95
3.4.3.1	Περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις	97
3.4.3.2	Περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή	98
3.4.3.3	Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων κατά τη μέθοδο DPPH....	99

3.4.3.4	Συγκριτική μελέτη αποτελεσμάτων	100
3.5	Πειραματικός σχεδιασμός	102
3.5.1	Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων	102
3.5.1.1	Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις	102
3.5.1.2	Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις	105
3.5.1.3	Αντιοξειδωτική δράση κατά τη μέθοδο DPPH (χρόνος επώασης 50 min)	107
3.6	Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης	109
3.7	Επιβεβαίωση μοντέλου	119
4	Συμπεράσματα	122
5	Προτάσεις για το μέλλον	124
6	Βιβλιογραφία	125
	Παράρτημα Ι	132
	Παράρτημα ΙΙ	143

Κατάλογος Γραφημάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (755nm).....	78
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (500nm).....	80
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:Gly 1:3 σε διάφορες συγκεντρώσεις.	84
Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1 σε διάφορες συγκεντρώσεις.	85
Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:La:W* 1:2:2,5 σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	86
Διάγραμμα 6: Γράφημα με τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με χρήση των τριών NaDES.	87
Διάγραμμα 7: Γράφημα με τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με χρήση των NaDES Bet:Gly:W και Bet:La:W* και τη χρήση συνδιαλύτη.	89
Διάγραμμα 8: Φάσμα FTIR-ATR του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1	90
Διάγραμμα 9: Φάσματα FTIR-ATR για τα NaDES Bet:Gly 1:3 και Bet:Gly:W 1:3:1	91
Διάγραμμα 10: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	104
Διάγραμμα 11: : Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	106
Διάγραμμα 12: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.....	108
Διάγραμμα 13: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.....	110
Διάγραμμα 14: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	111
Διάγραμμα 15: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	112
Διάγραμμα 16: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.....	113
Διάγραμμα 17: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.....	114
Διάγραμμα 18: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για	

βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	115
Διάγραμμα 19: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	116
Διάγραμμα 20: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	117
Διάγραμμα 21: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.	118
Διάγραμμα 22: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON6 για χρόνο επώασης 50 min.	132
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON6 για χρόνο επώασης 90 min.	132
Διάγραμμα 24: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON8 για χρόνο επώασης 50 min.	132
Διάγραμμα 25: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON8 για χρόνο επώασης 90 min.	133
Διάγραμμα 26: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON10 για χρόνο επώασης 50 min.	133
Διάγραμμα 27: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON10 για χρόνο επώασης 90 min.	133
Διάγραμμα 28: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON12 για χρόνο επώασης 50 min.	134
Διάγραμμα 29: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON12 για χρόνο επώασης 90 min.	134
Διάγραμμα 30: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON13 για χρόνο επώασης 50 min.	134
Διάγραμμα 31: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON13 για χρόνο επώασης 90 min.	135

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Απλοποιημένη ανατομία του καρπού <i>Rosa canina</i>	21
Εικόνα 2: Εικόνα του ανθού του <i>Rosa canina</i>	21
Εικόνα 3: Χρωματική αλλαγή κατά τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu.	36
Εικόνα 4: Χρωματική αλλαγή κατά τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.	37
Εικόνα 5: Χρωματική αλλαγή κατά την αντίδραση αναγωγής του DPPH.....	38
Εικόνα 6: Πρώτη ύλη άγριου τριαντάφυλλου (A) όπως παραλήφθηκε (B) κονιοποιημένη μετά από κόσκινο.	72

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Εργαστηριακά όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.....	69
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.	70
Πίνακας 3: Συστατικά και μοριακή αναλογία για τη σύνθεση των NaDES.....	71
Πίνακας 4: Διαδικασία συμπλήρωσης κυψελίδων στο plate 96 θέσεων.	82
Πίνακας 5: Πειραματικές πυκνότητες NaDES.	84
Πίνακας 6: Πειραματικές τιμές ιξώδους για τα τρία NaDES.	86
Πίνακας 7: Συγκριτική αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου του άγριου τριαντάφυλλου για τα τρία NaDES ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.	87
Πίνακας 8: Συγκριτική αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου άγριου τριαντάφυλλου για τα NaDES Bet:Gly:W και Bet:La:W* με τη χρήση συνδιαλύτη ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.....	88
Πίνακας 9: Αποτελέσματα πολικότητας του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1 για διάφορες περιεκτικότητες κατά μάζα σε νερό (% w/w).....	92
Πίνακας 10: 1 ^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα %w/w του διαλύτη εκχύλισης σε νερό.....	92
Πίνακας 11: 1 ^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας τη διάρκεια εκχύλισης.	93
Πίνακας 12: 1 ^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας την κατά βάρος αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη.....	94
Πίνακας 13: Συμβατικές εκχυλίσεις: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.	95

Πίνακας 14: Αντιστοίχιση μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού με τις κωδικοποιημένες μορφές.	95
Πίνακας 15: Συνθήκες εκχύλισης πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού και συμβολισμός αυτών κατά Box-Behnken.	96
Πίνακας 16: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων.	97
Πίνακας 17: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς το ολικό περιεχόμενο των φλαβονοειδών ενώσεων.	98
Πίνακας 18: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH.	99
Πίνακας 19: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.....	100
Πίνακας 20: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC). ..	102
Πίνακας 21: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC). ..	103
Πίνακας 22: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	105
Πίνακας 23: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	105
Πίνακας 24: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Quadratic Model που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.	107
Πίνακας 25: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.	108
Πίνακας 26: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις.....	109
Πίνακας 27: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδείς ενώσεις.....	113
Πίνακας 28: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις.....	116
Πίνακας 29: Πειραματικές συνθήκες και πειραματικές τιμές των αποκρίσεων για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου.....	120
Πίνακας 30: Πειραματικές τιμές ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών ενώσεων και αντιοξειδωτικής δράσης επώασης 50 για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου.....	120
Πίνακας 31: Συμβατική εκχύλιση με χρήση νερού: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.....	120

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Δομή ισοπρενίου.	23
Σχήμα 2: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών.....	26
Σχήμα 3: Μηχανισμός αντίδρασης αναγωγής του DPPH από φαινολική αντιοξειδωτική ένωση.....	38
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken για τρεις παράγοντες.	68

1 Θεωρητικό μέρος

1.1 Εισαγωγή

Τα βότανα και τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται χρόνια ως πηγή μιας μεγάλης ποικιλίας βιολογικά ενεργών ενώσεων. Το φυτικό ακατέργαστο υλικό ή οι ενώσεις του χρησιμοποιούνται εκτενώς για τη θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Αποτελούν αντικείμενο μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος, αλλά η εκχύλισή τους ως μέρος φυτοχημικών και βιολογικών ερευνών παρουσιάζει συγκεκριμένες προκλήσεις. Ένα φυτικό εκχύλισμα είναι ένα προϊόν με επιθυμητές ιδιότητες, που αφαιρείται από τους ιστούς ενός φυτού, συχνά με επεξεργασία του με διαλύτη, ώστε να χρησιμοποιηθεί για συγκεκριμένο σκοπό. Λόγω της μεγάλης χημικής ποικιλομορφίας τους, τα φυσικά προϊόντα παρέχουν απεριόριστες ευκαιρίες για ανακάλυψη νέων φαρμάκων[1].

1.1.1 Βιοδραστικές ενώσεις

Ο όρος «βιοδραστικό» είναι ένας εναλλακτικός όρος για το «βιολογικά ενεργό». Επομένως, μια βιοδραστική ένωση είναι απλώς μια ουσία με βιολογική δραστηριότητα[1].

Οι βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να είναι απαραίτητες (π.χ. βιταμίνες) και μη απαραίτητες (π.χ. πολυφαινόλες, αλκαλοειδή) ενώσεις που απαντώνται στη φύση, αποτελούν μέρος της τροφικής αλυσίδας και μπορούν να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία. Προέρχονται από διάφορες φυσικές πηγές όπως φυτά, ζώα, μικροοργανισμούς (π.χ. μύκητες) και θαλάσσιους οργανισμούς (π.χ. λειχήνες). Οι φυτοδραστικές ενώσεις συνήθως περιέχονται μέσα σε φυτικές μήτρες και συντίθενται σε μικρές ποσότητες και διαφορετικές συγκεντρώσεις σε όλα τα φυτικά όργανα ή μέρη, όπως φύλλα, ρίζες, φλοιοί, ξύλα, φρούτα, άνθη, ριζώματα, κλαδιά, καθώς και στο σύνολο του φυτού[1].

1.1.2 Αντιοξειδωτικές ενώσεις

Η οξείδωση είναι η χημική αντίδραση που περιλαμβάνει την απώλεια ηλεκτρονίων και την αύξηση του αριθμού οξείδωσης. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών, οι οποίες είναι ασταθείς ομάδες ατόμων με ασύζευκτα ηλεκτρόνια, εξαιρετικά αντιδραστικές και ικανές να ξεκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις, που αποσταθεροποιούν άλλα μόρια και δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες αναφέρονται επίσης ως δραστικά είδη οξυγόνου ή ROS (Reactive Oxygen Species) και δημιουργούν μια ομοιοστατική ανισορροπία, που προκαλεί οξειδωτικό στρες, κυτταρικό θάνατο και τον τραυματισμό ιστών. Τα ROS περιλαμβάνουν τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2 \cdot^-$), ρίζα υδροξυλίου ($OH \cdot$), ρίζα υπεροξειδίου ($RO_2 \cdot$), ρίζα υδροϋπεροξειδίου ($HO_2 \cdot$), ρίζα αλκοξειδίου ($RO \cdot$), ρίζα οξειδίου του αζώτου ($NO \cdot$), ρίζα διοξειδίου του αζώτου ($NO_2 \cdot$), ρίζα υπεροξειδίου λιπιδίου ($LOO \cdot$) αλλά και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το όζον (O_3), το υπεροξείδιο λιπιδίων ($LOOH$)[2].

Οι ελεύθερες ρίζες είναι γνωστό ότι σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της περιβαλλοντικής ρύπανσης, του στρες, του καπνού του τσιγάρου, του υπεριώδους φωτός, της ιονίζουσας ακτινοβολίας και των ξеноβιοτικών. Η τοξική επίδραση των ελεύθερων ριζών προκαλεί οξειδωτικό στρες και έχει ως αποτέλεσμα την παθογένεση ασθενειών[2,3]. Η συμμετοχή των ROS εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές και άλλες διαταραχές όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος του Πάρκινσον, η σκλήρυνση κατά πλάκας, το σύνδρομο Down, αλλά και ασθένειες όπως η δυσλειτουργία του εγκεφάλου, ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις[2].

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να ονομαστεί κάθε μόριο που αναστέλλει την οξείδωση ενός άλλου μορίου. Τα αντιοξειδωτικά συνήθως τερματίζουν πολλές αντιδράσεις, αφαιρώντας τις ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας άλλες αντιδράσεις οξείδωσης. Ανάλογα με την ισορροπία μεταξύ των ROS και της διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν ή να καθυστερήσουν την έναρξη ή τη διάδοση της οξειδωτικής αλυσιδωτής αντίδρασης και έτσι να αποτρέψουν ή να επιδιορθώσουν την κυτταρική βλάβη[2].

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή αντιοξειδωτικά. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά εμπλέκονται στην πρόληψη του σχηματισμού οξειδωτικών και δρουν καταστέλλοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών (π.χ. καταλάση, φεριτίνη, καροτενοειδή). Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά είναι σαρωτές των ROS, δρουν καταστέλλοντας την έναρξη της αλυσίδας και σταματούν τις αντιδράσεις διάδοσης αλυσίδας (αντιοξειδωτικά σάρωσης ριζών). Τα τριτογενή αντιοξειδωτικά επιδιορθώνουν τα οξειδωμένα μόρια (μερικά πρωτεολυτικά ένζυμα, ένζυμα του DNA) μέσω πηγών (π.χ. διαιτητικά αντιοξειδωτικά)[2].

Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενδογενή (π.χ. καταλάση, δισμουτάση υπεροξειδίου) ή εξωγενή, που προέρχονται από τη διατροφή[3]. Αρκετά βότανα, τροφές, λαχανικά, αναφέρονται ως πηγές εξωγενών αντιοξειδωτικών, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία διαφόρων παθολογικών ασθενειών και για αυτό απέκτησαν σημασία τόσο σε κλινικούς όσο και σε ερευνητικούς τομείς. Πολλές πολυφαινολικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή, ισοφλαβόνες, φλαβόνες, ανθοκυανίνες, κουμαρίνες, φαινολικά οξέα, βιταμίνες, έχουν αποκτήσει σημασία ως αντιοξειδωτικά. Αυτά δρουν δωρίζοντας ηλεκτρόνια στις ενδιάμεσες ρίζες που σχηματίζονται κατά το οξειδωτικό στρες ή τη βλάβη των ιστών, και βοηθούν στην αναστολή της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων[2,3]. Η κατανάλωση αυτών των προϊόντων φυτικής προέλευσης σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, καθώς και με χαμηλότερη θνησιμότητα[3]. Οι επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι τα τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικά και σαρωτές ριζών έχουν μια πιθανή προστατευτική δράση έναντι των διαταραχών που προκαλούνται από τα ROS[2].

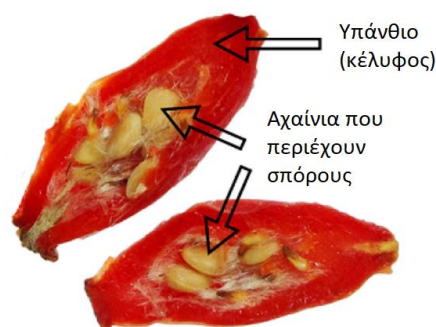
Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί συνθετικά αντιοξειδωτικά που ενσωματώνονται στα τρόφιμα, μαζί με ένα σταθερό σύστημα μέτρησης αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ώστε να συγκρίνονται με φυσικά αντιοξειδωτικά[2]. Γενικότερα, τα αντιοξειδωτικά είναι ένας τύπος πρόσθετων που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων με στόχο την πρόληψη οξειδωτικής αλλοίωσης των λιπιδίων και της απώλειας διατροφικών αξιών και ανάπτυξης οσμών στα τρόφιμα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνθετικά ή φυσικά αντιοξειδωτικά, με τα φυσικά να είναι πιο

εύκολα αποδεκτά. Τα πιο σημαντικά συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι το BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), το BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), το TBHQ (τετρ-βουτυλυδροκινόνη). Έχει αναφερθεί ότι σε όλα σχεδόν τα επεξεργασμένα τρόφιμα προστίθενται συνθετικά αντιοξειδωτικά, τα οποία αναφέρονται ως ασφαλή, αν και ορισμένες μελέτες αντιτίθενται σε αυτό το γεγονός σημειώνοντας πιθανές τοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις τους[2,3].

1.2 *Rosa canina* L.

Τα τελευταία χρόνια έχουν έρθει στο προσκήνιο μελέτες για την παραγωγή νέων εναλλακτικών προϊόντων που ξεχωρίζουν με τα λειτουργικά και αισθητικά τους χαρακτηριστικά, που ανταποκρίνονται στη ζήτηση των καταναλωτών για προϊόντα που επηρεάζουν θετικά την υγεία, αλλά και των παραγωγών για προϊόντα υψηλής οικονομικής αξίας[4].

Τα τριαντάφυλλα χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια στην παραγωγή τροφίμων και αρωμάτων και στη βιομηχανία καλλυντικών. Γενικότερα, τα τριαντάφυλλα είναι από τα σημαντικότερα κηπευτικά και βιομηχανικά προϊόντα με πολλαπλές χρήσεις. Ένα τέτοιο φυτό είναι το *Rosa canina* L., που ονομάζεται επίσης «κυνόροδο» (“dog rose”) ή άγριο τριαντάφυλλο. Το *Rosa canina* L. ανήκει στην οικογένεια Rosacea[5,6,7,8]. Τα ψευδο-φρούτα (pseudo fruits) του *R. canina*, που συχνά αναφέρονται στη γενική ιατρική βιβλιογραφία ως «φρούτα» (“fruits”), ονομάζονται “rose hips” και είναι ένα σύνολο καρπών που αποτελούνται από πολλά αχαίνια[6,9]. Τα αχαίνια είναι οι πραγματικοί καρποί των τριαντάφυλλων που περιέχουν σπόρους και περικλείονται από ένα κόκκινο, σαρκώδες άνθος, γνωστό ως υπάνθιο. Ενώ αυτοί οι καρποί υπάρχουν σε πολλά είδη τριαντάφυλλων και όχι μόνο στο *R. canina*, οι καρποί των *R. canina* είναι οι μοναδικοί με αποδεδειγμένη φαρμακευτική δράση[9].



Εικόνα 1: Απλοποιημένη ανατομία του καρπού *Rosa canina*.

Το κυνόροδο, ή *Rosa canina* L., φύεται σε ευρείες περιοχές στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και τη Δυτική Ασία, ενώ το γένος *Rosa* περιέχει πάνω από 100 είδη[5,6,10,11]. Είναι θάμνος πολυετής και φυλλοβόλος, ύψους 2-3 μέτρων και έχει λεπτούς μίσχους με αγκάθια. Τα χρώματα των λουλουδιών του ποικίλλουν από ανοιχτό έως σκούρο ροζ και λευκό και έχουν γλυκό άρωμα. Τα άνθη έχουν διάμετρο 4-6 εκατοστά με 5 πέταλα που τελικά ωριμάζουν σε καρπούς με κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα. Αυτό το φυτό είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε ακραίες



Εικόνα 2: Εικόνα του ανθού του *Rosa canina*.

περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τα φτωχά και ξηρά βραχώδη εδάφη και το περιορισμένο νερό[5,10].

Οι καρποί του *R. canina* έχουν μήκος 15–30 mm, αποτελούνται από περίπου 71% περικάρπιο και 29% σπόρους, ενώ το βάρος τους κυμαίνεται από 1,25 έως 3,25 g[5,6,12]. Αυτοί οι καρποί είναι πλούσιοι σε βιοδραστικές ενώσεις όπως βιταμίνη C, καροτενοειδή, φαινολικά οξέα, βιοφλαβονοειδή, οργανικά οξέα, αμινοξέα, αιθέρια έλαια και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, το *R. canina* έχει θεωρηθεί εναλλακτική πηγή λυκοπενίου, καθώς περιέχει 2,9-35,2 mg λυκοπενίου ανά 100 g. Οι σπόροι του περιέχουν 2,7–7,1% έλαιο (κυρίως ακόρεστα λιπαρά οξέα), 6,9–8,6% πρωτεΐνη και 0,22–0,44 mg ασκορβικού οξέος ανά 100 g σπόρων[5,13].

1.2.1 Ιστορική αναδρομή

Στην πραγματικότητα, το *R. canina* είναι γνωστό ως φαρμακευτικό φυτό για περισσότερα από 2.000 χρόνια. Αποτελείται από πολλά υποείδη και έχουν προταθεί αρκετές εξηγήσεις για τις ιδιότητές του που προάγουν την υγεία. Αυτές περιλαμβάνουν τη σύνθεση και τα χαρακτηριστικά του *R. canina*, όπως η περιεκτικότητά του σε φλαβονοειδή, καροτενοειδή και λιπαρά οξέα (FAs), η υψηλή περιεκτικότητά του σε βιταμίνες (ιδιαίτερα βιταμίνης C) καθώς και οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του[9,14].

Το φυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά ως φαρμακευτικό φυτό από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23–79 π.Χ.), ο οποίος συνάντησε τη χρήση του μεταξύ των γαλλικών εθνοτήτων για τη θεραπεία των δαγκωμάτων των σκύλων, οπότε και προέκυψε το όνομα του είδους (*Rosa canina*)[5,9]. Το *R. canina* χρησιμοποιήθηκε επίσης από μια Γερμανίδα στην Ευρώπη για να φτιαχθεί ένα είδος τσαγιού που θα μπορούσε να θεραπεύσει ορισμένες ασθένειες[5]. Το φυτό ήταν επίσης γνωστό από τους ναυτικούς ως μέσο προστασίας από το σκορβούτο, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε βιταμίνη C, και έτσι εξαπλώθηκε σε αρκετές ηπείρους[9].

Στη Σκανδιναβία, ήταν παράδοση να χρησιμοποιείται για την παρασκευή μαρμελάδων και σουπών, αν και αυτό δεν έχει συνδεθεί με τη βελτίωση της υγείας και δεν είχε γίνει σχεδόν καμία αναφορά για αντιφλεγμονώδη δράση. Μια εξήγηση μπορεί να είναι ότι τα βασικά συστατικά ή ορισμένες ενεργές ουσίες που ευθύνονται για την επίδραση στην υγεία, είναι ασταθείς και αποσυντίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, κατά το βράσιμό τους για την παρασκευή των προϊόντων αυτών, οι βιοδραστικές ουσίες αδρανοποιούνταν. Μια άλλη εξήγηση είναι ότι μόνο η σάρκα, και όχι οι σπόροι, των καρπών χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή τους[5,9].

1.2.2 Γνωστές ενώσεις που περιέχονται στο *R. canina* L.

Τα τελευταία χρόνια, με στόχο τον προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχονται στους καρπούς *R. canina*, έχουν ξεκινήσει αρκετές έρευνες που χρησιμοποιούν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, φασματομετρία μάζας σε σειρά, αέρια χρωματογραφία και ανίχνευση συστοιχίας διόδων. Από αυτές τις έρευνες, έχουν εντοπιστεί πολυάριθμες ενώσεις των καρπών *R. canina*[9]. Οι καρποί περιέχουν υψηλά επίπεδα βιταμινών (A, B1, B2, B6, C, D, E, και K), οργανικά

οξέα (ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ και μηλικό οξύ), καροτενοειδή (λυκοπένιο, β-κρυπτοξανθίνη, β-καροτίνη, ρουβιξανθίνη, γκαζανιαξανθίνη και ζεαξανθίνη), πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς και πολυφαινόλες (ταννίνες, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και ανθοκυανίνες)[5,7,15,16].

1.2.2.1 Βιταμίνες

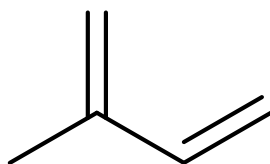
Οι βιταμίνες ορίζονται ως οργανικές ενώσεις που συντίθενται σε φυτά και σε ορισμένα κατώτερα ζώα, οι οποίες είναι απαραίτητες στη διατροφή των ανώτερων ζώων, σε ελάχιστες ποσότητες[9,17]. Οι βιταμίνες έχουν ποικίλες λειτουργίες στον οργανισμό, όπως συνενζυμική δραστηριότητα, πρόδρομη δράση, αντιοξειδωτική δράση, ρύθμιση της πρόσληψης ασβεστίου και φωσφόρου και ρύθμιση της πήξης αίματος, ενώ η ανεπάρκεια βιταμινών στον άνθρωπο οδηγεί σε πολυάριθμες ασθένειες και παθήσεις[9].

Οι βιταμίνες περιλαμβάνουν μια ομάδα πολύ διαφορετικών ενώσεων με διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Η διαλυτότητά τους ποικίλλει, καθώς ορισμένες από τις ενώσεις αυτές έχουν μεγάλους αριθμούς λειτουργικών ομάδων, ικανών να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό, ενώ άλλες δομές είναι μη πολικές[9].

Όπως προαναφέρθηκε, το *R.canina* είναι γνωστό μεταξύ άλλων φρούτων και λαχανικών για τη μεγάλη περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C[4,5,8,10,18,19]. Οι βιταμίνες A, B3, C (1000-12500 mg/kg στους καρπούς), D, E και K έχουν βρεθεί όλες σε εκχυλίσματα του τριαντάφυλλου. Οι βιταμίνες A, D, E και K είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες, ενώ οι βιταμίνες B και C είναι υδατοδιαλυτές[6,15,17]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και οι βιταμίνες B1, B2, B6 [6,15,19].

1.2.2.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπενοειδή, τα οποία απορροφούν φως μεταξύ 400 και 500 nm σε μήκος κύματος, οπότε και είναι εμφανή ως κόκκινο, πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα στα φυτά. Είναι σημαντικά μόρια συλλογής φωτός που μεταφέρουν ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και καταστέλλουν τις βλαβερές φωτοχημικές αντιδράσεις. Τα περισσότερα καροτενοειδή είναι δομές 40 ανθράκων με βασική δομική μονάδα, το ισοπρένιο[9].



Σχήμα 1: Δομή ισοπρενίου.

Τα χρώματα των καροτενοειδών συνδέονται άμεσα με τη δομή τους, δηλαδή από τον αριθμό των συζευγμένων διπλών δεσμών και την παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Τα καροτενοειδή γενικά χωρίζονται σε δύο υποομάδες: 1) ξανθοφύλλες, οι οποίες είναι μόρια που περιέχουν οξυγόνο (π.χ. λουτεΐνη, ζεαξανθίνη και κρυπτοξανθίνη) και είναι

συχνά κίτρινες και 2) καροτίνες, που είναι μη υδροξυλιωμένοι υδρογονάνθρακες (π.χ. άλφα-καροτίνη, βήτα-καροτίνη και λυκοπένιο) και είναι πορτοκαλί ή κόκκινες[9].

Αναφέρεται πως το *R. canina* είναι πλούσιο σε καροτενοειδή με κύρια το λυκοπένιο, τη β-κρυπτοξανθίνη, τη β-καροτίνη, τη ρουβιξανθίνη και τη ζεαξανθίνη [6,7,14,15,20].

Μελέτες σε καροτενοειδή έχουν δείξει βιοδραστικότητα, εφόσον αυτά συνδέονται με την αντιοξειδωση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*[3,9]. Για παράδειγμα, μελέτες λουτεΐνης και ζεαξανθίνης σε ανθρώπους δείχνουν ότι αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην ωχρά κηλίδα του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς και μπορεί να παίζουν ρόλο στην προστασία αυτής αλλά και των εξωτερικών τμημάτων του φωτοϋποδοχέα του αμφιβληστροειδούς από το οξειδωτικό στρες. Είναι ενδιαφέρον ότι η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη είναι επίσης συστατικά του τριαντάφυλλου και εθελοντές με εκφύλιση της ωχράς κηλίδας που λάμβαναν προϊόν με σπόρους και υπάνθιο άγριου τριαντάφυλλου, ισχυρίστηκαν βελτίωση της όρασης[9].

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των καροτενοειδών είναι άμεση συνέπεια της δομής τους, καθώς αποτελούνται από ένα εξαιρετικά αντιδραστικό σύστημα συζευγμένων διπλών δεσμών πλούσιο σε ηλεκτρόνια, που τους επιτρέπει να σχηματίζουν σταθεροποιημένες ρίζες από ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια[9].

1.2.2.3 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες ορίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι παράγωγα των μονοπατιών της φωσφορικής πεντόζης, του σικιμικού και του φαινυλοπροπανοειδούς στα φυτά. Αυτές οι ενώσεις είναι μια από τις πιο ευρέως εμφανιζόμενες ομάδες φυτοχημικών και έχουν φυσιολογική και μορφολογική σημασία στα φυτά. Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή και μπορούν να παρέχουν προστασία από αρπακτικά και παθογόνα[21,22]. Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών ιδιοτήτων για την υγεία, όπως αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις. Αρκετές ευεργετικές επιδράσεις που προέρχονται από φαινολικές ενώσεις οφείλονται κυρίως στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες τους επιτρέπουν να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου και αναστολείς του μονοατομικού οξυγόνου. Δρουν επίσης ως χηλικοί παράγοντες μεταλλικών ιόντων, αποτρέποντας τον καταλύσιμο από μέταλλα σχηματισμό ελεύθερων ριζών[22].

Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο, που φέρει έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες και κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως εξαιρετικά πολυμερισμένες ενώσεις. Οι περισσότερες φυσικώς απαντώμενες πολυφαινολικές ενώσεις υπάρχουν ως συζυγή με μονο- και πολυσακχαρίτες, συνδεδεμένους με μία ή περισσότερες από τις φαινολικές ομάδες, ενώ μπορεί επίσης να εμφανίζονται ως λειτουργικά παράγωγα, όπως εστέρες και μεθυλεστέρες[22].

1.2.2.3.1 Φαινολικά οξέα

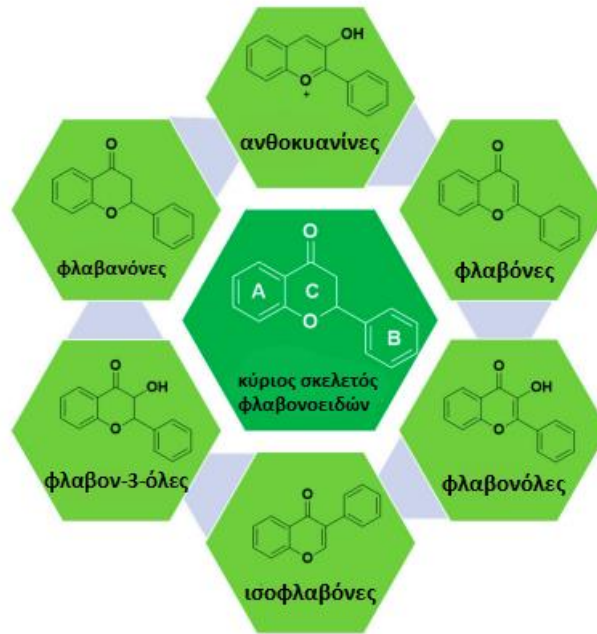
Τα φαινολικά οξέα περιγράφουν τις φαινόλες που διαθέτουν λειτουργικότητα ενός μονοκαρβοξυλικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα περιέχουν δύο χαρακτηριστικές δομές άνθρακα: τις υδροξυκιναμικές και τις υδροξυβενζοϊκές. Ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο δημιουργεί μια ποικιλία δομών και ενώσεων. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα έχουν κοινή δομή C6–C1, με πιο γνωστά το γαλλικό, π-υδροξυβενζοϊκό, πρωτοκατεχοϊκό, βανιλικό και συριγγικό οξύ. Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα είναι αρωματικές ενώσεις με πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων (C6–C3), με τα πιο γνωστά να είναι το καφεϊκό, το φερουλικό, το π-κουμαρικό και το σιναπικό οξύ[22].

Τα φαινολικά οξέα στα φυτά έχουν συνδεθεί με διάφορες λειτουργίες, όπως η πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, η σύνθεση πρωτεϊνών, η ενζυμική δραστηριότητα και η φωτοσύνθεση. Το ενδιαφέρον όμως για τις ενώσεις αυτές επικεντρώνεται στον προστατευτικό τους ρόλο έναντι ασθeneιών οξειδωτικής βλάβης, όπως η στεφανιαία νόσος, ο καρκίνος και τα εγκεφαλικά επεισόδια[22].

Τα φαινολικά οξέα που επικρατούν στο άγριο τριαντάφυλλο εξηγούν την ξινή στυφή γεύση του[10]. Έχουν αναφερθεί μεταξύ άλλων στο *R.canina* γαλλικό, χλωρογενικό, t-καφεϊκό, p-κουμαρικό, ελλαγικό, συριγγικό, ροσμαρινικό, βανιλικό, φερουλικό, σαλικυλικό οξύ [3,4,6,14,23]. Αναφέρεται πως ορισμένα φαινολικά οξέα δεν έχουν ανιχνευθεί σε όλα τα εκχυλίσματα (για παράδειγμα ανιχνεύθηκαν σε αλκοολικά και όχι σε υδρομεθανολικά εκχυλίσματα), γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται τα φυτά, ή στην ωρίμανσή τους που μπορεί να συμβάλει στη συσσώρευση φαινολικών ενώσεων[23].

1.2.2.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φυτικών φαινολικών, αντιπροσωπεύοντας πάνω από τις μισές από τις οκτώ χιλιάδες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στη φύση[22]. Τα φλαβονοειδή μπορούν να οριστούν ως φαινολικές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος, δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται σε διάφορα φυτά. Ανήκουν στην ομάδα των φαινολοπροπανοειδών και αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα σε διάταξη C6–C3–C6[9,21,22]. Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους Α και Β, που ενώνονται με μια γέφυρα 3 ανθράκων, συνήθως με τη μορφή ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου[21,22]. Μπορούν να έχουν διάφορους υποκαταστάτες, με τους πιο συνηθισμένους να είναι τα σάκχαρα, καθώς τα περισσότερα φλαβονοειδή υπάρχουν φυσικά ως γλυκοσίδες[9,21]. Άλλες υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν οξυγόνωση, αλκυλίωση, ακυλίωση και θείωση[22]. Οι παραλλαγές στα πρότυπα υποκατάστασης του δακτυλίου C έχουν ως αποτέλεσμα τις κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών: 1) ανθοκυανίνες, 2) φλαβόνες, 3) φλαβανόλες, 4) ισοφλαβόνες, 5) φλαβον-3-όλες και 6) φλαβανόνες[9,22,24]. Η πιο διαδεδομένη ομάδα των έγχρωμων φλαβονοειδών είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι βήτα-γλυκοσίδες που έχουν σάκχαρα στη θέση 3[9].



Σχήμα 2: Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών.

Τα τελευταία χρόνια, η βιβλιογραφία τεκμηρίωσε ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων των φλαβονοειδών στα διάφορα συστήματα του ανθρώπινου σώματος. Μεταξύ αυτών, αναφέρονται νευροπροστατευτικές, αντισπασμωδικές επιδράσεις στο ΚΝΣ, πρόληψη και θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων και παχυσαρκίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν στους βιολογικούς στόχους που εμπλέκονται στο διαβήτη τύπου 2, τη φλεγμονή και τις διαδικασίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί, αντιμικροβιακοί, αντιμεταλλαξιογόνοι, αντιθρομβωτικοί και αντιμυκητιασικοί παράγοντες[21,22]. Αντίθετα, ορισμένα φλαβονοειδή έχουν συσχετιστεί με μείωση της θρεπτικής αξίας ορισμένων τροφίμων και ζωοτροφών. Οι εξηγήσεις για το αρνητικό αποτέλεσμα έχουν βασιστεί στην ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, υδατάνθρακες και πεπτικά ένζυμα[9].

Μια άλλη κύρια λειτουργία των φλαβονοειδών είναι η προστασία των κυττάρων από την υπεριώδη ακτινοβολία Β (UV-B). Συσσωρεύονται σε επιδερμικά στρώματα και αξιοποιούν την καταστροφική ακτινοβολία UV-B, ενώ επιτρέπουν στα ορατά μήκη κύματος να περάσουν. Πράγματι, το έλαιο από σπόρους τριαντάφυλλου, το οποίο είναι επίσης πλούσιο σε φλαβονοειδή, χρησιμοποιείται για την προστασία του δέρματος από τα ηλιακά εγκαύματα σε πολλές χώρες[9].

Οι φλαβόνες και οι φλαβανόλες απορροφούν φως σε μικρότερα μήκη κύματος από τις ανθοκυανίνες και τα καροτενοειδή. Ως αποτέλεσμα, δεν είναι ορατές στο ανθρώπινο μάτι. Μπορούν, ωστόσο, να είναι ορατές σε έντομα που βλέπουν τόνους υπεριώδους ακτινοβολίας στο φάσμα φωτός, καθώς έχουν συσχετιστεί με μοτίβα UV στα λουλούδια, που ονομάζονται «οδηγοί νέκταρ». Οι ισοφλαβόνες έχει αποδειχθεί ότι έχουν διάφορες βιολογικές δράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν επίσης αντιμικροβιακές και εντομοκτόνες ιδιότητες[9].

Μεταξύ των φλαβονοειδών στα φυτά, η κερκετίνη και η καμπφερόλη είναι σημαντικές και οι πιο κοινές. Αυτές οι δραστικές ενώσεις εμφανίζονται συνήθως ως γλυκοσίδες με το τμήμα σακχάρου δεσμευμένο στη θέση C-3. Στους καρπούς του *R. canina* υπάρχουν κυρίως γλυκοσιδικά παράγωγα της κερκετίνης: η κερκιτρίνη (κερκετίνη-3-O-ραμνοσίδη), η ισοκερκιτρίνη (κερκετίνη-3-O-γλυκοσίδη) και η υπεροσίδη (κερκετίνη-3-O-γαλακτοσίδη)[14,18]. Η κερκετίνη είναι ένα από τα λίγα φλαβονοειδή που παρουσιάζει ενδιαφέρουσες βιοδραστικές ιδιότητες *in vitro* και σε ορισμένες δοκιμές *in vivo*, έχει αντιθρομβωτικά αποτελέσματα και χαλαρώνει τους λείους μύες του καρδιαγγειακού[9]. Η κερκιτρίνη μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και επομένως μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ανάπτυξης νέων κυττάρων στο σώμα[17].

Το *R. canina* περιέχει επίσης το φλαβονοειδές τιλοροζίτη (καμπφερόλη 3-O-β-d-(6-π-κουμαρυλ)-γλυκοκυρανοσίδη) που αναστέλλει την οξείδωση της ανθρώπινης LDL *in vitro* και έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει σημαντικές αντιπαχυσαρκικές, αντιοξειδωτικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες στον άνθρωπο[9].

Άλλα φλαβονοειδή που περιέχονται στο *R. canina* είναι η κατεχίνη (η οποία συχνά αξιοποιείται και ως ουσία αναφοράς για τον υπολογισμό του περιεχομένου σε ολικές φλαβονοειδείς ενώσεις) και η επικατεχίνη[14].

1.2.2.4 Τριτερπενικά οξέα

Τα τριτερπένια είναι μια από τις πιο πολυάριθμες και ποικίλες ομάδες φυσικών φυτοχημικών και περιλαμβάνουν περισσότερα από 4.000 διαφορετικά πολύπλοκα μόρια. Ορισμένα απλά τριτερπένια μπορεί να δρουν ως μόρια σηματοδότησης, ενώ τα πολύπλοκα γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια ή οι σαπωνίνες παρέχουν προστασία από παθογόνα και παράσιτα. Επομένως, τα τριτερπένια έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στους τομείς των τροφίμων, της υγείας και της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας. Τα τριτερπένια δεν θεωρούνται απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη. Μεταξύ των συστατικών του *R. canina* υπάρχουν τόσο τα απλά όσο και τα συζευγμένα τριτερπένια[9].

Τα κυριότερα τριτερπενικά οξέα που έχουν εντοπιστεί, σε μικρές όμως ποσότητες, στο *R. canina* είναι το ουρσολικό, το ολεανολικό και το βετουλινικό οξύ[9]. Τα τριτερπενικά οξέα αναφέρεται πως έχουν θετικές επιδράσεις στη ρευματοειδή αρθρίτιδα[3].

1.2.2.5 Λιπαρά οξέα και γαλακτολιπίδια

1.2.2.5.1 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα (Fatty Acids - FA) περιέχουν υδρογονανθρακικές αλυσίδες διαφόρων μηκών και βαθμών κορεσμού, που καταλήγουν σε μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Τα FA είναι βασικά συστατικά των λιπιδίων, τα οποία εξ ορισμού είναι βιομόρια, αδιάλυτα στο νερό, αλλά εξαιρετικά διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια είναι βασικά

συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ τα τριγλυκερίδια είναι τα κύρια αποθηκευτικά λιπίδια τόσο των φυτών όσο και των ζώων[9]. Μέσω των φυτών και των φρούτων, ο άνθρωπος λαμβάνει τα βασικά λιπαρά οξέα, τα οποία ο ίδιος δεν μπορεί να συνθέσει, αλλά πρέπει να λάβει μέσω της διατροφής[10].

Στα ζωικά τριγλυκερίδια, τα FA είναι συχνά κορεσμένα (δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μορίων με γραμμικές αλυσίδες που συσσωρεύονται σφιχτά και δημιουργούν στερεά λίπη. Αντίθετα, τα FA στα φυτά είναι συχνά ακόρεστα και για αυτότα προκύπτοντα μόρια λιπιδίων τείνουν να είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου και ονομάζονται έλαια. Τα λίπη και τα έλαια παίζουν ζωτικό ρόλο στη διατροφή και στη βιομηχανία τροφίμων, όπου χωρίζονται σε ομάδες ανάλογα με το βαθμό κορεσμού τους[9].

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (PUFA) που προέρχονται από λινολενικό, λινολεϊκό και ελαϊκό οξύ. Αυτές οι χημικές ουσίες ρυθμίζουν πολλές λειτουργίες του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης, του ιξώδους του αίματος, του ανοσοποιητικού και των φλεγμονωδών αποκρίσεων[10]. Είναι ευρέως γνωστό ότι το α-λινολενικό και το λινολεϊκό οξύ είναι δύο απαραίτητα λιπαρά οξέα που χρειάζονται οι άνθρωποι[9].

Οι σπόροι των φρούτων του *R. canina* είναι πλούσιοι σε α-λινολενικό οξύ (cis-C 18:3 ω-3) και λινολεϊκό οξύ (cis-C 18:2 ω-6) [9,14,19]. Η εκτεταμένη έρευνα για τη φυσιολογική σημασία των PUFA δείχνει τα πολυάριθμα οφέλη τους για την υγεία, τα οποία περιλαμβάνουν μείωση των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στο αίμα, αναστολή της θρόμβωσης, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, μειωμένες καρδιαγγειακές παθήσεις και αναστολή της φλεγμονής[9].

Επιπλέον, στα *R. canina* έχει αναφερθεί το παλμιτικό (C 16:0), ελαϊκό (C 18:1 ω-9), στεατικό (C 18:0), αραχιδικό (C 20:0), λαουρικό (C 12:0) και μυριστικό (C 14:0) οξύ [3,9,14,19].

1.2.2.5.2 Γαλακτολιπίδια

Τα γαλακτολιπίδια είναι γλυκολιπίδια στα οποία το μόριο σακχάρου, η γαλακτόζη, είναι συνδεδεμένο με τη λιπιδική γλυκερόλη. Τα γαλακτολιπίδια είναι ιδιαίτερα άφθονα στις θυλακοειδείς μεμβράνες των φυτών[9]. Είναι ενώσεις που συσσωρεύονται στην πλασματική μεμβράνη των φυτών και τα διακρίνουν από τη λιπιδική σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών των ζώων και των μυκήτων[3].

Μέσω ερευνών διαπιστώθηκε ότι ορισμένα γαλακτολιπίδια έχουν αντιφλεγμονώδη δράση καθώς και αντιογκογόνο ρόλο[3]. Το γαλακτολιπίδιο, (2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9-12-15-trienoyl]-3-O-β-d-galactopyranosyl glycerol, επίσης γνωστό ως GOPO, έχει απομονωθεί από το *R. canina* και έχει δείξει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση[3,9]. Επιπλέον, έχει απομονωθεί από τους καρπούς *R. canina* το γαλακτολιπίδιο 1,2-di-O-α-linolenoyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-sn-glycerol [3].

Τα FA και το γαλακτολιπίδιο GOPO που υπάρχουν στους καρπούς του *R. canina* μπορούν να εξηγήσουν κάποια από τη βελτίωση που παρατηρείται σε ασθενείς με φλεγμονώδεις ασθένειες[9].

1.2.2.6 Άλλες ενώσεις

Η βήτα-σιτοστερόλη είναι μια φυτοστερόλη που υπάρχει στους καρπούς του *R. canina* και πιστεύεται ότι αναστέλλει την απορρόφηση της διατροφικής χοληστερόλης. Αρκετές αναφορές έχουν εμφανιστεί στη βιβλιογραφία, υποδεικνύοντας ότι οι φυτοστερόλες έχουν ανοσολογικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού[9].

Οι καρποί, και ειδικότερα οι σπόροι τους, έχουν υψηλές ποσότητες διαιτητικών ινών, όπως η πηκτίνη. Οι διαιτητικές ίνες επιβραδύνουν την κίνηση της τροφής μέσω του εντερικού σωλήνα, προάγοντας την καλύτερη πέψη και την αυξημένη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών[9].

Οι καρποί του *R. canina* περιέχουν και μια μικρή ποσότητα ταννινών[17]. Οι ταννίνες είναι ενώσεις σχετικά υψηλού μοριακού βάρους, οι οποίες αποτελούν την τρίτη σημαντική ομάδα φαινολικών ενώσεων και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες ταννίνες[22]. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτά. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι εστέρες γαλλικού οξέος, ενώ οι συμπυκνωμένες είναι πολυμερή του μονομερούς πολυυδροξυφλαβαν-3-όλη. Σημειώνεται πως η μακροχρόνια κατάποση μεγάλων ποσοτήτων ορισμένων φυτικών υλικών που περιέχουν ταννίνες μπορεί να είναι καρκινογόνος, ενώ οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τις ταννίνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν άμυνα έναντι αυτού[17,22]. Ταυτόχρονα όμως, η σύνδεση των ταννινών με πρωτεΐνες και βασικές ενώσεις, όπως αλκαλοειδή ή ιόντα βαρέων μετάλλων, κρίνεται σημαντική σε περιπτώσεις δηλητηρίασης από αλκαλοειδή. Κατά τη σύνδεσή τους, οι ταννίνες τις καθιστούν αδιάλυτες και προκαλούν καθίζηση[17,22].

Επιπλέον, το *R. canina* περιέχει και οργανικά οξέα (συμπεριλαμβανομένου και του ασκορβικού οξέος/βιταμίνης C), όπως το οξαλικό, το ταρταρικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ, σε μικρές ποσότητες[14,15]. Το κιτρικό οξύ είναι ένα αντιοξειδωτικό και κύριο συστατικό του κύκλου του κιτρικού οξέος, το οποίο είναι πηγή βιοσυνθετικών πρόδρομων ουσιών και απαραίτητο για τον οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης και άλλων απλών σακχάρων. Το μηλικό οξύ λειτουργεί σε καλλυντικά σκευάσματα ως ρυθμιστής pH. Το άλας του μηλικού νατρίου λειτουργεί ως παράγοντας περιποίησης του δέρματος. Το μηλικό οξύ έχει αναφερθεί ότι χρησιμοποιείται σε περισσότερες από 50 καλλυντικές συνθέσεις σε μια σειρά τύπων προϊόντων, ενώ αποδείχθηκε ότι είναι σχετικά μη τοξικό σε μελέτες οξείας τοξικότητας σε ζώα[17].

Περιέχονται ακόμα σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη. Τοκοφερόλες που έχουν εντοπιστεί είναι οι α -, β -, γ -, δ -τοκοφερόλη[14].

Τέλος, οι καρποί περιέχουν μεταλλικά θρεπτικά συστατικά, κυρίως N, K, P, S, Mg, Ca, και Zn[3,6,14].

Τα τρέχοντα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα φλαβονοειδή (ιδιαίτερα η τιλιοροζίτη), το GOPO και τα PUFA (το λινολεϊκό και το α -λινολενικό οξύ) είναι από τα πιο ενδιαφέροντα συστατικά[9].

1.2.3 Ιδιότητες στα διάφορα μέρη του *R. canina*

Τα άνθη, τα φύλλα, οι ρίζες, τα κλαδιά και οι καρποί του *Rosa canina* είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται γενικά για την πρόληψη και τη θεραπεία εκφυλιστικών ασθενειών, όπως κρυολόγημα, διάφορες φλεγμονώδεις διαταραχές αρθρίτιδας, ρευματισμοί, γαστρεντερικές διαταραχές, καρκίνος, λοιμώξεις και χρόνιοι πόνοι[4,15]. Πρέπει να σημειωθεί ότι διαφορετικά μέρη αυτού του φυτού έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Η ρίζα του, για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του βήχα, των αιμορροΐδων και της δυσουρίας. Τα φύλλα του έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του κρυολογήματος, της γρίπης και του βήχα. Τα κλαδιά του είναι χρήσιμα στη θεραπεία της ουρολιθίασης. Τα άνθη της τριανταφυλλιάς έχουν αντιβακτηριδιακή, στυπτική, τονωτική και αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιούνται για ήπια φλεγμονή του δέρματος ή του βλεννογόνου του στόματος και του λαιμού. Ο καρπός του έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του άσθματος, της βρογχίτιδας και του κοινού κρυολογήματος. Τέλος, οι σπόροι του έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας, των ρευματισμών και της ουρικής αρθρίτιδας[5,6]. Επιπλέον, το τσάι που παρασκευάζεται από καρπούς έχει ήπιες καθαρτικές και διουρητικές τάσεις και βοηθά στη ρύθμιση του έμμηνου κύκλου, ενώ το τσάι από φύλλα και πέταλα είναι καταπραϋντικό για το δέρμα και μπορεί να βοηθήσει στην επούλωση των εξανθημάτων και των εκδορών[23].

1.2.4 Σύγκριση ενεργών συστατικών σε σπόρους και υπάνθιο

Η ποσότητα των βιοδραστικών ενώσεων ποικίλλει σε διαφορετικά μέρη του άγριου τριαντάφυλλου[5]. Μέσω έρευνας έγινε σύγκριση δύο προϊόντων τριαντάφυλλου, ενός καθαρού προϊόντος με το υπάνθιο του καρπού και ενός προϊόντος που περιέχει το υπάνθιο αλλά και τους σπόρους[9].

Παρατηρήθηκε πως τα FA βρίσκονται κυρίως στους σπόρους του καρπού. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και βήτα-καροτένιο ήταν σχεδόν ίδια και στα δύο προϊόντα. Αναφέρεται πως οι ποσότητες σε τριτερπενοειδή, γαλακτολιπίδια, λυκοπένιο και βιταμίνη E ήταν υψηλότερες στο προϊόν μόνο με υπάνθιο, υποδεικνύοντας την κυριαρχία αυτών των συστατικών σε αυτό το τμήμα του καρπού[5,9]. Τα φλαβονοειδή υπάρχουν στον ίδιο βαθμό στους σπόρους και στο υπάνθιο του καρπού, ωστόσο η κατανομή τους είναι διαφορετική[9].

Στους σπόρους των καρπών, το λινολεϊκό και το α-λινολενικό οξύ βρίσκονται ως μέρος των τριγλυκεριδίων και επομένως δεν είναι ελεύθερα FA. Γενικά, τα τριγλυκερίδια των FA μακράς αλυσίδας έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα (Δείκτης Merck), ενώ τα ελεύθερα FA μπορούν εύκολα να σχηματίσουν άλατα, οπότε και έχουν βελτιωμένη διαλυτότητα. Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να εξηγήσουν ορισμένες από τις ασυνέπειες που παρουσιάζονται στις βιοδοκιμές, όταν τα εκχυλίσματα από σπόρους συγκρίνονται με εκχυλίσματα από υπάνθια καρπών ή από συνδυασμένα παρασκευάσματα σπόρων και υπανθίου[9].

1.2.5 Διαφορές στα δραστικά συστατικά μεταξύ των ειδών

Το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται τα διάφορα είδη *R. canina* (καιρικές συνθήκες, γεωγραφική θέση, είδος λίπανσης, το υψόμετρο, το έδαφος και η ποσότητα βροχής) επηρεάζουν τη βιοχημική σύνθεση του φυτού και συνεπώς την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Επιπλέον, οι παραλλαγές των δραστικών συστατικών επηρεάζονται από τη μεθοδολογία ξήρανσης του καρπού, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας ξήρανσης και του χρονικού σημείου συγκομιδής, αλλά και από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση και την εκχύλιση του[3,5,7,9].

Οι κονιοποιημένοι καρποί παρουσιάζουν επίσης διαφορές στο χρώμα και τη μυρωδιά, ανάλογα με τη μέθοδο παραγωγής, την ποιότητα και την ποσότητα των διαφορετικών συστατικών. Έτσι, οι σκόνες μπορεί να είναι καφέ (ενδεχομένως να προκαλείται από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την παραγωγή), καθώς ορισμένες εγκαταστάσεις ξήρανσης χρησιμοποιούν θερμοκρασίες έως και 800°C, ενώ άλλες μπορεί να είναι πορτοκαλί, ειδικά όταν διατηρούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες επεξεργασίας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το χρώμα καθορίζεται επίσης από την ποσότητα των σπόρων και των υπανθίων[9].

1.2.6 Βιολογικές δράσεις του *R. canina* L.

Ο καρπός του *Rosa canina* L. έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παθήσεων λόγω των βιολογικών του δράσεων όπως ανοσοκατασταλτικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαρθριτικές, αναλγητικές, αντιδιαβητικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, γαστροπροστατευτικές και βελτιωτικές επιδράσεις του δέρματος[4,6,7,14].

1.2.6.1 Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες

Οι αντιοξειδωτικές δράσεις του *Rosa canina* L. δεν οφείλονται μόνο στην υψηλή ποσότητα βιταμίνης C αλλά και στην πλούσια περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ανθοκυανιδίνες, φλαβονοειδή, βιταμίνη E και καροτενοειδή [3,5,14].

Μεταξύ των υδατοδιαλυτών φυτοχημικών ξεχωρίζουν οι φαινολικές ενώσεις και το ασκορβικό οξύ. Το ελλαγικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως αντιοξειδωτικό, ενώ αναφέρεται πως έχει και αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινογόνο δράση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η κερκετίνη και το παράγωγό της, κερκετίνη-3-O-γλυκουρονίδιο, αναστέλλουν την υπερπαραγωγή των ROS, προκαλώντας χημειοπροστασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας, μέσω αντιοξειδωτικών δράσεων[3].

Εκτός από τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, υπάρχουν επίσης λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως τα καροτενοειδή και οι τοκοφερόλες, αν και αυτές οι ενώσεις έχουν μελετηθεί λιγότερο και η γνώση είναι πιο περιορισμένη σε σχέση με άλλες βιοδραστικές ουσίες. Οι τοκοφερόλες, τα α-, β-, γ- και δ-ισομερή και οι τοκοτριενόλες

έχουν δράση βιταμίνης E και είναι ενώσεις με ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών[3].

Αναφέρεται πως η ικανότητα του καρπού στη σάρωση του H₂O₂ είναι περίπου 87,26 %, πολύ μεγαλύτερη από αυτή του BHA (butylated hydroxyanisole) (0,03 %) και του BHT (butylated hydroxytoluene) (0,14 %), τα οποία είναι γνωστά αντιοξειδωτικά[14].

1.2.6.2 Αντιβακτηριδιακές Ιδιότητες

Η αντιβακτηριδιακή δράση του *R. canina* έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές επιστημονικές έρευνες. Μια μελέτη που εξέτασε την αντιβακτηριακή δράση ορισμένων ειδών τριανταφυλλιάς αποκάλυψε ότι οι δραστηριότητές τους αυτές διέφεραν στα αιθανολικά εκχύλισματα και ότι το *R. canina* είχε τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα[5]. Η σημαντική αντιβακτηριδιακή τους δράση προέρχεται από τις φαινολικές και ορισμένες άλλες ενώσεις τους, ενώ σημαντικό κρίνεται το ελλαγικό οξύ[3,5]. Οι αντιβακτηριδιακές ενώσεις μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης, τη στέρηση θρεπτικών ουσιών και την αναστολή των εξωκυτταρικών ενζύμων[3].

1.2.6.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως φαινόλες, β-καροτένιο, γλουταθειόνη, τοκοφερόλες, ασκορβικό και ανθοκυανίνες, ο καρπός απέκτησε την προσοχή των ερευνητών ως ένα πιθανό αντικαρκινογόνο φυτό [14]. Το εκχύλισμα των καρπών του *R. canina* αποδείχθηκε ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό ικανό να έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Αξίζει να σημειωθεί πως σε έρευνα, τα εκχύλισματα του *R. canina* ήταν ικανά να μειώσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε 3 διαφορετικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος, με ανασταλτική δράση υψηλότερη από εκείνη της τεμοζολομίδης, η οποία είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον, οι αντικαρκινικές επιδράσεις των βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό του *Rosa canina* εντοπίζονται σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, συμπεραίνοντας πως οι εστέρες της ξανθοφύλλης μπορεί να είναι υποψήφιοι για μελλοντική θεραπεία αυτού του τύπου καρκίνου[5]. Είναι ενδιαφέρον ότι το εκχύλισμα *R. canina* εμπόδισε την ανάπτυξη καρκινογόνων κυτταρικών σειρών, αλλά δεν άσκησε καμία τοξικότητα στην πρωτογενή καλλιέργεια φυσιολογικών κυττάρων[14].

1.2.6.4 Ιδιότητες στα μαλλιά και το δέρμα

Το πολύτιμο έλαιο που εξάγεται από σπόρους χρησιμοποιείται σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών και δέρματος λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λινολεϊκό και λινολενικό οξύ. Το έλαιο άγριου τριαντάφυλλου συνιστάται επίσης για χρήση σε προϊόντα αντηλιακής προστασίας. Περιέχει φυσικό ρετινοϊκό οξύ που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των ρυτίδων των ματιών, των ραγάδων και των αντιαισθητικών κηλίδων[13,14]. Σε κλινικές μελέτες παρατηρήθηκε πως το έλαιο σπόρων *R. canina* θα μπορούσε να αποτρέψει την επιθηλίτιδα μετά από ακτινοθεραπεία και το ερύθημα των

χειρουργικών ουλών[14]. Όσον αφορά σε δερματικές διαταραχές όπως κηλίδες ηλικίας ή μελάνωμα, που οφείλονται στη μελανίνη, μέσω ερευνών βρέθηκε πως η κερκετίνη από το *Rosa canina* μπορεί να αναστείλει την δραστηριότητα του βασικού ενζύμου αυτής της διεργασίας (τυροσινάση) και κατά συνέπεια να μειώσει την περιεκτικότητα σε μελανίνη των κυττάρων. Σημειώνεται πως αυτή η μείωση της περιεκτικότητας σε μελανίνη δεν σχετίζεται με τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, που αποτελεί ένα βασικό σημείο για την πιθανή εφαρμογή τους στη βιομηχανία καλλυντικών[3,14]. Επιπλέον, σημειώθηκε πως η τοπική χορήγηση εκχυλισμάτων του καρπού *R. canina* αύξησε την υγρασία και την ελαστικότητα του δέρματος[14].

Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος του *R.canina* στις ρυτίδες του δέρματος και στη μακροζωία των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Παρατηρήθηκε μείωση του βάθους των ρυτίδων στην περιοχή γύρω από τα μάτια, αύξηση της περιεκτικότητας σε υγρασία του μετώπου και βελτίωση της ελαστικότητας του δέρματος, ενώ επιπλέον μειώθηκε η διάσπαση της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και, άρα, αυξήθηκε η μακροζωία των κυττάρων. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι οι κύριοι παράγοντες του *Rosa canina*, που οδηγούν στην αύξηση της μακροζωίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς και τα δύο αποτρέπουν τη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης[3].

Οι αντιγηραντικές επιδράσεις του *R. canina* σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές του, καθώς ορισμένα φυτοχημικά είναι σε θέση να σαρώσουν τα ενεργά είδη οξυγόνου που παράγονται από την υπερϊώδη ακτινοβολία, και έτσι να μειώσουν τη βλάβη του δέρματος. Η βιταμίνη C μπορεί να έχει διπλό ρόλο στην προστασία του δέρματος, καθώς εκτός από την αντιοξειδωτική της δράση, εμπλέκεται άμεσα στο σχηματισμό του κολλαγόνου[3].

1.2.6.5 Άλλες ιδιότητες

Το εκχύλισμα των καρπών και μια σειρά από βιοδραστικές ενώσεις του έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη φλεγμονή, με τα γαλακτολιπίδια να είναι πιθανώς καθοριστικά για αυτήν την αντιφλεγμονώδη δράση του καρπού *R. canina* [14].

Μελέτες έδειξαν ανασταλτική επίδραση του *R. canina* και των εκχυλισμάτων του στην αύξηση βάρους μετά από χορήγηση από το στόμα, με την trans-τιλιροζίτη να καταστέλλει σημαντικά την αύξηση του σωματικού βάρους, τα επίπεδα ηπατικής TG και τη σπλαχνική παχυσαρκία. Έχει προταθεί ότι το *R. canina* θα μπορούσε να είναι δυνητικά χρήσιμο για την ανάπτυξη μιας νέας κατηγορίας προϊόντων κατά της παχυσαρκίας [3,5,14].

Το *R. canina* έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στη θεραπεία του διαβήτη στο Ιράν, με τους καρπούς να περιέχουν πτητικές, φαινολικές και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που μπορεί να είναι αποτελεσματικές στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη[5].

Έχουν πραγματοποιηθεί ορισμένες φαρμακολογικές μελέτες που διερευνούν τις γαστρο-προστατευτικές επιδράσεις του καρπού *R. canina*. Επιπλέον, το εκχύλισμα τριαντάφυλλου έχει νευροπροστατευτικές δραστηριότητες στην ισχαιμία του εγκεφάλου. Έχει αναφερθεί πιθανή δράση κατά του Alzheimer για το εκχύλισμα των καρπών του *R. canina*. Κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση τριαντάφυλλου μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων[14].

Τέλος, προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν καταδείξει τις αντιαρθρικές και αναλγητικές δράσεις του τριαντάφυλλου. Συγκεκριμένα, αυτές οι επιδράσεις παρατηρήθηκαν σε άτομα με οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και χρόνια μυοσκελετικό πόνο[14]. Έχει αποδειχθεί ότι το *Rosa canina* L. μειώνει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη ρευματοειδή φλεγμονή σε κλινικές δοκιμές, επίδραση η οποία σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιφλεγμονώδη μόρια, όπως το γαλακτολιπίδιο GOPO[3].

Αν και διάφορες φαρμακολογικές δραστηριότητες του *R. canina*, συμπεριλαμβανομένης της αντιαρθρίτιδας, της παχυσαρκίας και των αντιοξειδωτικών επιδράσεων, έχουν αναφερθεί σε προκλινικές μελέτες, απαιτούνται ακόμη περισσότερες μελέτες για να καλυφθούν τα υπάρχοντα κενά στις γνώσεις για τις φαρμακολογικές επιδράσεις και τα βιοενεργά συστατικά του[14].

1.2.6.6 Τοξικότητα και παρενέργειες

Εκτός από δύο περιπτώσεις αλλεργικής εξ'επαφής δερματίτιδας κατά τη χρήση ελαίου άγριου τριαντάφυλλου, δεν έχει αναφερθεί τοξικότητα για αυτό το φυτό. Όσον αφορά στις παρενέργειες, υδαρή κόπρανα, μετεωρισμός (αέρια στομάχου) και ήπια γαστρεντερική ενόχληση αναφέρθηκαν σε ορισμένες από τις κλινικές δοκιμές με σκόνη καρπού[14].

1.2.7 Μέθοδοι εκχύλισης *Rosa canina* L.

Όσον αφορά στην εκχύλιση των καρπών του *R.canina* L, οι πιο συνήθεις μέθοδοι που ακολουθούνται είναι οι συμβατικές, ή εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, χωρίς τη χρήση όμως πράσινων διαλυτών.

Διάφορες τεχνικές συμβατικής εκχύλισης αξιοποιούνται για την εκχύλιση του καρπού *R.canina*. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι καθαρό απεσταγμένο νερό [6,7,23,25,26], υδατική αιθανόλη [6,7,20,25], υδατική μεθανόλη [23,27], μεθανόλη [26] κανονικό εξάνιο [26], οξικός αιθυλεστέρας [26], χλωροφόρμιο [26], ακετόνη [26] και διχλωρομεθάνιο[8].

Μια μέθοδος εκχύλισης αφορά στην έγχυση, η οποία μπορεί να διαρκεί 24 και 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας νερό και υδατική αιθανόλη αντίστοιχα[6] ή ακόμα και να αξιοποιείται υδατική αιθανόλη στους 4°C για 24 ώρες [20]. Ακόμα, έχει αναφερθεί εκχύλιση άγριου τριαντάφυλλου με τη διαδικασία της διαβροχής με νερό και υδατική αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα[25].

Μέσω έρευνας, κατά την εκχύλιση με χρήση νερού και υδατικού διαλύματος αιθανόλης, παρατηρείται πως και με τους δύο διαλύτες επιτυγχάνεται πλατώ μετά από περίπου 60 λεπτά, δηλαδή η εκχύλιση ολοκληρώνεται σε περίπου μία ώρα. Ελέγχονται επίσης και διάφορα μείγματα αιθανόλης-νερού από τα οποία εξάγεται το συμπέρασμα πως υψηλότερη αναλογία αιθανόλης στο διαλύτη μειώνει την απόδοση εκχύλισης, δηλαδή μειώνεται η ποσότητα των συστατικών-στόχων[7].

Εναλλακτικά, αξιοποιώντας υδατική μεθανόλη που περιέχει 0,5% τριφθοροξικό οξύ, διεξάγεται εκχύλιση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 8 ώρες[27].

Επιπλέον, αναφέρονται εκχυλίσεις με χρήση n-εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, χλωροφορμίου, ακετόνης, νερού και μεθανόλης για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος υπό ανάδευση. Κατά την έρευνα αυτή, σημειώνεται πως οι διαφορές στην πολικότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών είναι προφανώς οι λόγοι για τους οποίους οι φαινολικές ενώσεις και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων διαφέρουν. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του εκχυλίσματος με χρήση n-εξανίου (λιγότερο πολικός διαλύτης) σημειώθηκε πολύ μικρή τιμή στο εκχυλισμένο περιεχόμενο ολικών φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, ενώ η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην αντιοξειδωτική δράση με χρήση n-εξανίου, δηλαδή χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα[26].

Έχει αναφερθεί ακόμα εκχύλιση Soxhlet για 13 ώρες με χρήση διχλωρομεθάνιο (σημείο βρασμού 38 °C) ως διαλύτη[8].

Συνήθως, ακολουθεί φυγοκέντρηση, διήθηση και ίσως συμπύκνωση ή ξήρανση του εκχυλίσματος[6,27,20,25,26,8].

Συνοψίζοντας, πραγματοποιούνται συνήθως συμβατικές εκχυλίσεις μεγάλης διάρκειας με χρήση συμβατικών οργανικών διαλυτών σε θερμοκρασία δωματίου.

Όσον αφορά στην εκχύλιση με χρήση υπερήχων, έχουν αξιοποιηθεί διαλύτες όπως υδατικά διαλύματα αιθανόλης[16,21], καθώς και οξινισμένη μεθανόλη (90:10 v/v, MeOH/HCl 37%) [19] ή υδατική μεθανόλη[23]. Η διαδικασία της εκχύλισης διαρκεί λίγα λεπτά (20 - 30 λεπτά) και η θερμοκρασία κυμαίνεται από 20 ως 50°C, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση και διήθηση, και αν είναι επιθυμητό λυοφιλίωση[16,19,21,23].

Κατά τη μελέτη εκχυλίσεων με χρήση διαφόρων διαλυμάτων κατ'όγκο σε αιθανόλη, παρατηρήθηκε πως το χαμηλότερο ποσοστό κατ'όγκο σε αιθανόλη έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το χαμηλότερο ιξώδες σε μειωμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης, που μεταβάλλουν τη δομή του φυτού διογκώνοντας τη μήτρα, επιτρέποντας στο διαλύτη να διεισδύσει πληρέστερα στο φυτό. Συνεπώς, το νερό δρα ως παράγοντας διόγκωσης των φυτών, ενώ η αιθανόλη πιστεύεται ότι διαταράσσει τη σύνδεση μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και των φυτικών μητρών. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η υψηλή διηλεκτρική σταθερά του νερού, η οποία αυξάνει τους δείκτες πολικότητας της αιθανόλης στο υδατικό διάλυμα[16].

Συνοπτικά, έχουν πραγματοποιηθεί εκχυλίσεις με τη βοήθεια σύγχρονων τεχνικών υψηλής ενέργειας, που έχουν μικρή διάρκεια και χαμηλές θερμοκρασίες, με τη χρήση όμως συμβατικών διαλυτών.

1.2.8 Μέθοδοι χαρακτηρισμού εκχυλισμάτων *Rosa canina* L.

Συχνά για τον προσδιορισμό των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, αξιοποιούνται τεχνικές διαχωρισμού όπως HPLC, GC, τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία UV-Vis, φθορισμομετρία ή ανίχνευση φασματομετρίας μάζας, οι οποίες μπορεί να παρέχουν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για μεμονωμένες ενώσεις αλλά απαιτούν προηγμένα όργανα, εξειδικευμένους χειριστές και είναι χρονοβόρες για αναλύσεις ρουτίνας. Επιπλέον, λόγω της χημικής ποικιλομορφίας των ενώσεων αυτών, δεν είναι εφικτός ο προσδιορισμός του συνολικού περιεχομένου τους χρησιμοποιώντας τεχνικές διαχωρισμού. Έτσι, χρησιμοποιούνται ευρέως οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην άμεση μέτρηση της υπεριώδους ακτινοβολίας ή σε αντιδράσεις παραγωγοποίησης για την ανάπτυξη χρώματος, όπως παρουσιάζονται παρακάτω[28].

1.2.8.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων- Μέθοδος

Folin-Ciocalteu

Με στόχο τη μέτρηση των ολικών φαινολικών ενώσεων (*Total Phenolic Content – TPC*), εφαρμόζεται η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Ο προσδιορισμός Folin-Ciocalteu είναι μια αντίδραση που βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, η οποία εκφράζει την αναγωγική ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu έχει κίτρινο χρώμα και είναι ένα μείγμα φωσφοβολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφομολυβδικού οξέος ($H_3PMO_{12}O_{40}$)[29].

Η ανάλυση βασίζεται στην παρακολούθηση της παραγωγής ενός έγχρωμου συμπλόκου κατά την αντίδραση μεταξύ του φωσφομολυβδικού οξέος του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και των φαινολικών ενώσεων σε ένα αλκαλικό μέσο (~pH 10), που επιτυγχάνεται με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου. Αυτό συμβαίνει διότι σε αλκαλικές συνθήκες το οξο-βολφραμικό και το οξο-μολυβδαινικό, που σχηματίζονται σε αυτή την οξειδοαναγωγική αντίδραση, εμφανίζουν μπλε απόχρωση[29,30,31].

Το σύμπλοκο αυτό μπλε χρώματος μπορεί στη συνέχεια να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρία ορατού φωτός στα 765nm. Η μέγιστη απορρόφηση των χρωμοφόρων αυτών ενώσεων εξαρτάται από το αλκαλικό διάλυμα και τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων[29,31,32].

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η χρωματική αλλαγή, που παρατηρείται κατά τη χημική αντίδραση της μεθόδου.



Εικόνα 3: Χρωματική αλλαγή κατά τη χρωματομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu.

1.2.8.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων- Μέθοδος

χλωριούχου αργιλίου

Με στόχο τη μέτρηση των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων (*Total Flavonoid Content-TFC*), εφαρμόζεται η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου, η οποία βασίζεται στο σχηματισμό σταθερών σε οξύ συμπλόκων του χλωριούχου αργιλίου με την C-4 κετο-ομάδα και την C-3 ή C-5 υδροξυλομάδα των φλαβονών και φλαβονολών. Επιπλέον, το χλωριούχο αργίλιο σχηματίζει ασταθή σε οξύ σύμπλοκα με τις ορθο-διυδροξυλικές ομάδες του A- ή B-δακτυλίου των φλαβονοειδών[33].

Σχηματίζονται έτσι έγχρωμα σύμπλοκα ροζ απόχρωσης, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με φασματοφωτομετρία ορατού φωτός στα 500nm.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η χρωματική αλλαγή που παρατηρείται κατά τη χημική αντίδραση της μεθόδου.



Εικόνα 4: Χρωματική αλλαγή κατά τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αργιλίου.

1.2.8.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα- Μέθοδος αναστολής της

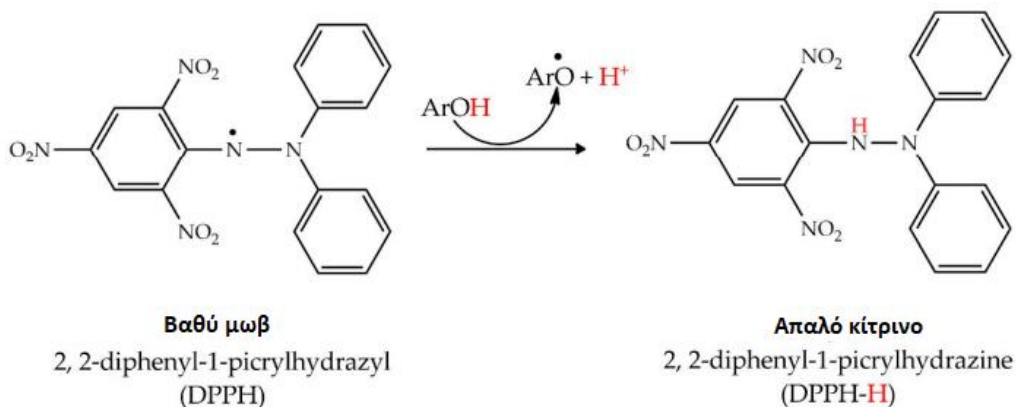
ρίζας DPPH

Με στόχο τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, αξιοποιείται η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH. Το DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) είναι μια σταθερή ρίζα σε διάλυμα και εμφανίζει μωβ χρώμα απορροφώντας στα 515 nm σε αλκοολικό διάλυμα. Αυτή η ανάλυση βασίζεται στην αρχή ότι το DPPH δέχεται ένα άτομο υδρογόνου (H) από το μόριο-δότη δεσμού υδρογόνου, δηλαδή το αντιοξειδωτικό, με αποτέλεσμα την αναγωγή του DPPH• σε DPPHH [34,35].

Η αντίδραση που συμβαίνει είναι η ακόλουθη: $DPPH\cdot + AH \rightarrow DPPHH + A\cdot$, όπου AH είναι η αντιοξειδωτική ουσία.

Κατά την αντίδραση αυτή, το αλκοολικό διάλυμα του DPPH αλλάζει το μωβ χρώμα που προαναφέρθηκε και μετατρέπεται σε ανοιχτό κίτρινο, λόγω της σύζευξης του ασύζευκτου ηλεκτρονίου της ρίζας DPPH με ένα άλλο, που οδηγεί στο σταδιακό αποχρωματισμό[31,34].

Ακολουθώς παρουσιάζεται ο μηχανισμός αντίδρασης του DPPH και η χρωματική αλλαγή που παρατηρείται κατά την αντίδραση αυτή.



Σχήμα 3: Μηχανισμός αντίδρασης αναγωγής του DPPH από φαινολική αντιοξειδωτική ένωση



Εικόνα 5: Χρωματική αλλαγή κατά την αντίδραση αναγωγής του DPPH.

Με στόχο τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ισχύος, υπολογίζεται ο δείκτης IC_{50} , που ορίζεται ως η συγκέντρωση του δείγματος εκχυλίσματος που επιτυγχάνει μείωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50%[34].

Η μέθοδος DPPH είναι απλή, φθηνή και γρήγορη, ενώ 30 λεπτά είναι επαρκή για τη σάρωση των ριζών, επιτρέποντας στο DPPH να αντιδρά αποτελεσματικά, ακόμη και με ασθενή αντιοξειδωτικά. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική και για θερμικά ασταθείς ενώσεις, καθώς πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου[31].

1.3 Ανάγκη χρήσης πράσινων διαλυτών

Όπως προαναφέρθηκε, οι βιοδραστικές ενώσεις στα φυτά είναι εκείνες που τους προσδίδουν τις μοναδικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιμυκητιασικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές). Με βάση τις δραστηριότητές τους, η ανάκτηση και η χρήση των βιο-ενώσεων από διαφορετικές φυτικές μήτρες είναι μια εναλλακτική λύση για τη φαρμακευτική βιομηχανία και τη βιομηχανία τροφίμων. Οι ενώσεις αυτές ανακτώνται από φυσικές μήτρες με διεργασίες εκχύλισης, κυρίως χρησιμοποιώντας υδατικούς-οργανικούς διαλύτες όπως εξάνιο, βενζόλιο, μεθανόλη, χλωροφόρμιο, πετρελαϊκό αιθέρα και ακετόνη[1,36].

Παρόλα αυτά, συνήθως η χρήση συμβατικών διαλυτών συνεπάγεται τοξικότητα, πτητικότητα και ευφλεκτότητα, έχοντας ως αποτέλεσμα να είναι επιβλαβείς για το περιβάλλον αλλά και την υγεία των χειριστών και των καταναλωτών. Για αυτό το λόγο, έχει προταθεί η χρήση διαλυτών GRAS (Generally Recognized as Safe - Γενικά Αναγνωρισμένοι ως Ασφαλείς), όπως ορισμένες αλκοόλες (π.χ. αιθανόλη) που έχουν χαμηλό σημείο βρασμού, που δεν είναι όμως πλήρως αποτελεσματικοί για τη διαλυτοποίηση λιγότερο πολικών μορίων. Σήμερα υπάρχει έντονη ανησυχία για τη μείωση της ενέργειας, του νερού, της κατανάλωσης διαλυτών και των εκπομπών άνθρακα, γεγονός που ενισχύει τη ζήτηση για φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες. Νέες τεχνολογίες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της απόδοσης, τη βελτίωση της εκλεκτικότητας της διαδικασίας και τη μείωση της κατανάλωσης

ενέργειας, ενώ έχουν αναφερθεί εναλλακτικοί διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids - IL) [36].

Τα IL ορίζονται ως άλατα, που σχηματίζονται από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν, και τα οποία εμφανίζουν σημεία τήξης χαμηλότερα από τα συστατικά τους - κοντά στους 100 °C[36]. Τα ιοντικά υγρά (IL), λόγω των χαρακτηριστικών όπως η μη πτητικότητα τους σε συνθήκες περιβάλλοντος, η χημική και θερμική τους σταθερότητα, η μη αναφλεξιμότητα, η υψηλή αγωγιμότητα και η υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησης, προσέλκυσαν την προσοχή των επιστημόνων για περισσότερα από 20 χρόνια, θεωρώντας τα ως πράσινους διαλύτες. Ακόμη και πιθανά μειονεκτήματα, όπως το υψηλό ιξώδες και η πολικότητά τους, θα μπορούσαν να προσαρμολογούνται αλλάζοντας το συνδυασμό κατιόντος-ανιόντος[37,38,39].

Έτσι, τα IL θεωρήθηκαν πιθανές πράσινες εναλλακτικές λύσεις σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, όμως μεταγενέστερες έρευνες οδήγησαν στον αποκλεισμό τους από την κατηγορία πράσινων διαλυτών, κυρίως λόγω της κακής βιοδιασπασιμότητας, βιοσυμβατότητας και βιωσιμότητάς τους[37,38,39].

1.3.1 Βαθέως ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)

Έτσι, αναπτύχθηκε μια νέα γενιά IL, ονομαζόμενη ως βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents - DES), γνωστοί και ως βαθέως ευτηκτικά IL. Τα DES παρουσιάζουν ορισμένα βελτιωμένα χαρακτηριστικά σε σχέση με τα IL, όπως χαμηλότερη τοξικότητα και κόστος [38]. Τα DES μπορεί επίσης να έχουν ιοντικό χαρακτήρα, αλλά αποτελούνται από ένα μείγμα οργανικών ενώσεων[39].

Τα DES είναι διαλύτες που εμφανίζονται όταν ένα μείγμα δύο ή τριών συστατικών σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, έχει σημείο τήξης πολύ χαμηλότερο από αυτό των επιμέρους συστατικών. Για το σχηματισμό ενός συστήματος DES, χρειάζεται ένας δότης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Donor - HBD) και ένας δέκτης δεσμών υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptor - HBA), οι οποίοι όταν αναμειγνύονται σε κατάλληλες αναλογίες δημιουργούν ένα νέο «πλέγμα» μορίων, διασυνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας ευτηκτικό μείγμα[24,38,37]. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ HBA και HBD μαζί με άλλες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι van der Waals και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις, προκαλούν μετατόπιση φορτίου, η οποία παρεμβαίνει στην ικανότητα των επιμέρους συστατικών να κρυσταλλώνονται και, κατά συνέπεια, το σημείο τήξης του DES μειώνεται σημαντικά σε σύγκριση με αυτό κάθε αρχικής ένωσης[40,41,42]. Η μετατόπιση του φορτίου είναι εφεξής υπεύθυνη για τη μείωση του σημείου τήξης του μείγματος σε σχέση με τα σημεία τήξης των πρώτων υλών, αλλά και γενικότερα για τις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των DES, σε σύγκριση με τα μεμονωμένα συστατικά[39]. Το 2003 το πρώτο DES συντέθηκε από ένα μείγμα χλωριούχου χολίνης (ChCl) και ουρίας[36]. Γενικότερα, τα πρώτα DES ελήφθησαν με ανάμειξη ενός άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου με δότες δεσμών υδρογόνου (όπως οργανικά οξέα, ουρία ή γλυκερόλη), που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκο με το ανιόν αλογονιδίου του άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου[38].

1.3.2 Φυσικοί Βαθέως ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES)

Ωστόσο, οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των DES εξακολουθούσαν να επικρατούν και οι επιστήμονες στράφηκαν σε φυσικές πηγές για την αναζήτηση εναλλακτικών συστατικών[38]. Όταν χρησιμοποιούνται φυσικά συστατικά για τη σύνθεση DES, συνήθως πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών (π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα), οι διαλύτες ονομάζονται φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents - NaDES), με χαμηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και τοξικότητα[36,39]. Μέχρι στιγμής, έχουν προταθεί πάνω από 150 NaDES[38].

Τα NaDES έχουν προταθεί ως εναλλακτική για δύο λόγους: (i) τα συστατικά τους προέρχονται από τη φύση και (ii) πιστεύεται ότι έχουν πραγματικό φυσιολογικό ή βιολογικό ρόλο στη φύση[38]. Σε σύγκριση με άλλους διαλύτες, τα NaDES έχουν το πλεονέκτημα ότι μιμούνται το φυσικό τρόπο των φυτών να προστατεύουν τους πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι αδιάλυτοι στο νερό. Επομένως, τα NaDES λειτουργούν ως εναλλακτική υγρή φάση στη φύση[36].

Η έννοια των NaDES παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2011, με την υπόθεση ύπαρξης ενός τρίτου υγρού σε ζωντανούς οργανισμούς, εκτός του νερού και των λιπιδίων. Πολλά περιστασιακά στοιχεία έχουν συλλεχθεί για να αποδειχθεί ότι τα NaDES όντως παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, ενώ πολλά βιολογικά φαινόμενα εξηγούνται όταν λαμβάνονται υπόψη τα NaDES[37].

Παρατηρήθηκε πως πολλοί φυτικοί πρωτογενείς μεταβολίτες όπως η χολίνη, τα σάκχαρα και τα αμινοξέα, τα οποία είναι επίσης πιθανά συστατικά των κανονικών IL και DES, μπορούν να σχηματίσουν ένα υγρό παρόμοιο με το DES όταν αναμειγνύονται σε ορισμένους συνδυασμούς[37,38]. Κατά την άποψη αυτή, τα NaDES θα μπορούσαν να παίξουν ρόλο ως εναλλακτική λύση στο νερό και τα λιπίδια σε ακραίες συνθήκες. Για παράδειγμα, πολλοί μη υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες και μακρομόρια μπορούν να συντεθούν, να αποθηκευτούν και να μεταφερθούν στα φυτά λόγω της παρουσίας των NaDES ως διαλυτών/συνδιαλυτών. Τα κύτταρα και οι οργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες ξηρασίας ή/και κρύου, απλώς και μόνο επειδή οι μεμβράνες, τα ένζυμα και οι μεταβολίτες παραμένουν σταθερά σε ένα κυτταρικό σύστημα πλούσιο σε NaDES. Στο σύστημα αυτό, το νερό συγκρατείται έντονα και η ψύξη αποφεύγεται λόγω του πολύ χαμηλού σημείου τήξης των βαθέως ευτηκτικών μιγμάτων, έχοντας ως στόχο την μακροπρόθεσμη επιβίωση[37,38].

Συνοψίζοντας, αυτό που διακρίνει τα NaDES από άλλα DES που αποτελούνται από φυσικά συστατικά, (όπως μείγματα χαμηλής τήξης, μείγματα χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης και βιο-IL) είναι ότι τα τελευταία δεν έχουν απαραίτητα βιολογικό και φυσιολογικό ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι, ο όρος NaDES υπερβαίνει την αναφορά σε ένα απλό βαθέως ευτηκτικό υγρό, γιατί έχει βιολογική σημασία. Μεταξύ άλλων χαρακτηριστικών αυτό συνεπάγεται ότι η παρουσία διαφορετικών επιπέδων νερού στα NaDES, επηρεάζει έντονα τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους[38].

Τα NaDES παρασκευάζονται με κοινά φυσικά συστατικά, γεγονός το οποίο μπορεί να εγγυάται χαμηλό ή ακόμη και ασήμαντο επίπεδο τοξικότητας, το οποίο όμως είναι απαραίτητο να αξιολογείται στο μείγμα των συστατικών πριν από οποιαδήποτε χρήση σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά[38].

1.3.3 Συστατικά και παρασκευή NaDES

1.3.3.1 Συστατικά NaDES

Ως καλά υποψήφια συστατικά για την παρασκευή NaDES έχουν αναφερθεί τα σάκχαρα, οι αλκοόλες σακχάρων, οι πολυαλκοόλες, τα οργανικά οξέα και βάσεις και τα αμινοξέα. Η φυσική προέλευση των συστατικών (κυρίως οι πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών, που λαμβάνονται από λαχανικά ή φρούτα) δίνει στα NaDES ένα μεγάλο πλεονέκτημα έναντι των συνθετικών ιοντικών υγρών (IL) και των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (DES), επειδή είναι σαφώς λιγότερο τοξικά και πιο φιλικά προς το περιβάλλον[38].

Τα πιθανά συστατικά που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση αυτών των διαλυτών (IL, DES και NaDES) επιλέγονται σύμφωνα με χαρακτηριστικά όπως η ικανότητά τους να σχηματίζουν ένα μείγμα με σημείο τήξης χαμηλότερο από τα μεμονωμένα συστατικά. Ο χρόνος και η ενέργεια που απαιτούνται για τη σύνθεση λαμβάνονται επίσης υπόψη για την επιλογή των συστατικών, προκειμένου να παρέχεται χαμηλό κόστος διεργασίας. Ένα άλλο σημαντικό κριτήριο για την επιλογή των ενώσεων σχετίζεται με περιβαλλοντικές πτυχές, με υψηλότερα πρότυπα που αποδίδονται σε πιο πράσινους διαλύτες, που συνδέονται με την ικανότητά τους να διαλυτοποιούν τις ενώσεις-στόχους[36].

Τυπικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των NaDES και δρουν ως δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου είναι[37,42]:

- I. άλατα (όπως χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη), αμινοξέα (όπως αλανίνη, προλίνη, σερίνη, γλουταμινικό οξύ),
- II. οργανικά οξέα (όπως γαλακτικό, μηλονικό, μηλεϊνικό, οξαλικό, κιτρικό, μηλικό, τρυγικό),
- III. πολυόλες (όπως γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη, 1,2-προπυλενογλυκόλη, ξυλιτόλη, σορβιτόλη) και
- IV. σάκχαρα (όπως γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη).

Τα συνήθη HBA είναι άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου ή αμινοξέα (π.χ. αλανίνη, προλίνη, γλυκίνη, βεταΐνη), ενώ τα HBD είναι οργανικά οξέα (π.χ. οξαλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, μηλικό οξύ) ή υδατάνθρακες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη). Οι ομάδες αλκοόλης, αμίνης, αλδεϋδης, κετόνης και καρβοξυλικών συμπεριφέρονται διπλά: ως δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου[41,42].

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι τα NaDES που σχηματίζονται από ενώσεις με αποδεδειγμένη βιολογική δράση, όπως αμινοξέα ή οργανικά οξέα, θα μπορούσαν επίσης να έχουν παρόμοιες ιδιότητες. Κατά αυτόν τον τρόπο, υποδεικνύεται πως μπορούν να ρυθμιστούν όχι μόνο τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των διαλυτών, αλλά και η βιολογική τους δράση[43]. Ορισμένα NaDES, ειδικά εκείνα που περιέχουν οργανικά οξέα (π.χ. κιτρικό οξύ), εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων λόγω του χαμηλού pH τους, το οποίο επηρεάζει το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη βακτηρίων[36,44]. Μια μελέτη έδειξε ότι τα NaDES που περιέχουν μηλικό οξύ θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη βιολογική δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων[43].

Τα NaDES μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση των ενώσεων που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση αυτών. Η διάκριση αυτή γίνεται ως εξής[36,41,44]:

- I. ιοντικά υγρά NaDES, που περιέχουν ένα οξύ και μια βάση,
- II. ουδέτερα NaDES, που σχηματίζονται από σάκχαρα ή από σάκχαρα και πολυαλκοόλη,
- III. ουδέτερα NaDES με οξέα, που συντίθενται με σάκχαρα ή πολυαλκοόλη και οργανικά οξέα,
- IV. ουδέτερα NaDES με βάσεις, που συντίθενται με σάκχαρα ή πολυαλκοόλη και οργανική βάση και
- V. NaDES με βάση αμινοξέα, που συντίθενται με αμινοξέα και σάκχαρα ή οργανικά οξέα.

Ο αριθμός των ενώσεων και των διατάξεων των μορίων που μπορεί να αποτελούν ένα NaDES υπολογίζεται ότι ανέρχεται σε 10^6 , επομένως χαρακτηρίζονται ως εξατομικευμένοι διαλύτες ή «διαλύτες σχεδιασμού» λόγω της υψηλής ευελιξίας τους και του ουσιαστικά απεριόριστου αριθμού συνδυασμών. Υπάρχει δυνατότητα προσαρμογής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, ώστε να είναι κατάλληλα για χρήση σε διαφορετικές διεργασίες[41,43].

Η φύση των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα εξαρτάται από τον τύπο των στερεών υλικών που σχηματίζουν το υγρό. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς διαλύτες, μπορούν να σχηματιστούν πολλοί τύποι δεσμών υδρογόνου στο NaDES, όπως $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{OH}\cdots\text{Cl}$, $\text{NH}\cdots\text{Cl}$, $\text{OH}\cdots\text{NH}$, $\text{CH}\cdots\text{Cl}$, $\text{CH}\cdots\text{O}=\text{C}$, $\text{NH}\cdots\text{OH}$ και $\text{NH}\cdots\text{NH}$ [41].

Για να χρησιμοποιηθούν τα NaDES σε διεργασίες εκχύλισης πρέπει να είναι σταθερά σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος. Θα πρέπει να υπάρχουν ως ομοιογενές υγρό μείγμα, χωρίς ιζήματα ή στερεό υλικό[40].

1.3.3.2 Μέθοδοι παρασκευής NaDES

Οι κύριες μέθοδοι που περιγράφονται στη βιβλιογραφία για τη σύνθεση των NaDES βασίζονται[40]:

- I. στη θερμική ανάμειξη,
- II. στη λυοφιλίωση,
- III. στην εξάτμιση και
- IV. στη σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων.

Η μέθοδος ανάδευσης και θέρμανσης περιλαμβάνει την ανάμειξη δύο συστατικών παρουσία νερού, ακολουθούμενη από μαγνητική ανάδευση και θέρμανση του μίγματος μέχρι να σχηματιστεί ένα άχρωμο διαυγές υγρό[24,37,40]. Τα συστατικά αναμειγνύονται στους 80°C περίπου για 1-2 ώρες[37].

Η μέθοδος λυοφιλίωσης περιλαμβάνει την κατάψυξη και ξήρανση του διαλύματος, που έχει προκύψει από τη διάλυση των συστατικών σε νερό, λαμβάνοντας ένα διαυγές παχύρρευστο υγρό[24,37,40]. Γίνεται προσθήκη στοιχειομετρικών ποσοτήτων HBA και HBD, ακολουθεί αραιώση με απεσταγμένο νερό για να επιτευχθεί ένα υδατικό

διάλυμα περίπου 5%, το οποίο τελικά καταψύχεται σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (77 K ή 253 K) και στη συνέχεια να γίνει λυοφιλίωση για να επιτευχθεί ένα διαυγές ιξώδες υγρό[45].

Στη μέθοδο της εξάτμισης, τα συστατικά διαλύονται σε νερό, το οποίο εξατμίζεται στους 50 °C σε περιστροφικό εξάτμιστήρα και στη συνέχεια το υγρό που προκύπτει τοποθετείται σε ξηραντήρα μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος[37,40,45].

Στη σύνθεση NaDES με τη βοήθεια μικροκυμάτων, τα συστατικά ακτινοβολούνται σε ένα κλειστό σύστημα ελεγχόμενης ισχύος και θερμοκρασίας. Η ακτινοβολία αλληλεπιδρά με το υλικό, προκαλώντας διπολική περιστροφή, η οποία οδηγεί σε συγκρούσεις μεταξύ των μορίων και μεταξύ των συστατικών HBD και HBA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διηλεκτρική θέρμανση, μειώνοντας το χρόνο σύνθεσης του διαλύτη[40]. Επιπλέον, μειώνεται και το ενεργειακό κόστος της προετοιμασίας του DES, καθιστώντας τη μια ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση προετοιμασίας. Ο χρόνος προετοιμασίας μειώνεται από αρκετές ώρες σε μόλις 20 δευτερόλεπτα ενώ καταναλώνεται 650 φορές χαμηλότερη ενέργεια σε σύγκριση με τη μέθοδο ανάδευσης και θέρμανσης[45].

Η σύνθεση NaDES με τη χρήση της μεθόδου υπερήχων έχει διερευνηθεί ελάχιστα. Σε αυτή τη διαδικασία, τα ηχητικά κύματα προκαλούν σπηλαίωση, η οποία συνίσταται στο σχηματισμό και την κατάρρευση φυσαλίδων. Όταν η φυσαλίδα φτάσει σε ένα κρίσιμο μέγεθος, εκρήγνυται και υπάρχει απότομη απελευθέρωση πολύ υψηλής θερμότητας και πίεσης, με την ενέργεια που απελευθερώνεται να βοηθά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών HBD και HBA, οδηγώντας στο σχηματισμό των NaDES[40].

Η μέθοδος σύνθεσης μπορεί να επιλεγεί με γνώμονα το κόστος (προτιμώνται χαμηλότερες θερμοκρασίες), την ταχύτητα ή την αποτελεσματικότητα (βοηθούν οι υψηλότερες θερμοκρασίες ή/και οι υπέρηχοι), ή ακόμα η μέθοδος μπορεί να περιορίζεται από τις ιδιότητες των αντιδραστηρίων (οι θερμοευαίσθητες ουσίες ενδέχεται να απαιτούν λυοφιλίωση αντί για θέρμανση, λόγω θερμικής αστάθειας)[24].

Από φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H (NMR) για τις μεθόδους θερμικής ανάμειξης, λυοφιλίωσης και εξάτμισης, έχει αποδειχθεί πως και οι τρεις μέθοδοι καταλήγουν στο σχηματισμό του ίδιου NaDES, αλλά συγκριτικά η πρώτη (θερμική ανάμειξη) είναι φθηνότερη και ασφαλέστερη[37]. Η παρασκευή του NaDES με θέρμανση και ανάδευση είναι η πιο κοινή μέθοδος στη βιβλιογραφία. Αυτή η μέθοδος δεν είναι μόνο οικονομική, αλλά επιτρέπει και τον εύκολο έλεγχο της θερμοκρασίας, έχοντας μεγάλη σημασία στην περίπτωση χρήσης θερμικά ασταθών συστατικών (π.χ. σάκχαρα)[41].

1.3.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες των NaDES

Οι ιδιότητες των NaDES όπως το ιξώδες, η πυκνότητα και η πολικότητα διέπονται από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και τη χημική φύση των συστατικών. Οι δεσμοί υδρογόνου οδηγούν σε υγρά υψηλής δομής, στα οποία τα μόρια επηρεάζονται από

ισχυρές κατευθυντικές αλληλεπιδράσεις με τις κοιλότητες των δομών, με αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας, του ιξώδους και της πολικότητάς τους[40].

1.3.4.1 Θερμική συμπεριφορά

Η γνώση της θερμοκρασίας υποβάθμισης των NaDES ή το ανώτερο όριο της χρησιμότητάς τους κρίνονται σημαντικά[46]. Μετά από έρευνες χρησιμοποιώντας θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), βρίσκοντας θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης (σε πολλά NaDES κάτω από -50 °C), θερμοκρασίες αποσύνθεσης (υψηλότερες από 135 °C) και σημείων τήξεως (δεν παρατηρήθηκαν), συμπεραίνεται πως τα NaDES είναι κατάλληλα για χρήση ως διαλύτες στην περιοχή θερμοκρασίας 0–100 °C[37].

Μεταξύ διαφόρων NaDES έχοντας ως δότη δεσμού υδρογόνου το γαλακτικό οξύ και ως δέκτες την αλανίνη, χολίνη, βεταΐνη και χλωριούχο χολίνη, μέσω σύγκρισης της θερμικής συμπεριφοράς των DES με βάση τη θερμοκρασία αποσύνθεσης, το πιο σταθερό DES ήταν το γαλακτικό οξύ:βεταΐνη. Το γαλακτικό οξύ είναι συνήθως ασταθές σε θερμοκρασία άνω των 122°C, αλλά οι δεσμοί υδρογόνου εξασφαλίζουν σταθερότητα και εμποδίζουν το σχηματισμό λακτιδίου. Αυτές οι πληροφορίες υποδηλώνουν ότι η εφαρμογή μέχρι θερμοκρασία 193,57 °C για το συγκεκριμένο NaDES, θα πρέπει να είναι δυνατή[46].

1.3.4.2 Πυκνότητα

Η πυκνότητα είναι μια σημαντική ιδιότητα για τα χημικά υλικά και την επεξεργασία τους. Μια υψηλή πυκνότητα NaDES έχει συνήθως αρνητικό αντίκτυπο στο χειρισμό ή την ανάμειξη σε χημικές διεργασίες. Ωστόσο, μπορεί να έχει θετική επίδραση στις διεργασίες εκχύλισης, καθώς είναι απαραίτητη μια σχετικά μεγάλη διαφορά στις πυκνότητες μεταξύ των φάσεων εξευγενισμού και εκχυλίσματος για να διασφαλιστεί ο διαχωρισμός των φάσεων[43]. Η πυκνότητα είναι μια ιδιότητα που δείχνει μια προσθετική σχέση μεταξύ των συστατικών για το σχηματισμό του NaDES, για αυτό και η πυκνότητα του μείγματος των συστατικών βρίσκεται ανάμεσα στην πυκνότητα του νερού και του NaDES. Η πυκνότητα των NaDES είναι μεγαλύτερη από αυτή του νερού[37,43].

Η πυκνότητα των NaDES μειώνεται γραμμικά όσο η θερμοκρασία ή η περιεκτικότητα σε νερό αυξάνεται[37,43,47]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προσθήκη νερού τείνει να αυξάνει την πυκνότητα δημιουργώντας περισσότερους δεσμούς υδρογόνου μέχρι το δίκτυο να φτάσει σε ένα σημείο θραύσης, συνήθως όταν προστίθεται περισσότερο από 50% νερό[40,48]. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη κινητική ενέργεια και κατά συνέπεια μείωση της πυκνότητας, λόγω της αύξησης της μοριακής κίνησης και του μοριακού όγκου του διαλύματος[40,41,47,48]. Μελέτες NaDES με βάση τη γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ έδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από 19 σε 49 °C είχε ως αποτέλεσμα μείωση της πυκνότητας κατά περίπου 3%[40].

Τέλος, η πυκνότητα εξαρτάται και από την φύση των HBA και HBD. Γενικά, τα υδρόφοβα DES έχουν πυκνότητες κοντά ή μικρότερες από την πυκνότητα του νερού, ενώ τα υδρόφιλα DES παρουσιάζουν υψηλότερες πυκνότητες[49]. Επιπλέον, όσον

αφορά στον τύπο του HBD, παρατηρείται πως όσο αυξάνεται ο αριθμός των ομάδων -OH, ο αριθμός των αρωματικών ομάδων ή των αλκυλικών αλυσίδων οργανικών οξέων στη δομή του DES, η πυκνότητά του αυξάνεται[47]. Η επιμήκυνση των αλκυλικών αλυσίδων οδηγεί σε μείωση της πυκνότητας, λόγω του ότι μια μακρύτερη ανθρακική αλυσίδα HBD μειώνει τις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης[43]. Η μοριακή αναλογία των HBA:HBD μπορεί να χρησιμοποιηθεί με στόχο το χειρισμό της πυκνότητας των DES[47].

Η πυκνότητα των συστημάτων είναι επομένως συνάρτηση της σύνθεσης του NaDES, της περιεκτικότητάς του σε νερό και της θερμοκρασίας χρήσης. Η πυκνότητα θα επηρεάσει άμεσα το ιξώδες του NaDES, το οποίο είναι βασική παράμετρος για τις διεργασίες μεταφοράς και τις εκχυλιστικές του ικανότητες[48].

1.3.4.3 Ιξώδες

Το ιξώδες σχετίζεται με τις μοριακές δυνάμεις συνοχής σε ένα ρευστό, καθορίζοντας τη ρευστότητά του και ως εκ τούτου τους περιορισμούς μεταφοράς μάζας σε αυτό. Παρόμοια με τα IL και τα DES, τα περισσότερα NaDES παρουσιάζουν υψηλότερο ιξώδες από πολλούς συμβατικούς οργανικούς διαλύτες[37].

Το υψηλό ιξώδες και η μειωμένη κινητικότητα του NaDES σε θερμοκρασία δωματίου σχετίζεται με το εκτεταμένο και πολύπλοκο δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ του HBD και του HBA, το οποίο μειώνει την κίνηση των ελεύθερων ειδών στο DES. Ακόμα, σε μικρότερο βαθμό οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις van der Waals και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, το μεγαλύτερο μέγεθος ιόντων και τους μικρούς κενούς όγκους των DES και το διαθέσιμο ελεύθερο όγκο[41,47]. Για παράδειγμα, λοιπόν, είναι λογικό να αναμένεται ένα NaDES να είναι πιο παχύρρευστο εάν ένα από τα συστατικά του έχει επιπλέον υδροξυλομάδες, που ενεργούν ως δότες δεσμών υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι περισσότερους δεσμούς υδρογόνου εντός του ευθηκτικού μίγματος[37].

Για βιομηχανικές εφαρμογές, το χαμηλό ιξώδες είναι η πιο επιθυμητή ιδιότητα λόγω του πιο οικονομικού και ευκολότερου χειρισμού[41]. Τα υψηλά ιξώδη των NaDES μπορούν να αποτελέσουν περιοριστικό παράγοντα στη χρήση τους ως διαλυτών εκχύλισης, λόγω τόσο της χαμηλότερης απόδοσης εκχύλισης, όσο και της ποσότητας ενέργειας που απαιτείται για την ανάδευση και την άντληση[43].

Από την άλλη πλευρά, το υψηλό ιξώδες μπορεί να είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό, καθώς έχει αναφερθεί ότι τα υψηλά ιξώδη των NaDES με σάκχαρα ως HBD και με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό επιτρέπουν σταθερές μοριακές αλληλεπιδράσεις[43]. Το υψηλότερο ιξώδες του NaDES συμβάλλει στη μεγαλύτερη σταθερότητα ορισμένων φυσικών ενώσεων (π.χ. φαινολικές ενώσεις) λόγω των αλληλεπιδράσεων δεσμού υδρογόνου μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και των συστατικών του NaDES[41].

Το ιξώδες μπορεί εύκολα να ρυθμιστεί, λειτουργώντας σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ή με την προσθήκη της βέλτιστης ποσότητας νερού, που ικανοποιεί και τις δύο απαιτήσεις, για καλύτερη εκχύλιση και ενεργειακή απόδοση[43,47]. Η αραιώση με νερό οδηγεί σε μεγάλη μείωση του ιξώδους του NaDES λόγω των σταδιακά εξασθενημένων αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του NaDES[43]. Απότομη μείωση του ιξώδους κατά την αραιώση με νερό μπορεί να

αποδοθεί στη θραύση των δεσμών υδρογόνου, η οποία έχει επαληθευτεί από τη μελέτη H-NMR[37]. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της κινητικής ενέργειας και της κινητικότητας των μορίων, καθιστώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους πιο αδύναμες[43]. Μια υψηλότερη θερμοκρασία αυξάνει την εντροπία του συστήματος και κατά συνέπεια μειώνει το ιξώδες[40].

Η διακύμανση του ιξώδους κατά την αλλαγή της θερμοκρασίας φαίνεται να ταιριάζει με το μοντέλο Arrhenius[37,43,47]:

$$\ln \eta = \ln \eta_0 + \frac{E_a}{RT} \quad (1)$$

όπου η είναι το ιξώδες, η_0 είναι προ-εκθετική σταθερά, E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά αερίων και T η θερμοκρασία σε βαθμούς K.

Τέλος, το ιξώδες εξαρτάται και από τη φύση των HBA και HBD. Γενικά, τα υδρόφιλα DES είναι πιο παχύρρευστα σε σύγκριση με τα ιοντικά και μη ιοντικά υδρόφοβα DES, ως αποτέλεσμα της εξάλειψης των αλληλεπιδράσεων κυκλομβικού φορτίου[41,45]. Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι το ιξώδες των υδρόφιλων DES επηρεάζεται περισσότερο από τα HBD[45]. Φαίνεται ότι μια αύξηση στην περιεκτικότητα δότη δεσμού υδρογόνου οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του DES. Επιπλέον, μια αύξηση των ομάδων -OH ή -COOH σε οποιοδήποτε συστατικό του DES θα προωθούσε το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, που αποδίδουν ένα σημαντικό πιο σταθερό DES, οπότε και την αύξηση του ιξώδους[24,47].

Μέσω έρευνας παρατηρήθηκε πως το ιξώδες του NaDES Bet:Gly (1:2) είναι μεγαλύτερο από το ιξώδες του NaDES Bet:Gly (1:3) [50]. Επιπλέον, κατά τη μέτρηση του ιξώδους των NaDES με μοριακή αναλογία από 1:3 έως 1:5, το υψηλότερο ιξώδες βρέθηκε στη μοριακή αναλογία 1:4. Αυτά τα αποτελέσματα αιτιολογούνται λόγω του ότι η αύξηση της ποσότητας του HBD στο διαλύτη μπορεί να αυξήσει το μέγεθος των ιοντικών ειδών εξαιτίας του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ HBD και HBA και, ως εκ τούτου, μπορεί να μειώσει είτε την ικανότητά του να ρέει είτε να αυξήσει το ιξώδες. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση στην ποσότητα του HBD μπορεί να μειώσει την ισχύ των δεσμών υδρογόνου μεταξύ HBD και HBA και, επομένως, ο ελεύθερος όγκος του διαλύτη να αυξηθεί και το ιξώδες να μειωθεί. Συνοπτικά δηλαδή, η παρουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ HBA-HBD και ο ελεύθερος όγκος επηρεάζουν το ιξώδες των DES[51].

1.3.4.4 Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση είναι μια σημαντική ιδιότητα των ρευστών, που χρησιμοποιείται κυρίως σε εφαρμογές γαλακτωμάτων και επιφανειοδραστικών ουσιών. Γενικότερα, έχει βρεθεί πως η επιφανειακή τάση μειώνεται γραμμικά κατά την αύξηση της θερμοκρασίας σε βαθμούς K[37].

1.3.4.5 Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης (Refractive Index - RI) είναι επίσης μια σημαντική ιδιότητα διαλύτη, η οποία αναφέρεται σπάνια για IL και DES[37]. Γενικά, οι δείκτες διάθλασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση ουσιών και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους, την επαλήθευση της καθαρότητάς τους ή την εύρεση της συγκέντρωσης ενός διαλύματος[43]. Ο δείκτης διάθλασης είναι υλική ιδιότητα που

εκφράζει τον τρόπο με τον οποίο διαδίδεται το φως μέσω του μέσου και βοηθά στον έλεγχο της καθαρότητας των υλικών. Για διαφανή υγρά, ο δείκτης διάθλασης είναι μεταξύ 1 - 2[46].

Μέσω έρευνας, για όλα τα NaDES που διερευνήθηκαν, ο δείκτης διάθλασης μειώθηκε γραμμικά με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό. Παρατηρήθηκε γραμμική εξάρτηση μεταξύ του δείκτη διάθλασης και της πυκνότητας του ίδιου NaDES. Οι λόγοι για αυτό είναι οι προσθετικές ιδιότητες και των δύο τιμών και οι φυσικές ιδιότητες του νερού (χαμηλότερη πυκνότητα και δείκτης διάθλασης)[43]. Επιπλέον, οι τιμές των δεικτών διάθλασης μειώνονται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας σε Κ λόγω της μείωσης της πυκνότητας[37,43].

1.3.4.6 Αγωγιμότητα

Η αγωγιμότητα εξαρτάται από τα διαθέσιμα ιόντα, καθώς και από την κινητικότητα και το σθένος τους. Λόγω του υψηλού ιξώδους τους, τα περισσότερα NaDES παρουσιάζουν ιοντική αγωγιμότητα μικρότερη από 2 mS/cm σε θερμοκρασία δωματίου[43].

Μέσω μελετών, αποδείχθηκε πως η αγωγιμότητα εξαρτάται από τη σύνθεση των NaDES και ελαττώνεται ως εξής[37]:

βάση/πολυαλκοόλη > βάση/οργανικό οξύ ~ βάση/σάκχαρο > οργανικό οξύ/αμινοξύ (μη πολικό) > οργανικό οξύ/σάκχαρο > σάκχαρο/σάκχαρο.

1.3.4.7 Πολικότητα

Η πολικότητα είναι μια βασική παράμετρος για ένα διαλύτη, που καθορίζει τη διαλυτοποιητική του ισχύ και παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα εκχύλισης και την ανάμιξή του με άλλους διαλύτες[37,41]. Η πολικότητα του διαλύτη προσδιορίζεται συνήθως με βάση τη μετατόπιση της ζώνης απορρόφησης μεταφοράς φορτίου ενός διαλυτοχρωμικού ανιχνευτή, όπως του δείκτη Ερυθρού του Νείλου (Nile Red), παρουσία του διαλύτη[37]. Τα περισσότερα NaDES που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι υδρόφιλα, ενώ τα υδρόφοβα NaDES αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία για πρώτη φορά το 2015 και η αξιοποίησή τους δεν έχει ακόμη διερευνηθεί[41].

Μεταξύ των υδρόφιλων NaDES, τα NaDES που βασίζονται σε οργανικά οξέα είναι τα πιο πολικά (44,81 kcal/mol), ακολουθούμενα από εκείνα με βάση τα αμινοξέα (48,0–49,55 kcal/mol) καθώς και τα NaDES με βάση καθαρά σάκχαρα, με πολικότητα παρόμοια με το νερό (48,21 kcal/mol). Τόσο τα NaDES με βάση σάκχαρα όσο και με πολυαλκοόλες είναι τα λιγότερο πολικά (48,2–50,1 kcal/mol), με πολικότητα κοντά σε αυτή της μεθανόλης (51,89 kcal/mol)[37,41]. Τα υδρόφιλα NaDES συνήθως παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησης για πολικούς μεταβολίτες, λόγω της εγγενούς υψηλής πολικότητάς τους, αλλά θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε ορισμένους μη υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες[41]. Η πολικότητα ενός NaDES μπορεί επίσης να βελτιωθεί με προσθήκη νερού[37].

1.3.4.8 Διαλυτοποιητική Ισχύς

Τα NaDES είναι ικανά να διαλύσουν ένα ευρύ φάσμα κακώς υδατοδιαλυτών μεταβολιτών ή φυσικών προϊόντων με χαμηλό μοριακό βάρος (π.χ. ρουτίνη, πακλιταξέλη, γινγκολίδη Β, κερκετίνη) ή υψηλό (π.χ. άμυλο, DNA, πρωτεΐνες). Η διαλυτότητα μιας ένωσης στο NaDES μπορεί να σχετίζεται με την πολικότητα του διαλύτη και μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με την αύξηση της θερμοκρασίας ή την προσθήκη νερού, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στην πραγματικότητα, υπάρχει μια σχέση σε σχήμα καμπάνας μεταξύ της διαλυτότητας μιας διαλυμένης ουσίας και της περιεκτικότητας σε νερό στο NaDES, και η βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό ποικίλει αναλόγως τη διαλυμένη ουσία. Μια μελέτη NMR έχει προτείνει ότι ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του NaDES και της διαλυμένης ουσίας ίσως είναι υπεύθυνος για την ενισχυμένη διαλυτότητα αυτών των ενώσεων[37].

Η ικανότητα του NaDES να διαλύει ενώσεις-στόχους στα φυτά μπορεί να τροποποιηθεί προσαρμόζοντας τον τύπο των συστατικών NaDES στην κατάλληλη μοριακή αναλογία και μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα σε νερό στο NaDES [44].

1.3.4.9 Επίδραση του νερού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το νερό επιδρά καθοριστικά στις ιδιότητες και τη δομή ενός NaDES. Η αραίωση με νερό οδηγεί σε μείωση της πυκνότητας και του ιξώδους των NaDES και σε αύξηση της πολικότητας. Μελέτες NMR έχουν αποκαλύψει ότι η προσθήκη νερού έχει ως αποτέλεσμα τη θραύση των δεσμών υδρογόνου στο ευτηκτικό μείγμα, οδηγώντας τελικά σε ρήξη της υπερμοριακής δομής του[37]. Η παρουσία ορισμένων ποσοτήτων νερού, που συμμετέχουν επίσης στους δεσμούς υδρογόνου, επηρεάζει σημαντικά τη διάταξη των μορίων στο NaDES, ενισχύοντας την κινητικότητά τους και διατηρώντας παράλληλα τα μοναδικά χαρακτηριστικά τους. Η παρουσία νερού μειώνει το σημείο τήξης ορισμένων NaDES και, τελικά, αλλάζει τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά (ιξώδες, πολικότητα, πυκνότητα και αγωγιμότητα) και τις ιδιότητες διαλυτοποίησης[41].

Επιπλέον, έχει εξεταστεί και ο δομικός μετασχηματισμός κατά την προσθήκη μεγάλων συγκεντρώσεων νερού σε ένα NaDES και η μετατροπή του από ευτηκτικό μείγμα σε υδατικό διάλυμα. Σε έρευνα για το DES χλωριούχος χολίνη:ουρία:νερό, αναφέρεται πως για περιεκτικότητα σε νερό 51% w/w, παρατηρήθηκε η μετάβασή του σε υδατικό διάλυμα[52].

Στο NaDES χλωριούχος χολίνη:γλυκερόλη, μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατηρήθηκαν τρεις διαφορετικές περιοχές, όπου στην πρώτη (έως και 11% w/w νερό) η δομή του DES παραμένει άθικτη, στη δεύτερη (μεταξύ 11 και 35 % w/w) η δομή DES παραμένει αλλά υπάρχει μερική διαλυτοποίηση των συστατικών, και στην τρίτη (στο 35% w/w) η δομή διαταράσσεται και συμβαίνει η μετάβαση σε υδατικό διάλυμα[52].

Έτσι, μελετήθηκε επιπλέον το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη, όπου παρατηρήθηκε μια συνεχής δομική μετάβαση με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό,

παρουσιάζοντας ένα σημαντικό δομικό μετασχηματισμό στην περιεκτικότητα σε νερό 29,5% w/w[52].

Τα μόρια του νερού είναι αρκετά μικρά ώστε να καταλαμβάνουν τις κοιλότητες κοντά στα μόρια βεταΐνης και γλυκερόλης, αποδυναμώνοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του DES, με αποτέλεσμα να ενισχύουν τη διάχυση και να προάγουν την απομάκρυνση των συστατικών από τα στρώματα αμοιβαίας διαλυτοποίησής τους. Κάθε μόριο γλυκερόλης και βεταΐνης αντικαθίσταται, από ~3 και ~5 μόρια νερού, αντίστοιχα, με υψηλότερα ποσοστά κένωσης, κατά την προσθήκη νερού, να παρατηρούνται για τη γλυκερόλη γύρω από τη βεταΐνη και για τη γλυκερόλη γύρω από τη γλυκερόλη, ενώ παρατηρήθηκε ομαλή μετάβαση μεταξύ ενός DES και ενός υδατικού διαλύματος[52].

Γίνεται σύγκριση, λοιπόν, με το DES χλωριούχος χολίνη:ουρία:νερό, για το οποίο βρέθηκε ένας μη συνεχής δομικός μετασχηματισμός, που δείχνει μια μη μονοτονική εξάρτηση από το νερό των αριθμών συντονισμού χολίνης-χολίνης και χολίνης-νερού. Ενώ αυτό υποδηλώνει μια σημαντική διαφορά μεταξύ της ικανότητας του κατιόντος χολίνης και της βεταΐνης (αμφοτερονική) να δεσμεύουν νερό, η διαφορετική φύση της HBD (ουρία και γλυκερόλη) θα μπορούσε να παίξει σημαντικό ρόλο στο ρυθμό κένωσης του HBD γύρω από το HBA. Αυτό, σχετίζεται με το μέγεθος των δεσμών υδρογόνου, που σχηματίζονται μεταξύ των συστατικών στα δυαδικά μείγματα και μεταξύ των τελευταίων και των μορίων του νερού στα τριμερή συστήματα[52].

1.3.4.10 Τιμή pH

Η τιμή του pH είναι ένα άλλο κρίσιμο χαρακτηριστικό, το οποίο μπορεί να παρέχει καθοδήγηση στην επιλογή του τύπου υλικού και άλλου εξοπλισμού. Έχει ληφθεί μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του pH και της θερμοκρασίας, η οποία δείχνει πως καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία μειώνεται το pH[43].

Είναι σαφές ότι το pH του NaDES δε δείχνει ισχυρή εξάρτηση από τη θερμοκρασία. Αντίθετα, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ HBD και HBA φαίνεται να έχουν ισχυρή επίδραση στην οξύτητα των NaDES. Τα NaDES που παρασκευάζονται με οργανικά οξέα (σε ρόλο είτε δέκτη είτε δότη) και χλωριούχο χολίνη ή γλυκόζη έχουν εξαιρετικά υψηλή οξύτητα[43].

1.3.4.11 Πτητικότητα NaDES

Το γεγονός ότι τα NaDES έχουν χαμηλή τάση ατμών επιτρέπει το διαχωρισμό των εκχυλισμένων ενώσεων με απόσταξη χωρίς μόλυνση από το διαλύτη και χωρίς εκπομπές στην ατμόσφαιρα. Όμως, εξακολουθεί να υπάρχει περιορισμένος αριθμός τεχνικών για τη συμπύκνωση και την απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από τα NaDES[41].

Επειδή τα IL, DES και NaDES παρουσιάζουν, όπως προαναφέρθηκε, χαμηλή τάση ατμών, ο διαχωρισμός τους από τις ενώσεις-στόχους με τη μέθοδο εξάτμισης είναι δύσκολος. Ακόμη και αν ληφθεί υπόψη αυτή η δυσκολία, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη μεθόδων διαχωρισμού της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη, με την άποψη της ανακύκλωσης διαλυτών. Κατά συνέπεια, μέθοδοι όπως η

εκχύλιση στερεού-υγρού (SLE) με χρήση ρητίνης ή μοριακών κοσκίνων, η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) με έμφαση στη χρήση αντιδιαλύτη, η υπερδιήθηση και η ηλεκτροδιάλυση ή η επανεκχύλιση και η προσρόφηση έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό της διαλυμένης ουσίας από τους διαλύτες αυτούς[36].

Η αναγέννηση και η ανακύκλωση των διαλυτών NaDES είναι σημαντικές εργασίες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Διάφορες πτυχές επηρεάζουν την επαναχρησιμοποίηση αυτών των διαλυτών, όπως τα χαρακτηριστικά τους, τα χαρακτηριστικά της διαλυμένης ουσίας, η μέθοδος και η απόδοση διαχωρισμού, η απαίτηση ενέργειας, το κόστος διεργασίας και διαλυτών[36].

Πέραν του διαχωρισμού όμως, αναφέρεται πως μπορούν να ενσωματωθούν απευθείας στα τελικά προϊόντα χωρίς πρόσθετα χρονοβόρα και δαπανηρά στάδια καθαρισμού προκειμένου να ανακτηθούν οι βιοδραστικές ενώσεις από το διαλύτη, εφόσον έχουν διεξαχθεί οι απαραίτητες δοκιμές τοξικότητας και βιοσυμβατότητας[42].

1.3.5 Βιοαποικοδομησιμότητα NaDES

Η βιοαποικοδόμηση των NaDES έχει αξιοσημείωτο αντίκτυπο στη συνολική οικοτοξικολογική επίδρασή τους. Η πλειονότητα των συστατικών NaDES που έχουν ερευνηθεί, ταξινομήθηκαν ως εύκολα βιοαποδομήσιμες ενώσεις. Διαπιστώθηκε πως δεν είναι όλα τα NaDES εξαιρετικά βιοαποδομήσιμα και ότι η βιοαποικοδόμησή τους σχετίζεται με τη χημική τους φύση. Επιβεβαιώθηκε επιπλέον, ότι η αραίωση του NaDES με νερό εξασθενεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του, οι οποίες εξαφανίστηκαν πλήρως με αραίωση του NaDES κατά 50% v/v. Κατά συνέπεια, η αραίωση του NaDES έχει καταλυτική επίδραση στην παρατηρούμενη βιοαποικοδόμηση[41]. Δηλαδή, ένα μη αραιωμένο NaDES θα αποικοδομηθεί πολύ αργά, αλλά εάν προστεθεί επαρκής ποσότητα νερού σε αυτό πριν από την απόρριψή του, η βιοαποικοδόμηση γίνεται εύκολα.

Επιπλέον, σε έρευνα αναφέρθηκε εύκολη βιοαποικοδόμηση NaDES, η οποία ακολουθεί την εξής σειρά: DES με βάση αμίνες \approx DES με βάση σάκχαρα $>$ DES με βάση αλκοόλη $>$ DES με βάση οξέα[37]. Η βιοαποικοδομησιμότητα σχετίζεται με την αναλογία των συστατικών των NaDES[36].

1.3.6 Τοξικότητα NaDES

Γενικά, τα DES αναφέρονται ως «ασφαλή» και «μη τοξικά» ή «χαμηλής τοξικότητας», χωρίς καμία άλλη αιτιολόγηση εκτός από την ασφάλεια και τη χαμηλή τοξικότητα των συστατικών τους. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση μπορεί να ισχύει μόνο στην περίπτωση των NaDES, τα οποία αποτελούνται από φυσικά απαντώμενες ενώσεις, και ως εκ τούτου μπορεί να θεωρηθούν ως εγγενώς μη τοξικά[24,48]. Σημειώνεται όμως, πως δεν μπορεί να γίνει επέκταση της μη τοξικότητας των επιμέρους συστατικών σε μη τοξικότητα των NaDES[41]. Το «πράσινο» δε σημαίνει ασφαλές, και εξακολουθεί να υπάρχει διαμάχη σχετικά με την πιθανή τοξικότητά τους. Η βιβλιογραφία σχετικά με την τοξικότητα των DES ή NaDES συνεχίζει να είναι σπάνια, και στην πλειονότητα των δημοσιευμένων εργασιών που αφορούν στη χρήση τους ως διαλυτών εκχύλισης, δεν περιλαμβάνονται δοκιμές τοξικότητας[24,48]. Η έλλειψη δεδομένων σχετικά με τις πραγματικές τοξικολογικές επιπτώσεις των NaDES αποτελεί απειλή για τη χρήση τους,

ειδικά στον κλάδο της υγείας. Ενώ τα NaDES είναι λιγότερο τοξικά από τους συμβατικούς διαλύτες, αυτό δεν αποδεικνύει ότι δε θα παρουσιάσουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, ειδικά όσον αφορά στη χρόνια χρήση τους[48].

Το NaDES που επιλέγεται ως εναλλακτικός διαλύτης πρέπει να έχει υψηλή εκλεκτικότητα προς βιολογικούς στόχους, με τη χαμηλότερη δυνατή τοξικότητα. Είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι χημικές και φυσικές πτυχές των συστατικών του NaDES κατά τη διεξαγωγή της σύνθεσης του ευτηκτικού μείγματος για τη βελτιστοποίηση της διαλυτότητας και της σταθερότητας των βιοδραστικών ενώσεων. Η επιλογή του κατάλληλου τύπου NaDES και η βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένη απόδοση εκχύλισης φυτικών μεταβολιτών, ενώ πληροί την αρχή της πράσινης εκχύλισης σε σύγκριση με αυτή των συμβατικών διαλυτών. Χρειάζεται να υπογραμμισθεί ότι η αξιολόγηση των βιολογικών επιδράσεων ενός εκχυλίσματος απαιτεί συγκριτικό έλεγχο, ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί εάν το αποτέλεσμα οφείλεται στη δραστική ένωση, στο καθαρό NaDES ή στην αλληλεπίδραση των δύο[44].

Γενικά, τα DES και NaDES είναι λιγότερο τοξικά από τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και τα NaDES είναι λιγότερο τοξικά και σε μεγαλύτερο βαθμό βιοδιασπώμενα από τα DES και τα IL[36,49].

1.4 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων

Η εκχύλιση διαχωρίζει το δραστικό μείγμα πολλών φυσικά ενεργών ενώσεων, που συνήθως περιέχονται μέσα σε φυτικά υλικά (ιστούς), χρησιμοποιώντας εκλεκτικούς διαλύτες μέσω της τυπικής διαδικασίας. Έτσι, ο σκοπός κάθε εκχύλισης είναι ο διαχωρισμός των διαλυτών φυτικών μεταβολιτών, αφήνοντας πίσω τα αδιάλυτα κυτταρικά στέμφυλα, γνωστά ως υπόλειμμα. Το λαμβανόμενο προϊόν είναι ένα σχετικά σύνθετο μείγμα μεταβολιτών, σε υγρή, ημιστερεή κατάσταση ή σε μορφή ξηρής σκόνης (μετά την αφαίρεση του νερού) και προορίζεται για στοματική ή/και εξωτερική χρήση. Η εκχύλιση βασίζεται στη διαφορά διαλυτότητας μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και άλλων ενώσεων στη μήτρα στο διαλύτη[1].

Η εκχύλιση φυτοχημικών συστατικών όπως φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, τανίνες, αλκαλοειδή, τερπενοειδή, στεροειδή και γλυκοσίδες από διαφορετικά φυτικά υλικά (φύλλα, μίσχοι, καρποί, σπόροι, ρίζες κ.λπ.) είναι ένα αρχικό βήμα για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών και την απομόνωση φυτοχημικών ενώσεων, οι οποίες είναι ως επί το πλείστον βιοενεργά φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ως πηγές για την ανάπτυξη φαρμακευτικών συστατικών[44].

Κατά την εκχύλιση, ο διαλύτης πρέπει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: να έχει υψηλή εκλεκτικότητα (πολικότητα όμοια με την ένωση-στόχο) και ασφάλεια (χαμηλή τοξικότητα, μη εκρηκτικός και μη εύφλεκτος), να είναι εύκολο να διαχωριστεί από τις ενώσεις-στόχους, να έχει χαμηλό ιξώδες (ευκολία μεταφοράς μάζας) και χαμηλή θερμοκρασία βρασμού (αποτρέπει την αποικοδόμηση των ενώσεων) και να είναι οικονομικός (όσο το δυνατόν φθηνότερος)[44].

1.4.1 Μέθοδοι εκχύλισης

Γενικά, υπάρχουν τρεις συνήθεις τύποι εκχυλίσεων: υγρού/στερεού (Solid-Liquid Extraction - SLE), υγρού/υγρού (Liquid-Liquid Extraction - LLE) και οξέος/βάσης (Acid-Base Extraction). Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης, λαμβάνονται υπόψη τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, ο χρόνος εκχύλισης, το μέγεθος των σωματιδίων και η ανάδευση κατά την εκχύλιση[1].

Η αρχή της εκχύλισης στερεού-υγρού είναι ότι όταν ένα στερεό υλικό έρχεται σε επαφή με το διαλύτη, τα διαλυτά συστατικά του στερεού υλικού διαλύονται και μετακινούνται στο διαλύτη[1].

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές εκχύλισης για τους μεταβολίτες που υπάρχουν στα φυτά. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν σε συμβατικές και νέες. Συμβατικές τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούν κάποιον οργανικό διαλύτη (εξάνιο, ακετόνη, μεθανόλη, αιθανόλη κ.λπ.) ή νερό και εκτελούνται γενικά σε ατμοσφαιρική πίεση, ενώ οι νέες τεχνικές χρησιμοποιούν πίεση ή/και υψηλές θερμοκρασίες[53]. Η διαφοροποίηση στις διαδικασίες εκχύλισης εξαρτάται συνήθως από βασικούς παράγοντες όπως ο χρόνος εκχύλισης, η χρησιμοποιούμενη θερμοκρασία, το μέγεθος των σωματιδίων των ιστών, η αναλογία διαλύτη προς δείγμα, το pH του διαλύτη[1].

Όλες αυτές οι διαδικασίες εκχύλισης έχουν ως στόχο την απομάκρυνση στοχευμένων βιοδραστικών συστατικών από το φυτό, την αύξηση της εκλεκτικότητας των αναλυτικών μεθόδων και της ευαισθησίας της εκχύλισης με αύξηση της συγκέντρωσης των ενώσεων-στόχων, τη μετατροπή των βιοδραστικών ενώσεων σε πιο κατάλληλη μορφή για την ανίχνευση και το διαχωρισμό τους και τέλος την παροχή μιας ισχυρής και επαναλήψιμης μεθόδου, ανεξάρτητης από διακυμάνσεις της μήτρας του δείγματος[53].

Σχεδόν όλες οι συμβατικές μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα εκχύλισης των διαλυτών και στη συνδυαστική δράση της θερμότητας ή/και της ανάμειξης. Μεταξύ των συμβατικών τεχνικών, υπάρχουν οι παραδοσιακές μεθοδολογίες εκχύλισης στερεού-υγρού, όπως διαβροχή, χώνευση, έγχυση, αφέψημα, εκχύλιση Soxhlet και υδροαπόσταξη[53].

Η υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (Ultrasound-assisted extraction-UAE), η εκχύλιση υπό πίεση (pressurized-liquid extraction-PLE), η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (microwave-assisted extraction-MAE), η υποβοηθούμενη από υπερήχους και μικροκύματα εκχύλιση (ultrasound-microwave-assisted extraction-UMAE), η εκχύλιση με ομογενοποίηση (homogenate-assisted extraction-HAE) και η παλμική εκχύλιση με υπερήχους (pulse-ultrasound-assisted extraction-PUAE) είναι μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της διαδικασίας εκχύλισης, χρησιμοποιώντας το NaDES ως διαλύτη[47,53].

1.4.1.1 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

1.4.1.1.1 Διαβροχή

Η διαβροχή είναι μια μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού, όπου η βιοδραστική ένωση (διαλυμένη ουσία) του φυτικού υλικού εκχυλίζεται σε θερμοκρασία δωματίου με εμβάπτιση του φυτικού υλικού στο διαλύτη για μια χρονική περίοδο, συνήθως 2-3 ημερών. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας διαβροχής καθορίζεται από δύο κύριους παράγοντες: τη διαλυτότητα και την αποτελεσματική διάχυση[1,53]. Πριν τη διαβροχή, τα φυτικά υλικά μετατρέπονται σε μορφή σκόνης με άλεση, με στόχο την καλή επαφή μεταξύ του διαλύτη και του φυτικού υλικού, και έπειτα ο διαλύτης προστίθεται σε ένα κλειστό δοχείο. Στη συνέχεια, το υγρό στραγγίζεται και το στερεό υπόλειμμα πιέζεται για να ανακτηθεί όποια ποσότητα εκχυλίσματος έχει συγκρατηθεί. Κατά τη διαδικασία της διαβροχής, η περιστασιακή ανακίνηση διευκολύνει την εκχύλιση, αυξάνοντας τη διάχυση, και αφαιρεί το συμπυκνωμένο διάλυμα από την επιφάνεια του δείγματος, για να φέρει νέο διαλύτη σε αυτό, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης[53].

1.4.1.1.2 Χώνευση

Η χώνευση είναι ένα είδος διαβροχής στο οποίο εφαρμόζεται ήπια θερμότητα. Χρησιμοποιείται όταν η μέτρια αυξημένη θερμοκρασία δεν είναι ανεπιθύμητη και δεν αλλοιώνει τα ενεργά συστατικά του φυτικού υλικού, ενώ η αποτελεσματικότητα του διαλύτη αυξάνεται με αυτή την αύξηση της θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι μεταξύ 35 και 40°C, αν και μπορεί να φτάσουν και μέχρι τους 50°C. Το προς εκχύλιση μέρος του φυτού τοποθετείται σε δοχείο με τον προθερμασμένο διαλύτη στις ενδεικνυόμενες θερμοκρασίες και διατηρείται για διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από μισή ώρα έως 24 ώρες, ανακινώντας το δοχείο τακτικά. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για το φυτικό υλικό ή τα μέρη φυτών που περιέχουν κακοδιαλυτές ουσίες ή πολυφαινολικές ενώσεις[1].

1.4.1.1.3 Έγχυση

Η έγχυση είναι μια απλή χημική διαδικασία που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση φυτικού υλικού που είναι πτητικό και διαλύεται εύκολα ή απελευθερώνει εύκολα τα δραστικά συστατικά του σε οργανικούς διαλύτες. Το έγχυμα και το αφέψημα χρησιμοποιούν την ίδια αρχή με τη διαβροχή. Και τα δύο περιλαμβάνουν εμβάπτιση του φυτικού υλικού σε βρασμένο ή κρύο νερό, το οποίο στη συνέχεια αφήνεται για μικρότερο χρόνο από ότι στη διαβροχή. Το υγρό μπορεί μετά να διαχωριστεί και να συμπυκνωθεί υπό κενό χρησιμοποιώντας έναν περιστροφικό εξατμιστήρα[1].

1.4.1.1.4 Αφέψημα

Η τρέχουσα διαδικασία περιλαμβάνει βρασμό του φυτικού υλικού σε νερό για να ληφθούν φυτικά εκχυλίσματα[1]. Είναι μια μέθοδος κατάλληλη για την εκχύλιση των συστατικών που είναι διαλυτά στο νερό και θερμοσταθερά, δηλαδή που δεν καταστρέφονται υπό την επίδραση της θερμότητας. Κατά τη διάρκεια του αφεψήματος,

στην αποξηραμένη πρώτη ύλη προστίθεται απεσταγμένο νερό και το μείγμα υποβάλλεται σε συνεχή θέρμανση για ένα χρονικό διάστημα (15 λεπτά με 1 ώρα) σε θερμοκρασία 100°C. Στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται διήθηση για να ληφθεί το διήθημα, που συμπυκνώνεται στο τελικό εκχύλισμα[1,53].

1.4.1.1.5 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια απλή μέθοδος για συνεχείς επαναλαμβανόμενους κύκλους εκχύλισης με φρέσκο διαλύτη, μέχρι την πλήρη εξάντληση των διαλυμένων ουσιών-στόχων στην πρώτη ύλη. Στην εκχύλιση Soxhlet εμπλέκεται η διαδικασία της απόσταξης. Γίνεται θέρμανση ενός διαλύματος μέχρι βρασμού και στη συνέχεια συμπύκνωση και αποστολή του διαλύτη πίσω στην αρχική φιάλη, όντας καθαρός[53]. Όμως, δεν υπάρχει δυνατότητα ανάδευσης και απαιτείται μεγάλη ποσότητα διαλύτη. Αυτή η μέθοδος είναι ακατάλληλη για θερμοευαίσθητες ενώσεις, καθώς η παρατεταμένη έκθεση στη θερμότητα μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμησή τους[1].

Αυτές οι τεχνικές είναι οι ευκολότερες και απλούστερες μέθοδοι. Παρά την καθιέρωση προηγμένων μεθόδων εκχύλισης, το δυναμικό των συμβατικών εκχυλίσεων στερεού-υγρού εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για τη λήψη δραστικών ενώσεων από φυτά[1].

Ένα σημείο συμφόρησης για τη συμβατική εκχύλιση είναι το ότι είναι μια χρονοβόρα, επίπονη διαδικασία. Ο ρυθμός εκχύλισης μπορεί να βελτιωθεί με επεξεργασία σε υψηλή θερμοκρασία, αλλαγή συστήματος διαλύτη ή μηχανική ανάδευση. Ωστόσο, η επεξεργασία σε υψηλή θερμοκρασία μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα σε εκχυλισμένες ενώσεις-στόχους, γι' αυτό χρησιμοποιούνται μη συμβατικές τεχνικές, όπως εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων[47].

1.4.1.2 Νέες μέθοδοι εκχύλισης

1.4.1.2.1 Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων

Η κύρια κινητήρια δύναμη στη UAE, η ακουστική σπηλαίωση, δημιουργεί μικροπίδακες, κρουστικά κύματα και άλλες ισχυρές δυνάμεις τάνυσης που καταστρέφουν τα τοιχώματα των φυτών, αυξάνουν την επιφάνεια επαφής μήτρας-διαλύτη, ενισχύουν τη διεισδυτικότητα του διαλύτη και στη συνέχεια διευκολύνουν τη μεταφορά μάζας και την απελευθέρωση των μορίων-στόχων στο διαλύτη[41,42,53,54]. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από απλότητα στη χρήση, μικρότερους χρόνους εκχύλισης, μη ανάγκη για υψηλές θερμοκρασίες, βελτιωμένες επιδόσεις εκχύλισης και συχνά καλύτερη ποιότητα εκχυλίσματος, απουσία ανεπιθύμητων περιβαλλοντικών επιπτώσεων, οπότε και θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη πράσινη εκχύλιση[42]. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της UAE είναι ο χρόνος εκχύλισης, η ισχύς, ο διαλύτης, η αναλογία Υγρού/Στερεού (L/S), το φυτικό υλικό, η συχνότητα, το πλάτος και η ένταση[1].

1.4.1.2.2 Εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων

Στη ΜΑΕ, η ενέργεια μικροκυμάτων μετατρέπεται σε θερμότητα με μηχανισμούς ιοντικής αγωγιμότητας και περιστροφής διπόλων, τόσο στο διαλύτη όσο και στο δείγμα, που μπορεί να βελτιώσει τη διαθεσιμότητα των δραστικών ενώσεων, διακόπτοντας τη σύνδεσή τους στη μήτρα του φυτού[41,53]. Τα μικροκύματα διεισδύουν στα βιοϋλικά και παράγουν θερμότητα αλληλεπιδρώντας με πολικά μόρια, όπως το νερό, μέσα στα υλικά[53].

Συμπερασματικά, οι συμβατικές μέθοδοι βασίζονται στη διαλυτότητα της διαλυμένης ουσίας από φυτικά υλικά σε διαλύτες. Ως εκ τούτου, συχνά χρησιμοποιείται μεγάλη ποσότητα διαλύτη για την εκχύλιση της επιθυμητής διαλυμένης ουσίας, παρόλο που μερικές φορές υποβοηθάται με αυξημένη θερμοκρασία και μηχανική ανάδευση ή ανακίνηση. Με τις σύγχρονες μεθόδους, η κατανάλωση διαλύτη μειώνεται και μπορεί να επιτευχθεί καλή εκχύλιση σε μικρότερο χρονικό διάστημα και το ανακτηθέν εκχύλισμα μπορεί να έχει υψηλότερη απόδοση και ποιότητα από αυτό που παρασκευάζεται με συμβατική μέθοδο. Μέθοδοι όπως οι ΜΑΕ και UAE είναι καταλληλότερες για την εκχύλιση ασταθών στη θερμότητα και πτητικών ενώσεων. Σε όλες αυτές τις τεχνικές η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από τη φύση της ένωσης-στόχου[53].

Οι εκχυλίσεις με NaDES συχνά συνδυάζονται με τεχνολογίες υπερήχων (UAE) και μικροκυμάτων (MAE). Και οι δύο έχουν μειωμένο χρόνο εκχύλισης, αυξημένες αποδόσεις και συχνά βελτιωμένη ποιότητα του εκχυλίσματος, επομένως κατηγοριοποιούνται στις τεχνικές «Πράσινης Εκχύλισης». Η διείσδυση του NaDES στη μήτρα μπορεί να βελτιωθεί από τη θερμότητα που παράγεται κατά τη διάρκεια των UAE και MAE. Η θερμότητα μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, έτσι ώστε να είναι δυνατή η διείσδυση του διαλύτη, με αποτέλεσμα την αυξημένη απόδοση εκχύλισης[41].

1.4.2 Πλεονεκτήματα χρήσης NaDES ως διαλυτών εκχύλισης

Λόγω των βασικών πλεονεκτημάτων των NaDES, θεωρούνται μια ασφαλής, πιο φιλική προς το περιβάλλον και αποτελεσματική εναλλακτική λύση σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες. Εφαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων, όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα (ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων), η ηλεκτροχημεία (ως ηλεκτρολύτες και στην ηλεκτροχημική ανίχνευση φαινολικών), η κατάλυση, η επεξεργασία λιγνοκυτταρινικής βιομάζας, οι εκχυλίσεις βιοδραστικών ενώσεων και η οργανική σύνθεση[42,45,49].

Η αποτελεσματικότητα ενός παράγοντα εκχύλισης εξαρτάται από τις ιδιότητες διαλυτοποίησής του. Τα DES έχουν την δυνατότητα να δίνουν και να δέχονται πρωτόνια και ηλεκτρόνια, γεγονός που τους δίνει την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, αυξάνοντας επομένως τη διαλυτοποιητική τους ισχύ. Αυτό επιβεβαιώθηκε μέσω έρευνας, όπου επιτεύχθηκε υψηλή απόδοση εκχύλισης, η οποία σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των NaDES. Ακόμα, οι φυσικές ιδιότητες του NaDES, όπως η πολικότητα και το ιξώδες, έχουν επίσης μεγάλη επίδραση στην εκχύλιση. Βελτιστοποιώντας όλες τις παραμέτρους (ιξώδες, πολικότητα και θερμοκρασία), οι συγγραφείς αναφέρουν υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης φαινολικών ενώσεων

χρησιμοποιώντας NaDES σε σύγκριση με συμβατικούς διαλύτες, όπως το νερό και η αιθανόλη[39].

Ως διαλύτες εκχύλισης, τα NaDES έχουν δύο μηχανισμούς δράσης, συγκεκριμένα: (1) άμεση δράση (αλληλεπίδραση με ενώσεις-στόχους, συνήθως μέσω δεσμών υδρογόνου) και (2) έμμεση δράση (καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος, απελευθέρωση της ένωσης-στόχου από τη φυτική μήτρα), όπου τα NaDES λειτουργούν ως διαλύτες προεπεξεργασίας[44].

Εκτός από την επιλογή κατάλληλων NaDES για την αύξηση της διαλυτότητας της ένωσης-στόχου στη διαδικασία εκχύλισης, είναι επίσης απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι συνθήκες εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου εκχύλισης. Έτσι, η επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού του NaDES και της μεθόδου εκχύλισης αναμφίβολα θα είναι σε θέση να αυξήσει τη διαλυτότητα της ένωσης-στόχου στο NaDES. Αυτή η απόδοση εκχύλισης σχετίζεται με τη μείωση του όγκου του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, του κόστους λειτουργίας και του χρόνου εκχύλισης[44].

Πρόσφατα, η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί στα NaDES, επειδή παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτημάτων, όπως αμελητέα πτητικότητα, μη ευφλεκτότητα, ικανότητα διάλυσης μιας ποικιλίας ενώσεων, χημική και θερμική σταθερότητα, ρυθμιζόμενο ιξώδες, παραμονή σε υγρή κατάσταση σε ευρεία κλίμακα θερμοκρασίας και φθηνές, εύκολες και γρήγορες διαδικασίες προετοιμασίας με υψηλή καθαρότητα και χωρίς δημιουργία απορριμμάτων. Λόγω αυτών των ανώτερων χαρακτηριστικών και ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εκχυλίσματα μεγάλης ποικιλίας δευτερογενών μεταβολιτών από φυσικές πηγές, όπως φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή, σαπωνίνες, αιθέρια έλαια, τερπενοειδή, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και φωτοσυνθετικές χρωστικές[42].

Οι ιδιότητες των NaDES, όπως η χημική και η θερμική σταθερότητα, συνδέονται επίσης με την αποθήκευση φυσικών ενώσεων. Εκτός από την ικανότητα εκχύλισής τους, η αυξημένη σταθερότητα των φυσικών ενώσεων κατά την εκχύλιση και την αποθήκευση (όπως οι φαινολικές ενώσεις) είναι ένα άλλο πλεονέκτημα της χρήσης NaDES έναντι των παραδοσιακών διαλυτών[41,44]. Λόγω των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, το NaDES δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας κατά της οξειδωτικής αποικοδόμησης και ως μέσο αποθήκευσης για τα επιθυμητά αλλά και ευαίσθητα εκχυλισμένα βιοενεργά μόρια[36,41,42,44,48]. Η σταθεροποιητική ικανότητα του NaDES για τις ενώσεις-στόχους είναι απαραίτητη για περαιτέρω εφαρμογές σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα, ενώ η υπεροχή των «φυσικών» συστατικών του υποστηρίζει την πράσινη τεχνολογία[44].

Μελετήθηκε για παράδειγμα η εκχύλιση της ένωσης καρθαμίνης με NaDES, όπου εξήχθη το συμπέρασμα πως το υψηλό ιξώδες των NaDES και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του διαλύτη και της καρθαμίνης είναι υπεύθυνα για τις προστατευτικές επιδράσεις έναντι της θερμότητας, του φωτός και της υποβάθμισης με την πάροδο του χρόνου, αυξάνοντας τη σταθερότητα του βιοσυστατικού[36].

Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν υψηλότερες επιδόσεις εκχύλισης (απόδοση, εκλεκτικότητα) του NaDES σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες, ενώ αναφέρεται

πως μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα και τη βιοδραστικότητα των ενώσεων-στόχων σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες[44,48]. Επιπλέον, τα NaDES είναι συμβατά με σύγχρονες διαδικασίες εκχύλισης (υπέρηχοι, μικροκύματα), ενώ έχουν σχεδόν μηδενική τάση ατμών, που σημαίνει λιγότερη ατμοσφαιρική ρύπανση[48].

Τα NaDES παρουσιάζουν ιδανικές ιδιότητες για χρήση ως εναλλακτικοί διαλύτες εκχύλισης, όπως το ότι είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου (και μερικές φορές ακόμη και κάτω από 0 °C), έχουν ιξώδες που μπορεί να ρυθμιστεί εύκολα και είναι ασφαλή. Επιπλέον, εφόσον τα NaDES μπορούν να διαλύσουν τόσο πολικούς όσο και μη πολικούς μεταβολίτες, προβλέπεται ότι μπορούν να χρησιμεύσουν ως διαλύτες για την εκχύλιση πολλών τύπων φυσικών ενώσεων, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε NaDES[39].

Δεδομένου ότι τα NaDES αποτελούνται γενικά από φυσικά απαντώμενες ουσίες, μπορούν να ενσωματωθούν απευθείας στα τελικά προϊόντα χωρίς πρόσθετα χρονοβόρα και δαπανηρά στάδια καθαρισμού προκειμένου να ανακτηθούν οι βιοδραστικές ενώσεις από το διαλύτη, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν διεξαχθεί οι απαραίτητες δοκιμές τοξικότητας και βιοσυμβατότητας[42]. Σημειώνεται πως οι τρέχουσες τάσεις προτείνουν την παραγωγή συστατικών με βάση τη λειτουργικότητα και όχι την καθαρότητα. Επομένως, τα εκχυλίσματα που παράγονται με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαν να προορίζονται για ειδικές εφαρμογές παρά για γενική χρήση[55].

1.4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με χρήση NaDES

Το πρώτο βήμα όλων των διαδικασιών εκχύλισης φυτών είναι η μεταφορά μάζας στερεού-υγρού, δηλαδή η μεταφορά φυτοχημικών που περιέχονται στη στερεή φυτική πρώτη ύλη στο διαλύτη εκχύλισης. Όσο υψηλότερη είναι η συγγένεια των φυτοχημικών με το διαλύτη, τόσο καλύτερη αναμένεται να είναι η μεταφορά. Ωστόσο, η πολικότητα και η χημική συγγένεια δεν είναι οι μόνες απαιτήσεις για αποτελεσματική εκχύλιση φυτών, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο και η επεξεργασία του στερεού πριν από την εκχύλιση (ξήρανση, άλεση, κοσκίνισμα κ.λπ.), η κινητική, η θερμοκρασία και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύτη[56]. Τα διαφορετικά συστατικά του NaDES προκαλούν διαφορές στην πολικότητα, το ιξώδες και την ικανότητα διάλυσης, έχοντας επακόλουθα στην απόδοση εκχύλισης. Σε έρευνα αναφέρεται πως η υψηλή διαλυτότητα σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις του NaDES με τα φυτοχημικά, όπως οι αλληλεπιδράσεις διπόλου διπόλου και δεσμών υδρογόνου[44].

Οι μεταβολίτες των φυτών μπορεί να διαφέρουν ως προς την πολικότητα, τη σταθερότητα, τα σημεία βρασμού και τις ποσότητές τους. Το ευρύ φάσμα πολικότητας και φυσικών ιδιοτήτων των φυσικών ενώσεων καθιστά ουσιαστικά αδύνατη μια διαδικασία εκχύλισης ενός σταδίου και με ένα μόνο διαλύτη για όλους τους μεταβολίτες από το φυτικό υλικό[57].

1.4.3.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση αναμένεται να επηρεάσει το χρόνο της εκχύλισης, την αποτελεσματικότητα και την απόδοσή της. Γενικά, οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν τη μοριακή κινητικότητα και επιτρέπουν στα

εκχυλιζόμενα μόρια να διαχέονται στο διαλύτη πιο γρήγορα, γεγονός που ισχύει και στη χρήση DES. Επιπλέον, οι εκχυλίσεις με DES βασίζονται στη θερμοκρασία για να μειώσουν το ιξώδες του DES, που όπως προαναφέρθηκε είναι σημαντικά υψηλό και καθιστά τις εκχυλίσεις δυσκίνητες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το επιθυμητό εύρος θερμοκρασίας για τις εκχυλίσεις είναι από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) έως περίπου 60°C. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες, εκτός από την απαίτηση ενέργειας για διατήρηση (αφαίρεση από τον πράσινο χαρακτήρα των εκχυλίσεων), μπορεί επίσης να θέσουν σε κίνδυνο είτε το DES είτε την ουσία-στόχο, καθώς πολλές από τις φυσικές ουσίες είναι θερμικά ευαίσθητες. Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες αποδείχθηκαν επίσης ότι μειώνουν την απόδοση σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της μείωσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ένωσης-στόχου και του διαλύτη επιλογής, ανεξάρτητα από τη θερμική αντοχή εκάστου[24].

Σε έρευνα όπου μελετήθηκε η θερμοκρασία, παρατηρήθηκε πως οι πολυφαινόλες του *R.canina* εκχυλίζονται αποτελεσματικά σε θερμοκρασία 70 °C, ενώ με την περαιτέρω αύξηση στους 100 °C δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην απόδοση. Παρόλα αυτά, με την εκχύλιση με βραστό νερό, παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας του εκχυλίσματος σε αντιοξειδωτικές ενώσεις, ενώ σε αυτή τη θερμοκρασία εκχυλίζονται περισσότερα φλαβονοειδή αλλά και β-καροτίνη[7].

Η συγκρίσιμη απόδοση πολυφαινολών στους 70° C και 100° C μπορεί να αποτελεί ένδειξη για ενδεχόμενη θερμική καταστροφή σε υψηλότερη θερμοκρασία, και έτσι εξετάζονται τα αποτελέσματα για περαιτέρω βρασμό ακόμα μίας ώρας. Έτσι, επιβεβαιώνεται η θερμική αποικοδόμηση των πολυφαινολών, η οποία μειώνει την ποσότητά τους κατά περίπου 10%, ενώ η ποσότητα των φλαβονοειδών παραμένει σε σταθερή τιμή. Έτσι, ο παρατεταμένος βρασμός δεν είναι ευνοϊκός για την ποιότητα του εκχυλίσματος[7].

1.4.3.2 Μοριακή Δομή και Σύνθεση του DES

Η μοριακή δομή του DES αναφέρεται στα συστατικά που χρησιμοποιούνται στη σύνθεσή του. Είτε σε ένα δυαδικό είτε σε ένα τριμερές σύστημα, τα μόρια που περιέχονται στο DES είναι υπεύθυνα για τις μοναδικές του ιδιότητες. Στις εκχυλίσεις, αναφέρεται ότι η πολικότητα του DES είναι ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη διαλυτότητα. Η πολικότητα του χρησιμοποιούμενου DES πρέπει να είναι κοντά στην πολικότητα της ένωσης-στόχου, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ικανότητα εκχύλισης. Επομένως, κατά την επιλογή του κατάλληλου DES για εκχύλιση, η ομοιότητα πολικότητας αποτελεί προτεραιότητα όσον αφορά στην απόδοση[24].

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι το NaDES μπορεί να εκχυλίσει τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες φυτοθεραπευτικές ενώσεις, ανάλογα με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται. Είναι ενδιαφέρον ότι τα υδρόφιλα NaDES μπορούν να διαλύσουν μερικές λιπόφιλες ενώσεις, σε αντίθεση με τους συμβατικούς διαλύτες, όπως το νερό[44].

1.4.3.3 Ιξώδες

Το συνήθως υψηλό ιξώδες των DES είναι το κύριο μειονέκτημα που μπορεί να περιορίσει τη χρήση τους ως διαλυτών εκχύλισης, καθώς εμποδίζει τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα εκχύλισης. Το υψηλό ιξώδες του NaDES μπορεί να μειώσει τους

συντελεστές διάχυσης, οδηγώντας σε χαμηλή μεταφορά μάζας και μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Αυτή η κατάσταση μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα της ένωσης-στόχου στο NaDES και να έχει αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Ωστόσο, αυτά τα προβλήματα μπορούν να λυθούν με δύο τρόπους, δηλαδή προσθέτοντας νερό στο NaDES ή αυξάνοντας τη θερμοκρασία, όπως έχει αναφερθεί[24,44,47,56].

Η αύξηση της θερμοκρασίας της διαδικασίας εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ιξώδους, ωστόσο, αυτή η επιλογή δεν είναι πάντα η ιδανική, καθώς είναι ενεργοβόρα και ορισμένα ευαίσθητα στη θερμότητα φυτοχημικά μπορεί να μην ανέχονται την αυξημένη θερμοκρασία[24]. Πράγματι, κατά τη θέρμανση, οι δεσμοί υδρογόνου σπάνε ή εξασθενούν. Η μελέτη του ιξώδους ως συνάρτησης της θερμοκρασίας είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της ιδανικής θερμοκρασίας στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των φυτών[56]. Έτσι, η μείωση του ιξώδους μπορεί να ενισχύσει την εκχύλιση και τη διείσδυση ενώσεων-στόχων στο σύστημα διαλυτών, η οποία περιορίζεται σε εξαιρετικά υψηλά ιξώδη DES[47].

Ένας απλός τρόπος για να ξεπεραστεί το πρόβλημα του υψηλού ιξώδους είναι η προσθήκη ενός συνδιαλύτη στο μέσο εκχύλισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός ο συνδιαλύτης είναι το νερό, το οποίο διατηρεί τον πράσινο χαρακτήρα της διαδικασίας. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης οργανικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη. Με αυτόν τον τρόπο, το ιξώδες μειώνεται και η εκχύλιση διευκολύνεται[24].

Ωστόσο, η παρουσία νερού όχι μόνο επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη αλλά μπορεί επίσης να θέσει σε κίνδυνο την ακεραιότητα του συστήματος. Αν το νερό ξεπεράσει το 50% κατ' όγκο, θα μπορούσε να συμβεί μια πλήρης κατάρρευση του δικτύου δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας σε ολική καταστροφή του NaDES. Κάτω από αυτή την αναλογία, το νερό είναι αναπόσπαστο μέρος του NaDES, το οποίο λειτουργεί ως η τρίτη ένωση και ελέγχει το σύστημα[24,48].

Μια άλλη προσέγγιση για να ξεπεραστεί το πρόβλημα του υψηλού ιξώδους είναι η αξιοποίηση του τεράστιου αριθμού πιθανών συνδυασμών φυσικών ενώσεων που μπορούν να παράγουν NaDES, προκειμένου να σχεδιαστούν διαλύτες χαμηλού ιξώδους[24].

1.4.3.4 Περιεκτικότητα σε νερό

Το νερό μπορεί να βρεθεί σε ένα σύστημα DES ακούσια (κατά τη διάρκεια της σύνθεσης ή από την παραμονή σε ένα δοχείο) ή σκόπιμα μέσω συνδιάλυσης για τη δημιουργία ενός υδατικού συστήματος. Ενώ ορισμένα NaDES θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ως μέσα εκχύλισης από μόνα τους, το αυξημένο ιξώδες τους θα παρεμπόδιζε την ταχύτητα των εκχυλίσεων. Επιπλέον, η χρήση καθαρού DES ως μέσου εκχύλισης θα μπορούσε να αυξήσει το κόστος των εκχυλίσεων, καθιστώντας τη διαδικασία μη αποδοτική ως προς το κόστος σε εργαστηριακή ή βιομηχανική κλίμακα[24].

Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, υδατικά διαλύματα των NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά, που κυμαίνονται από 20% μέχρι 80%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ιδιαίτερα σε μελέτες στις οποίες η περιεκτικότητα σε νερό ήταν μέρος

της βελτιστοποίησης, ποσοστά κοντά στο 20% της περιεκτικότητας σε νερό επιτυγχάνουν μια ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας ενός συστήματος εκχύλισης ρευστού και της διατήρησης του πλέγματος δεσμών υδρογόνου του DES. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό τείνει να σπάσει τη δομή των δεσμών υδρογόνου του DES, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά του. Αυτό, ωστόσο, δε σημαίνει ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό θα ήταν αναποτελεσματική ή ανεπιθύμητη, καθώς κάθε εκχύλιση, με μεγάλο αριθμό μεταβλητών, θα μπορούσε να εκμεταλλευτεί υψηλότερα ή χαμηλότερα ποσοστά νερού[24].

Σε έρευνα μελετώνται διάφορες συγκεντρώσεις νερού, 10, 30 και 75% w/w στο NaDES χλωριούχος ακετυλοχολίνη:γαλακτικό οξύ για την εκχύλιση φλαβονοειδών σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Παρατηρήθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα για συγκέντρωση νερού 30%, ενώ πέρα του σημείου αυτού παρατηρήθηκε μείωση, επηρεάζοντας αρνητικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NaDES και των ενώσεων-στόχων. Με την αύξηση στη συγκέντρωση νερού παρατηρήθηκε αύξηση της πολικότητας του μέσου εκχύλισης, η οποία έδωσε καλύτερες αποδόσεις για πολικές ενώσεις[57].

Σε άλλη μελέτη διερευνήθηκε η αξιοποίηση απορριμμάτων πορτοκαλιού με χρήση διαφόρων NaDES, που περιέχουν χλωριούχο χολίνη και άλλα σάκχαρα ή πολυαλκοόλες, με περιεκτικότητες σε νερό 30, 50 και 80% w/w. Σημειώνεται πως σε περιεκτικότητα σε νερό πάνω από 50 %, το σύστημα θεωρείται υδατικό διάλυμα και όχι ευτηκτικό μείγμα. Παρόλα αυτά, διεξήχθησαν τα πειράματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, λόγω του ότι αποδείχθηκε πως το κατιόν της χολίνης θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τις αλυσίδες πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω δεσμών υδρογόνου ή μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οδηγώντας σε διάσπαση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η ιδιότητα κυτταρικής αποσύνθεσης του NaDES έχει αποδειχθεί μεγάλης σημασίας τόσο για τους βιομετασχηματισμούς που προκαλούνται από φυτά, όσο και για την εκχύλιση διαφόρων συστατικών από φυτικά κύτταρα και ιστούς[58].

1.4.3.5 Χρόνος εκχύλισης

Οι χρόνοι εκχύλισης παρουσιάζουν μικρή απόκλιση μεταξύ των εκχυλίσεων. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης αυξάνουν το κόστος, ενώ οι συντομότερες εκχυλίσεις διατρέχουν τον κίνδυνο να αφήσουν σημαντικές ποσότητες ουσιών-στόχων στο δείγμα, καθιστώντας τη διαδικασία αναποτελεσματική[24].

1.4.3.6 Το DES ως πρόσθετο ή πρόσθετο στο DES

Με στόχο την απομόνωση πολλαπλών ενώσεων και την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας μιας μεμονωμένης εκχύλισης, συχνά χρησιμοποιούνται πρόσθετα που συνυπάρχουν με το DES κατά την εκχύλιση, τα οποία μπορεί να είναι άλλα συστατικά του DES που σχηματίζουν τριμερή συστήματα. Παρόλα αυτά, δεν είναι σίγουρο πως ένα προσεκτικά σχεδιασμένο και συντιθέμενο τριμερές σύστημα DES, θα είναι πιο αποτελεσματικό από ένα απλούστερο δυαδικό, γεγονός το οποίο εξαρτάται από τις ενώσεις-στόχους. Επιπλέον, μπορούν να προστεθούν άλλου είδους πρόσθετα για να υποβοηθήσουν την εκχύλιση μιας ουσίας, αλλά όπως με τα τριμερή συστήματα, οποιαδήποτε προσθήκη μπορεί να προάγει ή να εμποδίσει την εκχύλιση, ανάλογα με το στόχο[24].

1.4.3.7 Αναλογία διαλύτη/δείγματος

Η αναλογία δείγματος (στερεού ή άλλου) προς διαλύτη που χρησιμοποιείται μπορεί επίσης να επηρεάσει την εκχύλιση. Η βύθιση μιας μικρής ποσότητας δείγματος στο διαλύτη σημαίνει ότι η εκχύλιση θα μπορούσε να είναι αναποτελεσματική σε μεγαλύτερη κλίμακα, καθώς μόνο μια μικρή ποσότητα δείγματος υφίσταται επεξεργασία σε μια δεδομένη στιγμή. Από την άλλη πλευρά, η κατάπνιξη του διαλύτη με άφθονη ποσότητα στερεού δείγματος μπορεί να σημαίνει ότι η διασπορά του διαλύτη γύρω από το δείγμα θα ήταν πιο αργή, η επιφάνεια επαφής του δείγματος με το διαλύτη θα μπορούσε τελικά να μειωθεί και το σύστημα θα κατέληγε να υπολειπεται[24].

Μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη μπορεί να βοηθήσουν στη βελτίωση του ρυθμού μεταφοράς μάζας, επομένως η απόδοση του εκχυλίσματος μπορεί να αυξηθεί μέχρι ένα ορισμένο σημείο[54].

1.4.3.8 Τιμή pH

Το επίπεδο pH του συστήματος μπορεί να υπαγορεύει τη μορφή της ένωσης-στόχου σε ορισμένες περιπτώσεις, επηρεάζοντας τελικά τη διαλυτότητά της στο DES[22,24]. Ορισμένα συστατικά του DES μπορεί επίσης να επηρεαστούν από το ίδιο το pH, αλλάζοντας την πολικότητα ή τη γενική τους συμπεριφορά, με ευεργετικά ή ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η μορφή της ένωσης-στόχου μπορεί να αλλάξει το σχεδιασμό της εκχύλισης, εφόσον ως αποτέλεσμα του pH, η ουσία με εντελώς διαφορετική πολικότητα θα εκχυλιστεί με διαφορετικό DES από αυτό που αρχικά επιλέχθηκε[24].

Το pH των NaDES ποικίλλει ανάλογα με τα συστατικά του διαλύτη. Γενικά, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες με βάση οξέα (ADES), διαλύτες χαμηλού pH, παρουσιάζουν εξαιρετική ιδιότητα διαλυτοποίησης, λόγω της ικανότητας να δίνουν πρωτόνια και να δέχονται ηλεκτρόνια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάκτηση ενώσεων χαμηλής πολικότητας, όπως η κατεχίνη, καθώς και πολικών ενώσεων, όπως η ανθοκυανίνη. Από την άλλη, τα NaDES που αποτελούνται από πολυαλκοόλες (όπως η 1,2-προπυλενογλυκόλη), με ουδέτερο pH, παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα εκχύλισης φαινολικού οξέος. Τα NaDES που αποτελούνται από συστατικά σακχάρων, επίσης με ουδέτερο pH, παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα προς την ανάκτηση φλαβονοειδών[36].

1.4.3.9 Ξήρανση, βαθμός άλεσης πρώτης ύλης

Πριν από την εκχύλιση, συνήθως διεξάγονται προεπεξεργασίες όπως η ξήρανση και η άλεση φυτικών υλικών για να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης[1].

Φρέσκα και αποξηραμένα δείγματα χρησιμοποιούνται και αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την παρασκευή ιατρικών φαρμάκων. Ιδανικά, φρέσκοι φυτικοί ιστοί θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για φυτοχημική ανάλυση και το υλικό θα πρέπει να βυθίζεται σε βραστό οινόπνευμα μέσα σε λίγα λεπτά από τη συλλογή του. Εναλλακτικά, τα φυτά μπορούν να αποξηρανθούν πριν από την εκχύλιση. Γενικά, στη

βιβλιογραφία αναφέρεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις προτιμώνται τα αποξηραμένα υλικά, λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο χρόνο διατήρησής τους σε σύγκριση με τα φρέσκα δείγματα. Επιπλέον, τα φρέσκα δείγματα είναι εύθραυστα και τείνουν να αλλοιώνονται πιο γρήγορα από τα αποξηραμένα[1].

Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει την επιφάνεια επαφής μεταξύ των δειγμάτων και των διαλυτών εκχύλισης και ως εκ τούτου, αυξάνει το ρυθμό εκχύλισης και την απόδοση. Είναι σημαντικό τα σωματίδια να έχουν όσο το δυνατόν ομοιόμορφο μέγεθος, επειδή στα μεγαλύτερα σωματίδια χρειάζεται περισσότερος χρόνος για την ολοκλήρωση της διαδικασίας εκχύλισης. Μέγεθος σωματιδίων μικρότερο από 0,5 mm είναι ιδανικό για αποτελεσματική εκχύλιση. Συνήθως χρησιμοποιούνται συμβατικές μέθοδοι για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των αποξηραμένων δειγμάτων φυτών, όπως γουδί και γουδοχέρι ή ηλεκτρικά μπλέντερ και μύλοι[1].

1.5 Εκχύλιση για εφαρμογή σε καλλυντικά

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1223/2009, ένα «καλλυντικό προϊόν» ορίζεται ως «κάθε ουσία ή μείγμα που προορίζεται να έλθει σε επαφή με τα εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, σύστημα μαλλιών, νύχια, χείλη και εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας έχοντας ως στόχο τον καθαρισμό, τον αρωματισμό, την προστασία, τη διατήρηση σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση σωματικών οσμών.» (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1223/2009, ν). Η Ευρωπαϊκή Ένωση Προσωπικής Φροντίδας, συγκεκριμένα η Cosmetics Europe, περιγράφει επτά κύριες κατηγορίες καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής περιποίησης: στοματική περιποίηση, περιποίηση δέρματος, αντηλιακή περιποίηση, περιποίηση μαλλιών, διακοσμητικά καλλυντικά, περιποίηση σώματος και αρώματα[56].

1.5.1 Εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες για εφαρμογή σε

καλλυντικά

Για την εκχύλιση πολικών ή ημιπολικών ενώσεων, διαλύτες όπως το νερό, οι γλυκόλες και η αιθανόλη (ή σε μείγματα με νερό) είναι απολύτως κατάλληλοι, αλλά ορισμένα μειονεκτήματα παραμένουν. Λόγω της πτητικότητας και της ευφλεκτότητας, η μεταφορά και ο χειρισμός της αιθανόλης απαιτεί συγκεκριμένα μέτρα ασφαλείας και επισήμανση. Τονίζεται όμως ότι λόγω της ξηραντικής της φύσης, μπορεί να διαταράξει το υδρολιπιδικό φιλμ του δέρματος και να προκαλέσει αισθήματα δυσφορίας σε άτομα με ευαίσθητο δέρμα. Μπορεί να αφαιρεθεί με απόσταξη, αλλά από την άποψη της εξοικονόμησης ενέργειας, αυτό το κατόντη βήμα δεν είναι ιδανικό[56].

Επιπλέον, γλυκόλες, όπως η βουτυλενογλυκόλη, προπυλενογλυκόλη (1,2-προπανοδιόλη) και προπανοδιόλη (1, 3-προπανοδιόλη), μπορούν να δημιουργήσουν ενδιαφέροντες διαλύτες εκχύλισης όταν χρησιμοποιούνται μόνες ή σε συνδυασμό με νερό. Ωστόσο, οι καταναλωτές τείνουν να συνδέουν τις γλυκόλες με τα πετροχημικά και συχνά προσπαθούν να αποφύγουν τα καλλυντικά σκευάσματα που τις περιέχουν[56].

1.5.2 Εκχύλιση με NaDES για εφαρμογή σε καλλυντικά

Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλία των συστατικών που μπορούν να εισέλθουν στην προετοιμασία των DES και NaDES, οι προοπτικές που προσφέρουν αυτά τα μείγματα για την ανάπτυξη νέων βιομηχανικών διεργασιών εκχύλισης είναι εντυπωσιακές. Για παράδειγμα όμως, ενώ η χλωριούχος χολίνη εμφανίζεται ως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ένωση για τη σύνθεση τέτοιων διαλυτών, αυτή και τα παράγωγά της απαγορεύονται στα καλλυντικά στην Ευρώπη (Ευρωπαϊκός κανονισμός για τα καλλυντικά ΕΚ αριθ. 1223/2009, παράρτημα II). Έτσι, κανένα μείγμα διαλυτών που περιέχει χλωριούχο χολίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης εκχύλισης για εκχυλίσματα καλλυντικών φυτών. Σε αυτό το πλαίσιο, υπάρχει ανάγκη σχεδιασμού νέων μιγμάτων NaDES, συμβατών με καλλυντικές εφαρμογές, καθώς και αξιολόγησης της απόδοσης εκχύλισης φυτών σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες[56].

Για τη χρήση συστατικών NaDES για καλλυντική χρήση, θα πρέπει[56]:

- I. να επιτρέπονται για καλλυντική χρήση και, επομένως, δε θα πρέπει να εμφανίζονται στο Παράρτημα II του Ευρωπαϊκού Κανονισμού Καλλυντικών ΕΚ αριθ. 1223/2009,
- II. οι ουσίες θα πρέπει να έχουν βιολογική βάση και να είναι διαθέσιμες σε λογικό κόστος σε βιομηχανική κλίμακα,
- III. οι διαλύτες θα πρέπει να επιδεικνύουν χαρακτηριστικά των μιγμάτων NaDES (υπερμοριακή δομή),
- IV. τα μείγματα πρέπει να έχουν χαμηλό ή ρυθμιζόμενο ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτρέπεται ομοιογενής διασπορά του φυτικού υλικού και εύκολος διαχωρισμός στερεού/υγρού,
- V. τα μείγματα θα πρέπει να επιδεικνύουν μακροπρόθεσμη σταθερότητα, συμπεριλαμβανομένης της μικροβιακής σταθερότητας, μόνα τους ή σε συνδυασμό με συστήματα πράσινων συντηρητικών και
- VI. οι διαλύτες θα πρέπει να είναι συμβατοί με κλασικές συνθέσεις καλλυντικών όπως λοσιόν, κρέμες ή τζελ.

Αν και τα οργανικά οξέα αναφέρονται ως κατάλληλα για την παρασκευή NaDES, δεν επιλέγονται αυτές οι ενώσεις, λόγω της όξινης φύσης τους, που μπορεί να δημιουργήσει αστάθεια στα καλλυντικά σκευάσματα[56].

Η μικροβιολογική ασφάλεια είναι απαραίτητη για τα συστατικά καλλυντικών. Το νερό και τα θρεπτικά συστατικά, όπως τα σάκχαρα, ευνοούν την ανάπτυξη βακτηρίων. Διάφορα τεστ πραγματοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μικροβιακής διατήρησης. Οι συντηρητικές ιδιότητες του σκευάσματος είναι επαρκείς εάν, στις συνθήκες της δοκιμής, υπάρχει σημαντική πτώση ή καθόλου αύξηση στον αριθμό των μικροοργανισμών στο εμβολιασμένο παρασκεύασμα, μετά από 2, 7, 14 και 28 ημέρες. Τα κριτήρια αποδοχής, όσον αφορά στη μείωση του αριθμού των μικροοργανισμών με την πάροδο του χρόνου ποικίλλουν για διαφορετικούς τύπους παρασκευασμάτων, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο βαθμό προστασίας[56].

1.5.3 Συστατικά των υπό μελέτη NaDES

1.5.3.1 Βεταΐνη

Η βεταΐνη (τριμεθυλογλυκίνη), είναι ένα αμινοξύ κοινό στη φύση και έχει αναγνωριστεί ως GRAS [42,56,59]. Είναι μια ουδέτερη αμφοτερική ένωση, με μικρά πολικά μόρια διαθέσιμα για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου, τα οποία αλληλεπιδρούν με το νερό και άλλα παρόμοια μόρια, δίνοντας στα διαλύματά της ιδιαίτερες φυσικοχημικές και αισθητικές ιδιότητες (όπως η μεταξωτή υφή). Είναι ένα φυσικό υποπροϊόν της επεξεργασίας ζαχαρότευτλων που εξάγονται από μελάσα, με τη βοήθεια χρωματογραφίας για το διαχωρισμό. Εκτός από τα ζαχαρότευτλα, η βεταΐνη βρίσκεται σε υψηλή περιεκτικότητα και σε άλλα τρόφιμα όπως πίτουρο σιταριού, φύτρο σιταριού, σπανάκι, παντζάρια, ακόμα και σε οστρακόδερμα[59,60]. Λόγω της μη-τοξικότητας, της υψηλής διαλυτότητάς της στο νερό καθώς και της χημικής της σταθερότητας, θεωρείται ένα ενδιαφέρον συστατικό για θεραπευτικές αγωγές στο δέρμα, ενώ μπορεί να εγκριθεί από το πρότυπο Cosmos για φυσικά καλλυντικά, όταν κατασκευάζεται από ζαχαρότευτλα[56,59]. Χρησιμοποιείται ήδη σε συμπληρώματα διατροφής και καλλυντικά και διατίθεται σε μεγάλες ποσότητες σε πολύ προσιτή τιμή[56].

Σημειώνεται πως όταν ένα μόριο νερού προσελκύεται από ένα μόριο βεταΐνης, αντικαθίσταται πολύ γρήγορα από ένα άλλο μόριο νερού. Αυτό σημαίνει πως ο χρόνος παραμονής είναι μικρότερος στη βεταΐνη, από εκείνον σε άλλο μόριο νερού. Επομένως, η βεταΐνη δρα ως φορέας νερού, που το απελευθερώνει εύκολα στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, όταν αυτό είναι αναγκαίο. Επιπλέον, η βεταΐνη δεν ακινητοποιεί τα μόρια του νερού, αφήνοντάς τα να είναι διαθέσιμα για τα ζωντανά κύτταρα. Αυτό αξιολογείται στη χρήση της βεταΐνης σε προϊόντα στοματικής φροντίδας, προάγοντας την ισορροπία του νερού στα βλεννώδη κύτταρα[59].

Η βεταΐνη έχει αντιερεθιστικές ιδιότητες, ενώ η προσθήκη της σε προϊόντα μαλλιών δίνει μεταξένια αίσθηση και ένα τελικό μαλακτικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, σε προϊόντα για το δέρμα, το υδατικό διάλυμα βεταΐνης βοηθά στην αύξηση της ενυδάτωσης, καθώς και τη μείωση του βάθους των ρυτίδων. Οι κρέμες που περιέχουν βεταΐνη προσδίδουν μια αίσθηση μαλακού δέρματος, ακόμα και όταν βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις[59]. Χρησιμοποιείται συχνά ως εναλλακτικό τεταρτοταγές αμμώνιο αντί της χλωριούχου χολίνης, η οποία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως απαγορεύεται στα καλλυντικά προϊόντα στην Ευρώπη[56].

1.5.3.2 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη (αναφέρεται και ως γλυκερίνη) είναι ένα κοινό συστατικό τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών, χωρίς τοξικότητα και είναι περιβαλλοντικά καλοήθης[55,61]. Διαθέτει τρεις ομάδες υδροξυλίου, που την καθιστούν υδατοδιαλυτή και της προσδίδουν υγροσκοπικότητα. Τα μόρια γλυκερόλης μπορεί να συνδέονται μεταξύ τους με ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου, δίνοντάς της ασυνήθιστα υψηλό σημείο βρασμού και ιξώδες. Η γλυκερόλη είναι ένα

από τα κύρια συστατικά των τριακυλογλυκερολών (τριγλυκερίδια), που απαντώνται στους ζωντανούς ιστούς. Οι κύριες πηγές της είναι δραστηριότητες που σχετίζονται με το μετασχηματισμό ζωικών λιπών και φυτικών ελαίων, ενώ θεωρείται ανανεώσιμη πρώτη ύλη. Ήδη η γλυκερόλη ή διαλύτες με βάση αυτή, έχουν δοκιμαστεί ως πράσινοι πολλά υποσχόμενοι διαλύτες, με στόχο την αντικατάσταση ορισμένων διαλυτών με βάση το πετρέλαιο. Έτσι, βρίσκουν εφαρμογές στη συνθετική οργανική χημεία, την κατάλυση και τη βιοκατάλυση[55].

Η γλυκερόλη θεωρείται GRAS από τον FDA (Food and Drug Administration) για τη συσκευασία τροφίμων και ως συστατικό τροφίμων. Χρησιμοποιείται επίσης ως δραστικό συστατικό σε συγκεκριμένα φάρμακα που δε συνταγογραφούνται, όπως οφθαλμικά και δερματικά προϊόντα και εξωτερικά αναλγητικά, ενώ στα τρόφιμα προστίθεται συνήθως ως υγραντικό και γλυκαντικό[55,61].

Στα καλλυντικά, η γλυκερόλη είναι ένα πολύ κοινό συστατικό (τρίτο μετά το νερό και το άρωμα), που λειτουργεί ως μετουσιωτικό, αρωματικό συστατικό, παράγοντας περιποίησης μαλλιών, υγραντικό, παράγοντας στοματικής φροντίδας, προστατευτικό και παράγοντας περιποίησης δέρματος. Αξιοποιείται σε προϊόντα όπως κραγιόν, μακιγιάζ ματιών, ενυδατικές κρέμες, βαφές μαλλιών, σαπούνια, αντηλιακά και βρεφικά προϊόντα[55,61].

Μετά από ελέγχους *in vivo* αναφέρθηκε πως η γλυκερόλη σε ποσοστό 50% σε νερό δεν ήταν ερεθιστική για ασθενείς με δερματίτιδα, ενώ σε ποσοστό 25% δεν ήταν ερεθιστική όταν χορηγήθηκε σε ασθενείς σε έμπλαστρο[61].

Ένα ζήτημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι το υψηλό ιξώδες της γλυκερόλης και των DES με βάση αυτή, το οποίο θα μπορούσε να καταστήσει προβληματικό το χειρισμό των εκχυλισμάτων σε βιομηχανική κλίμακα. Η χρήση μιγμάτων νερού και πιθανώς η ανάμιξη με άλλους φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες (π.χ. αιθανόλη), θα μπορούσαν να είναι κάποιες πιθανές λύσεις. Μια τέτοια προσέγγιση θα επέτρεπε την κατάλληλη ρύθμιση του ιξώδους του διαλύτη, ενώ θα μπορούσε επίσης να ρυθμίσει την εκλεκτικότητα εκχύλισης, και επομένως την καθαρότητα του προϊόντος, χωρίς να μειώνεται η απόδοση εκχύλισης[55].

Ένα άλλο μειονέκτημα που συνδέεται με τη γλυκερόλη είναι η χαμηλή τάση ατμών της, η οποία δεν επιτρέπει την απομάκρυνση του διαλύτη μέσω εξάτμισης, όπως στις περιπτώσεις πτητικών διαλυτών. Εάν χρησιμοποιηθεί πρώτα η γλυκερόλη ως διαλύτης εκχύλισης και δεύτερον, ως μέρος της σύνθεσης του τελικού προϊόντος, τότε η ανάκτηση διαλυμένης ουσίας θα μπορούσε να παρακαμφθεί πολύ αποτελεσματικά, προσφέροντας μια απλή αξιοποίηση του εκχυλίσματος. Με αυτόν τον τρόπο, εκχυλίσματα εμπλουτισμένα με ενεργά συστατικά θα μπορούσαν να ενσωματωθούν απευθείας σε τρόφιμα/φαρμακευτικά προϊόντα/καλλυντικά, παρέχοντας την κατάλληλη σύνθεση και συγκέντρωση[55].

1.5.3.3 Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ (2-υδροξυπροπανοϊκό οξύ) θεωρείται ένα από τα κύρια οργανικά οξέα με ευρύ φάσμα βιομηχανικών εφαρμογών, κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων, χημικών, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων[42,62].

Η ευρεία εφαρμογή του γαλακτικού οξέος στις βιομηχανίες τροφίμων βασίζεται στην ασφάλειά του, καθώς ταξινομείται ως GRAS σύμφωνα με τον FDA στις ΗΠΑ. Αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση των γεύσεων και στην αύξηση της διάρκειας ζωής, μέσω του ελέγχου της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα[62].

Όσον αφορά στην αξιοποίηση του γαλακτικού οξέος για καλλυντικές εφαρμογές, αναφέρεται πως δρα ως καλός ρυθμιστής pH, βοηθά στην ενυδάτωση και λεύκανση του δέρματος, ενώ έχει αντιμικροβιακή και αντιγηραντική δράση. Μελέτες διαπίστωσαν ότι το γαλακτικό οξύ διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη λάμψη του δέρματος και στην αναγενωμική διάταξη της χρωστικής μελανίνης, που σχετίζεται με τη θεραπεία των καφέ κηλίδων, βοηθώντας στην άμεση αναστολή του σχηματισμού μελανίνης, την ανακούφιση ή την αφαίρεση των δυσχρωμιών του δέρματος[62].

Το γαλακτικό οξύ αξιοποιείται όχι μόνο στο πρόσωπο αλλά και στο σώμα. Μπορεί να προάγει την παραγωγή κολλαγόνου, το οποίο βοηθά στη σύσφιξη του δέρματος, όντας ικανό να μειώσει τις ραγάδες και τις ουλές του σώματος, να απαλύνει το ξηρό δέρμα και τους κάλους. Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης σε συνδυασμό με σαλικυλικό οξύ σε σκευάσματα κατά της ακμής[62].

Το γαλακτικό οξύ είναι αρκετά ήπιο για όλους τους τύπους δέρματος, συμπεριλαμβανομένου του ευαίσθητου δέρματος, της ακμής και της ροδόχρου ακμής. Σημειώνεται ότι, όπως με κάθε προϊόν περιποίησης δέρματος, υπάρχει πάντα πιθανότητα αλλεργικής αντίδρασης. Παρόλο που είναι πιο ήπιο από ορισμένες άλλες ενώσεις, μπορεί να είναι ερεθιστικό, ιδιαίτερα σε κατεστραμμένο ή επιρρεπές σε αλλεργίες δέρμα. Επιπλέον, σε προϊόντα που αξιοποιείται το γαλακτικό οξύ, παρατηρείται ευαισθησία κατά την έκθεση στον ήλιο, οπότε είναι απαραίτητος ο περιορισμός του χρόνου έκθεσης σε αυτόν και η χρήση αντηλιακού[62].

1.6 Πειραματικός Σχεδιασμός

1.6.1 Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης

Υπάρχουν πολλές στατιστικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση της επίδρασης των παραγόντων σε μια δεδομένη διεργασία. Η απόκριση ενδιαφέροντος επηρεάζεται από πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές και στόχος είναι η βελτιστοποίησή της[63,64]. Κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης πολλαπλών μεταβλητών, υπάρχουν δύο τύποι μεταβλητών: οι αποκρίσεις και οι παράγοντες. Οι αποκρίσεις είναι οι εξαρτημένες μεταβλητές και οι τιμές τους εξαρτώνται από τα επίπεδα των παραγόντων[65]. Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response surface methodology - RSM) είναι η συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που είναι χρήσιμες για την ανάλυση των επιδράσεων πολλών ανεξάρτητων μεταβλητών σε μια απόκριση[63,64]. Αυτή η μεθοδολογία είναι πρακτικά κατάλληλη για τη σύγκριση θεωρητικών μοντέλων με πειραματική μεθοδολογία, η οποία περιλαμβάνει τις διαδραστικές επιδράσεις των μεταβλητών καθώς και τις συνολικές επιδράσεις των παραμέτρων στη διαδικασία[63]. Χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης με ελάχιστα πειράματα[42].

Το RSM διερευνά μια κατάλληλη σχέση προσέγγισης μεταξύ των μεταβλητών εισόδου (ανεξάρτητων μεταβλητών) και εξόδου (αποκρίσεων) και προσδιορίζει τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας για ένα υπό μελέτη σύστημα ή μια περιοχή του πεδίου παραγόντων που ικανοποιεί τις λειτουργικές απαιτήσεις. Ο σχεδιασμός Box-Behnken (BBD) και ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) είναι δύο κύριοι πειραματικοί σχεδιασμοί που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Ο κεντρικός σύνθετος περιστρεφόμενος σχεδιασμός (CCRD) και ο σχεδιασμός του κεντρικού σύνθετου προσώπου (FCCD) έχουν επίσης εφαρμοστεί σε μελέτες βελτιστοποίησης τα τελευταία χρόνια[64].

Η διαδικασία της βελτιστοποίησης με σχεδιασμό RSM είναι η εξής: (i) Σχεδιασμός ενός αριθμού πειραμάτων για επαρκή και αξιόπιστη μέτρηση της απόκρισης, (ii) ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου δεύτερης τάξης της επιφάνειας απόκρισης με τις καλύτερες προσαρμογές και (iii) εύρεση του βέλτιστου συνόλου παραμέτρων προσομοίωσης που παράγουν μια μέγιστη ή ελάχιστη τιμή απόκρισης[63].

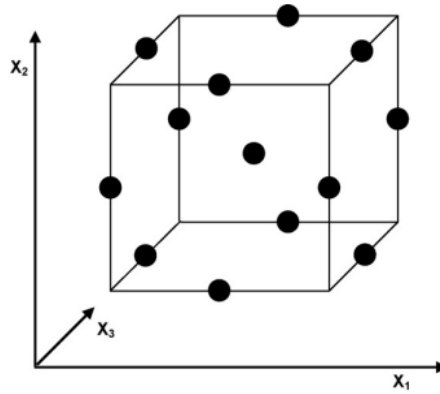
Ο σχεδιασμός των πειραμάτων (Design of experiments - DoE) είναι η πιο σημαντική πτυχή του RSM. Το DoE στοχεύει στην επιλογή των καταλληλότερων σημείων, όπου είναι αναγκαία η εξέταση της απόκρισης. Το μαθηματικό μοντέλο της διαδικασίας σχετίζεται κυρίως με το σχεδιασμό πειραμάτων. Έτσι, η επιλογή του σχεδιασμού του πειράματος έχει μεγάλη επίδραση στον προσδιορισμό της ορθότητας της κατασκευής της επιφάνειας απόκρισης. Στο αρχικό στάδιο του DoE, πραγματοποιούνται πειράματα διαλογής. Εάν υπάρχουν πολλές μεταβλητές που έχουν μικρή ή μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση, βρίσκονται οι μεταβλητές που έχουν μεγάλες επιδράσεις σε αυτή, με στόχο τον προσδιορισμό των μεταβλητών σχεδιασμού με τη μεγαλύτερη επίδραση για περαιτέρω διερεύνηση[64].

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει το RSM μπορούν να συνοψιστούν στον καθορισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών, τη μοντελοποίηση του συστήματος μαθηματικά και την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους μειώνοντας τον αριθμό των δοκιμών[64].

1.6.2 Σχεδιασμός Box Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken είναι ένας ανεξάρτητος τετραγωνικός σχεδιασμός, που δεν περιέχει ενσωματωμένο παραγοντικό ή κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό. Είναι ένας αποτελεσματικός σχεδιασμός τριών επιπέδων που επιτρέπει την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, που περιγράφουν τις συσχετίσεις μεταξύ των λαμβανόμενων αποκρίσεων και των πειραματικών συνθηκών και καταδεικνύει επίσης τη στατιστική σημασία των επιδράσεων των παραγόντων[42].

Για τρεις παράγοντες, η γραφική αναπαράστασή του είναι ένας κύβος που αποτελείται από το κεντρικό σημείο (το οποίο επαναλαμβάνεται) και τα μεσαία σημεία των ακμών του, όπως φαίνεται στην εικόνα.



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken για τρεις παράγοντες.

Για τρεις παράγοντες X_1 , X_2 και X_3 , που αντιπροσωπεύουν τρεις μεταβλητές, ορίζονται τρία επίπεδα, +1, 0, -1, ως υψηλές, ενδιάμεσες και χαμηλές τιμές αντίστοιχα. Αυτές οι τρεις μεταβλητές δοκιμής κωδικοποιήθηκαν σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X} \quad (2)$$

όπου x_i είναι η κωδικοποιημένη τιμή μιας ανεξάρτητης μεταβλητής,
το X_i είναι η πραγματική τιμή μιας ανεξάρτητης μεταβλητής,
το X_0 είναι η πραγματική τιμή μιας ανεξάρτητης μεταβλητής στο κεντρικό σημείο
και ΔX είναι η βηματική αλλαγή στην πραγματική τιμή της μεταβλητής, που αντιστοιχεί στη μεταβολή μιας μονάδας για την αδιάστατη τιμή της μεταβλητής[63,66].

Ο αριθμός των πειραμάτων (N) που απαιτούνται για την ανάπτυξη του BBD ορίζεται ως:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (3)$$

όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_0 είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων[65].

Για σύγκριση, ο αριθμός των πειραμάτων για ένα κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό είναι:

$$N = 2k + 2k + C_0 \quad (4) \quad [65].$$

Πλεονέκτημα του BBD είναι ότι δεν περιέχει συνδυασμούς για τους οποίους όλοι οι παράγοντες βρίσκονται ταυτόχρονα στο υψηλότερο ή στο χαμηλότερο επίπεδό τους. Έτσι, αυτοί οι σχεδιασμοί είναι χρήσιμοι για την αποφυγή πειραμάτων που εκτελούνται υπό ακραίες συνθήκες, για τα οποία ενδέχεται να προκύψουν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, δεν υποδεικνύονται για καταστάσεις στις οποίες είναι επιθυμητή η γνώση των αποκρίσεων στα άκρα, δηλαδή στις κορυφές του κύβου[65].

2 Πειραματικό μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από τον καρπό του *R.canina* με τη χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES) ως εκχυλιστικού και αποθηκευτικού μέσου για τις βιοδραστικές ενώσεις. Το άγριο τριαντάφυλλο επιλέχθηκε εφόσον δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία η εκχύλισή του με τη χρήση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

Για την επιλογή των συστατικών των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, στόχος ήταν να θεωρούνται GRAS (Generally Recognized as Safe), όπως η βεταΐνη, η γλυκερόλη και το D,L-γαλακτικό οξύ[42,61,62]. Έπειτα από μελέτη των NaDES ως διαλυτών εκχύλισης, βρέθηκε στα προκαταρκτικά πειράματα πως καλύτερος διαλύτης είναι το NaDES βεταΐνη:D,L-γαλακτικό οξύ. Παρόλα αυτά, λόγω της ευρείας χρήσης της γλυκερόλης στα καλλυντικά σκευάσματα, επιλέχθηκε τελικά για τη μελέτη βελτιστοποίησης της διεργασίας εκχύλισης το NaDES βεταΐνη:γλυκερόλη.

Η διεργασία εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken με πειραματικές παραμέτρους το χρόνο εκχύλισης, την αναλογία κατά μάζα του συνδιαλύτη (νερό) ανά NaDES και την αναλογία κατά μάζα πρώτης ύλης ανά διαλύτη και με αποκρίσεις το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων για δύο χρόνους επώασης.

2.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών της παρασκευής των NaDES, της επιλογής του κατάλληλου DES και των εκχυλίσεων του άγριου τριαντάφυλλου.

Πίνακας 1: Εργαστηριακά όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Όργανο/Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 g)	Sartorius	M2P
Αναδευτήρας Vortex	Lbx instruments	V05 series
Φασματοφωτόμετρο UV-vis	BioTek	EPOCH 2 microplate reader
Φυγόκεντρος	MSE	-
Ιξωδόμετρο	Brookfield	DV1 Viscometer
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Περιστροφικός εξατμιστήρας	Buchi	R-114
Φασματοφωτόμετρο FTIR	Jasco	4200

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Προμηθευτής
Απιονισμένο νερό	H ₂ O	-
Άνυδρη βεταΐνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Glentham
Γαλακτικό οξύ 80-85% v/v	C ₃ H ₆ O ₃	Labkem
Γλυκερόλη	C ₃ H ₈ O ₃	Penta
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	Fisher Scientific
Υπάνθιο καρπού <i>R.canina</i>	-	KORRES A.E. Φυσικά Προϊόντα
DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	TCI Chemicals
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	-	Carlo Erba Reagents
Ανθρακικό Νάτριο	Na ₂ CO ₃	Fluka
Νιτρώδες Νάτριο	NaNO ₂	Fluka
Χλωριούχο Αργίλιο	AlCl ₃ .6H ₂ O	Fluka
Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma Aldrich
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	Merck Millipore
Υδροξείδιο του Νατρίου	NaOH	Panreac
Ερυθρό του Νείλου	-	Glentham Life Sciences

2.3 Σύνθεση NaDES

2.3.1 Βεταΐνη:Γλυκερόλη 1:3

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται 5 g (42,68 mmol) στερεής άνυδρης βεταΐνης που έχει ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας και προστίθεται σε αυτή 9,36 ml (128,04 mmol) γλυκερόλης, ώστε η μοριακή αναλογία των συστατικών να είναι 1:3. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 65 °C, μέχρις ότου σχηματιστεί διαυγές και ομοιογενές υγρό (περίπου για 4-5 ώρες).

2.3.2 Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό 1:3:1

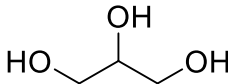
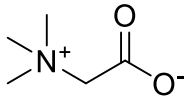
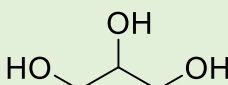
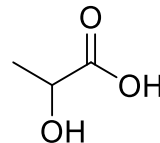
Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται 5 g (42,68 mmol) στερεής άνυδρης βεταΐνης που έχει ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας και προστίθεται σε αυτή 9,36 ml (128,04 mmol) γλυκερόλης και 0,77 ml (42,68 mmol) απιονισμένου νερού, ώστε η μοριακή αναλογία των συστατικών να είναι 1:3:1. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 65 °C, μέχρις ότου σχηματιστεί διαυγές και ομοιογενές υγρό (περίπου για 4-5 ώρες).

2.3.3 Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό* 1:2:2,5

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται 5 g (42,68 mmol) στερεής άνυδρης βεταΐνης που έχει ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας και προστίθεται σε αυτή 7,95 ml (85,36 mmol) γαλακτικού οξέος 80% w/w, ώστε η μοριακή αναλογία των συστατικών να είναι 1:2. Το σύστημα

αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 50 °C, μέχρις ότου σχηματιστεί διαυγές και ομοιογενές υγρό (περίπου για 2-3 ώρες).

Πίνακας 3: Συστατικά και μοριακή αναλογία για τη σύνθεση των NaDES.

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικά		
		1	2	3
Βεταΐνη:Γλυκερόλη Bet:Gly	1:3		 Γλυκερόλη MB=92,09 g/mol	-
Βεταΐνη: Γλυκερόλη:Νερό Bet:Gly:W	1:3:1	 Βεταΐνη MB = 117,15 g/mol	 Γλυκερόλη MB=92,09 g/mol	Νερό MB=18,02 g/mol
Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό* Bet:La:W*	1:2:2,5*		 Γαλακτικό οξύ MB = 90,08 g/mol	Νερό* MB=18,02 g/mol

Για την παραγωγή των NaDES, η βεταΐνη λειτουργεί ως δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA), ενώ η γλυκερόλη και το D,L-γαλακτικό οξύ ως δότες δεσμών υδρογόνου (HBD).

Σημειώνεται ότι το νερό που αναγράφεται ως συστατικό του NaDES Bet:La:W*, δεν προστέθηκε επιπλέον στο σύστημα, αλλά αναφέρεται στο νερό που υπάρχει στο εμπορικά διαθέσιμο D,L-γαλακτικό οξύ. Με άλλα λόγια, ο αριθμός 2,5 στη γραμμομοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES αυτού έχει προκύψει από το γεγονός ότι το χρησιμοποιηθέν γαλακτικό οξύ βρίσκεται σε μορφή 80% υδατικού διαλύματος.

2.4 Πειραματική διαδικασία

2.4.1 Εκχύλιση με χρήση NaDES

2.4.1.1 Άλεση πρώτης ύλης

Το υπάνθιο του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου παραλαμβάνεται αποξηραμένο. Η πρώτη ύλη που θα αξιοποιηθεί στις εκχυλίσεις κονιοποιείται σε πολυκόπτη – Multi και περνάει από κόσκινο.



Εικόνα 6: Πρώτη ύλη άγριου τριαντάφυλλου (Α) όπως παραλήφθηκε (Β) κονιοποιημένη μετά από κόσκινο.

2.4.1.2 Διεργασία εκχύλισης

2.4.1.2.1 Συνοπτική περιγραφή μεθοδολογίας εκχύλισης

2.4.1.2.1.1 Μεθοδολογία εκχύλισης με χρήση NaDES

ως διαλύτη

Κατάλληλη ποσότητα κονιοποιημένης πρώτης ύλης προστίθεται στον επιλεγμένο διαλύτη εκχύλισης σε γυάλινο φιαλίδιο με μαγνητικό αναδευτήρα. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμαινόμενο μάτι, προθερμασμένο στους 40 °C, για συγκεκριμένο χρόνο υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το δείγμα οδηγείται για φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 7000 στροφές. Το υπερκείμενο υγρό (εκχύλισμα) παραλαμβάνεται, τοποθετείται με απόχυση σε γυάλινο φιαλίδιο και φυλάσσεται υπό ψύξη μέχρι το χαρακτηρισμό του.

Η θερμοκρασία των 40°C επιλέχθηκε ως μια ήπια θερμοκρασία για διεργασίες εκχύλισης καθώς είναι επιθυμητό να διατηρηθεί ο πράσινος χαρακτήρας της διεργασίας, ούσα αποδοτική και βιώσιμη (ενεργειακά και οικονομικά) στο σύνολό της.

2.4.1.2.1.2 Μεθοδολογία εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες

Κατάλληλη ποσότητα κονιοποιημένης πρώτης ύλης προστίθεται στο συμβατικό διαλύτη εκχύλισης (νερό ή υδροαιθανολικό σύστημα) σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμαινόμενο μάτι, προθερμασμένο στους 40 °C, για συγκεκριμένο χρόνο υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το δείγμα διηθείται υπό κενό, το διήθημα τοποθετείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπο κενό. Το δείγμα τοποθετείται σε αντλία κενού μέχρι σταθερής μάζας και έπειτα γίνεται καταγραφή της μάζας του ξηρού εκχυλίσματος.

Πραγματοποιείται εκχύλιση με χρήση μίγματος συμβατικών διαλυτών αιθανόλης και νερού. Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 10 ml διαλύτη αιθανόλης:νερού 70:30 v/v και προστίθενται 250 mg κονιοποιημένης πρώτης ύλης. Η εκχύλιση διαρκεί 24 ώρες και έπειτα ακολουθεί η προαναφερθείσα μεθοδολογία.

Επιπλέον, η εκχύλιση διεξάγεται με διαλύτη 100% νερό. Σύμφωνα πάλι με την προαναφερθείσα μεθοδολογία σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 3 ml διαλύτη και προστίθενται 75 mg κονιοποιημένης πρώτης ύλης για διάρκεια εκχύλισης 1 ώρας.

2.4.1.2.2 Επιλογή NaDES ως κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης

Με στόχο την επιλογή του κατάλληλου φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη για την εκχύλιση, τοποθετούνται 3 g NaDES και 75 mg κονιοποιημένης πρώτης ύλης σε γυάλινο φιαλίδιο για 1 ώρα και ακολουθεί η προαναφερθείσα μεθοδολογία (βλ. [Ενότητα 2.4.1.2.1.1](#)).

Έπειτα από το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων (βλ. [Ενότητα 2.4.4](#)), επιλέγεται ο κατάλληλος διαλύτης από τους τρεις διαθέσιμους με κριτήριο την επίτευξη του όσο το δυνατό μεγαλύτερου περιεχομένου σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις και της καλύτερης αντιοξειδωτικής δράσης των ληφθέντων εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων για τον καθορισμό του εύρους τιμών των υπό μελέτη παραμέτρων που θα χρειαστούν για τη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

2.4.1.2.3 Επιλογή εύρους τιμών πειραματικών παραμέτρων εκχύλισης

Σε γυάλινο φιαλίδιο τοποθετείται μια ποσότητα NaDES και η κατάλληλη ποσότητα νερού, που χρησιμοποιείται ως συνδιαλύτης, ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή κάθε φορά κατά βάρος αναλογία NaDES/συνδιαλύτη και σε κάθε περίπτωση η συνολική ποσότητα διαλύτη να είναι 3 g. Έπειτα, προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα

κονιοποιημένης πρώτης ύλης, για την επίτευξη της επιθυμητής αναλογίας πρώτης ύλης/διαλύτη (mg/g). Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου εκχύλισης, ακολουθείται η προαναφερθείσα μεθοδολογία (βλ. [Ενότητα 2.4.1.2.1.1](#)).

2.4.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Μετά την εκτέλεση της πρώτης σειράς εκχυλίσεων και τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, καθορίζονται οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων που θα διέπουν τη δεύτερη σειρά εκχυλίσεων, της οποίας τα αποτελέσματα θα αναλυθούν στατιστικά και θα χρησιμοποιηθούν για τη διαδικασία βελτιστοποίησης της διεργασίας, μέσω του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken.

Η ανεξάρτητες μεταβλητές (πειραματικές παράμετροι) που θα εξεταστούν είναι:

- ✓ Χρόνος εκχύλισης (min) (X_1)
- ✓ % Περιεκτικότητα κατά βάρος σε συνδιαλύτη (%w/w) (X_2)
- ✓ Αναλογία της μάζας της κονιοποιημένης πρώτης ύλης προς τη μάζα του διαλύτη ($\text{mg}_{\text{πρώτης ύλης}}/\text{g}_{\text{διαλύτη}}$) (X_3).

Όπως έχει αναφερθεί, σύμφωνα με την κωδικοποίηση κατά Box-Behnken (βλ. [Ενότητα 1.6.2](#)) για τους τρεις παράγοντες X_1 , X_2 και X_3 , ορίζονται τρία επίπεδα, +1, 0, -1, ως υψηλές, ενδιάμεσες και χαμηλές τιμές αντίστοιχα.

Οι μεταβλητές απόκρισης είναι:

- ✓ Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων ($\text{mg}_{\text{γαλλ}}/\text{g}_{\text{αγρ.τρ.}}$) (TPC)
- ✓ Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων ($\text{mg}_{\text{κατ}}/\text{g}_{\text{αγρ.τρ.}}$) (TFC)
- ✓ Αντιοξειδωτική δράση για χρόνο επώασης 50 min ($\text{mg}_{\text{εκχ}}/\mu\text{l}_{\delta/\text{τοξ}}$) (IC_{50}).

Η επιλογή των παραμέτρων έγινε με γνώμονα τη σημαντική επίδρασή τους στις αποκρίσεις που μελετώνται. Όπως έχει προαναφερθεί, ο χρόνος εκχύλισης είναι κρίσιμος παράγοντας και πρέπει να διερευνηθεί, καθώς σε πολύ μικρό χρόνο ένα μεγάλο μέρος των ενώσεων-στόχων μπορεί να μην εκχυλιστεί, ενώ σε πολύ μεγάλους χρόνους οι ενώσεις-στόχοι μπορεί να υποστούν μετουσίωση. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε συνδιαλύτη, και στην προκειμένη περίπτωση σε νερό, παίζει καθοριστικό ρόλο στο ιξώδες του NaDES αλλά και στην πολικότητά του, βοηθώντας στη διαλυτοποίηση βιοδραστικών ενώσεων. Τέλος, η αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη έχει σημαντική επίδραση στην εκχύλιση και χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω, καθώς πολλές φορές υψηλή αναλογία σε πρώτη ύλη οδηγεί σε χαμηλότερη απόδοση εκχύλισης ή σε αύξηση του κόστους χωρίς μεγάλη αύξηση της απόδοσης.

2.4.3 Χαρακτηρισμός NaDES

2.4.3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Το υπέρυθρο φως (IR) είναι ηλεκτρομαγνητική (EM) ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από αυτό του ορατού φωτός ($\leq 0,7 \mu\text{m}$). Το φάσμα των υπερέρυθρων χωρίζεται σε εγγύς υπέρυθρο (NIRS), μέσο υπέρυθρο (MIRS) και άπω υπέρυθρο (FIRS). Πιο αναλυτικά, το NIRS κυμαίνεται μεταξύ $0,7 \mu\text{m}$ και $2,5 \mu\text{m}$ και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς $14000-4000 \text{ cm}^{-1}$, το MIRS κυμαίνεται μεταξύ $2,5 \mu\text{m}$ και $25 \mu\text{m}$ και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ και το FIRS κυμαίνεται μεταξύ $25 \mu\text{m}$ και $300 \mu\text{m}$ και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς $400-10 \text{ cm}^{-1}$ [67].

Η περιοχή NIRS επιτρέπει τη μελέτη των υπερτονικών και αρμονικών δονήσεων ή δονήσεων συνδυασμού. Στην περιοχή MIRS μελετώνται οι θεμελιώδεις δονήσεις και η δομή περιστροφής-δόνησης μικρών μορίων, ενώ η περιοχή FIRS παρέχει πληροφορίες για τις δονήσεις βαρέων ατόμων (δονήσεις υποκαταστάτη-μετάλλου ή πλέγματος)[67].

Η φασματοσκοπία υπερέυθρου είναι μια κρίσιμη τεχνική χαρακτηρισμού για την αποσαφήνιση της δομής της ύλης σε μοριακή κλίμακα, παρέχοντας πληροφορίες για τα ενεργειακά επίπεδα των μορίων σε κυματαριθμούς (cm^{-1}) στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, μελετώντας τις δονήσεις των μορίων, που δίνονται και σε μήκη κύματος (μm)[67,68]. Έτσι, η φασματοσκοπία υπερέυθρου είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ύλης με την ακτινοβολία φωτός, όταν τα κύματα ταξιδεύουν μέσα από το μέσο (ύλη). Τα κύματα είναι ηλεκτρομαγνητικής φύσης και αλληλεπιδρούν με την πολικότητα των χημικών δεσμών των μορίων, δηλαδή αν δεν υπάρχει πολικότητα (διπολική ροπή) στο μόριο, τότε το μόριο δεν παράγει κανένα φάσμα υπερέυθρων[67]. Το σχέδιο των δονήσεων είναι μοναδικό για ένα δεδομένο μόριο και η ένταση της απορρόφησης σχετίζεται με την ποσότητα του απορροφητή. Στην περιοχή IR, κάθε ομάδα έχει πολλά και διαφορετικά μοτίβα δόνησης όπως: τάση, κάμψη, αιώρηση. Η απορρόφηση αυτών των ζωνών είναι ανάλογη με το περιεχόμενό τους, βάσει του νόμου Lambert-Beer[68].

Η φασματοσκοπία IR είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό ουσιών και την επιβεβαίωση της ταυτότητάς τους, καθώς το φάσμα IR είναι το «δακτυλικό αποτύπωμα» μιας ουσίας[67].

Τα φασματόμετρα FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) λαμβάνουν το φάσμα υπερέυθρων με μετασχηματισμό Fourier του σήματος, με τη χρήση ενός συμβολόμετρου με κινούμενο κάτοπτρο, ώστε τελικά να παραχθεί ένας οπτικός μετασχηματισμός του υπερέυθρου σήματος. Η αριθμητική ανάλυση Fourier δίνει το φάσμα IR, δηλαδή τη σχέση έντασης και συχνότητας. Η τεχνική FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση αερίων, υγρών και στερεών με ελάχιστη προετοιμασία. Το φασματόμετρο μπορεί να χρησιμοποιείται σε λειτουργία μετάδοσης ή ανάκλασης, αλλά και σε λειτουργία αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection - ATR)[68].

Η ATR είναι μια από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές δειγματοληψίας που χρησιμοποιούνται από τους FTIR φασματογράφους επειδή είναι γρήγορη, μη

καταστρεπτική και δεν απαιτεί προετοιμασία δείγματος[69]. Κατά τη μέθοδο με ATR, για να προσπέσει η δέσμη ακτινοβολίας στο δείγμα, αξιοποιείται μια γυαλισμένη επιφάνεια από σεληνίδιο διαμαντιού, γερμανίου ή ψευδαργύρου (ZnSe), που πιέζεται σε επαφή με το δείγμα[68]. Ο κρύσταλλος αυτός έχει υψηλό δείκτη διάθλασης και εξαιρετικές ιδιότητες μετάδοσης υπεράυθρων[69]. Σε αυτή την περίπτωση, απαιτείται καλή επαφή μεταξύ του δείγματος και του κρυστάλλου και το πλεονέκτημα είναι ότι δε χρειάζεται προετοιμασία δείγματος, ενώ είναι μια εξαιρετική μέθοδος για υγρά ή μαλακά στερεά που παραμορφώνονται εύκολα (μεμβράνες, γέλες) [68,69].

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία αξιοποιείται φασματοόμετρο FTIR σε λειτουργία ATR και γίνεται ο χαρακτηρισμός του χρησιμοποιούμενου NaDES στο εύρος 4000 - 400 cm^{-1} (μέσο υπέρυθρο).

2.4.3.2 Πολικότητα

Η γνώση της πολικότητας των DES συντελεί στην κατανόηση σημαντικών ιδιοτήτων και αλληλεπιδράσεων των διαλυτών και βοηθά στην πρόβλεψη της απόδοσής τους σε πολλές χημικές διεργασίες. Διάφορες διαλυτοχρωμικές κλίμακες, συμπεριλαμβανομένης της κλίμακας χρωστικής βεταΐνης, των παραμέτρων Kamlet-Taft και της κλίμακας πολικότητας του δείκτη Ερυθρού του Νείλου (Nile-Red) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των αλληλεπιδράσεων επιδιαλυτοποίησης των DES[45]. Η πολικότητα των υπό μελέτη NaDES μετρήθηκε με τη διαλυτοχρωμική χρωστική του Ερυθρού του Νείλου, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για ασθενή οξέα και πρωτικούς μοριακούς διαλύτες, Ιοντικά Υγρά και Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες [71].

Η πολικότητα του NaDES υπολογίζεται από τη διαλυτοχρωμική μετατόπιση της χρωστικής του Ερυθρού του Νείλου. Συγκεκριμένα, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους – ορατού στην περιοχή 400-700 nm, μετράται η τιμή της παραμέτρου πολικότητας, με βάση τη διαλυτοχρωμική μετατόπιση, σε θερμοκρασία δωματίου. Η παράμετρος πολικότητας ενός δείγματος που χρησιμοποιεί την απορρόφηση της χρωστικής του Ερυθρού του Νείλου υπολογίζεται ως μοριακή ενέργεια μετάπτωσης (E_{NR}), μέσω της εξίσωσης:

$$E_{NR} \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \right) = \frac{28,597}{\lambda_{\max} (\text{nm})} \quad (5)$$

όπου λ_{\max} , το μήκος κύματος στη μέγιστη απορρόφηση[51,71].

Οι διαλύτες με υψηλότερη πολικότητα μετατοπίζουν το λ_{\max} της χρωστικής σε υψηλότερες τιμές μήκους κύματος, αποδίδοντας χαμηλότερες τιμές E_{NR} , σύμφωνα με την Εξίσωση 5 [71].

Η πολικότητα του NaDES σχετίζεται με τους δεσμούς υδρογόνου που εμφανίζονται μεταξύ HBD και HBA, είτε διαμοριακά είτε ενδομοριακά. Επομένως, ο σχηματισμός περισσότερων δεσμών υδρογόνου προκαλεί υψηλότερη πολικότητα του διαλύτη[51]. Επιπλέον, η περιεκτικότητα του δείγματος σε νερό πρέπει να ληφθεί υπόψη, εφόσον η αυξανόμενη περιεκτικότητα σε νερό μετατοπίζει το λ_{\max} σε μεγαλύτερα μήκη κύματος[71].

Στην προκειμένη περίπτωση, παρασκευάζεται ένα διάλυμα Stock διαλύοντας 31 μl Ερυθρού του Νείλου σε 969 μl αιθανόλης, το οποίο αποθηκεύεται ακολούθως στους 4 °C[71].

Η συγκέντρωση της χρωστικής του Ερυθρού του Νείλου και του δείγματος στο διαλύτη ορίζεται στην περιοχή 10^{-4} - 10^{-5} M για τη μείωση της αλληλεπίδρασης ορατών διαλυμένων ουσιών. Η χρωστική του ερυθρού του Νείλου είναι διαλυτή σε αιθανόλη και το NaDES δίνει ένα ροζ χρώμα στο διάλυμα[51].

Κατάλληλη ποσότητα NaDES τοποθετείται σε κυψελίδα και καταγράφεται το τυφλό στην περιοχή 400-700 nm. Στη συνέχεια, 50–100 μl του διαλύματος Ερυθρού του Νείλου προστίθενται στο διαλύτη, γίνεται καλή ανάδευση και γίνεται καταγραφή πάλι στην ίδια περιοχή. Γίνεται αφαίρεση των απορροφήσεων του τυφλού από εκείνες του διαλύματος NaDES με τη χρωστική του Ερυθρού του Νείλου και προσδιορίζεται η μέγιστη απορρόφηση λ_{\max} [71].

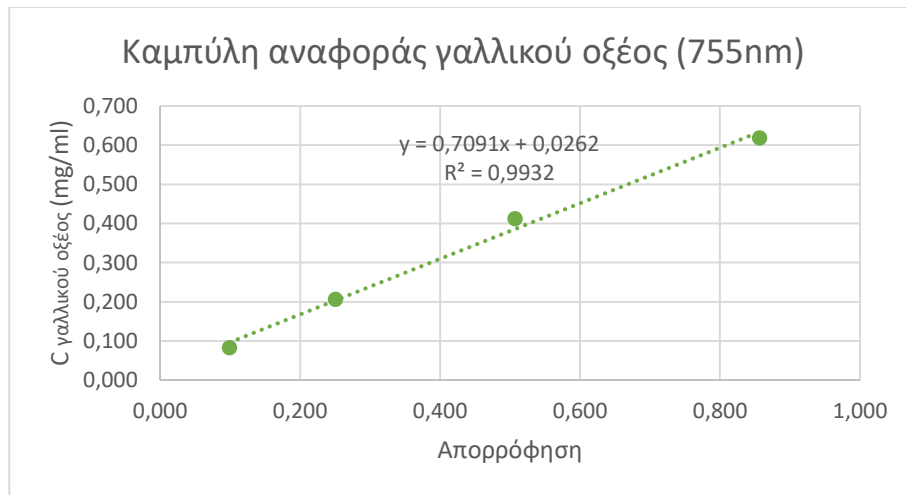
2.4.4 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

2.4.4.1 Μέτρηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων

(TPC)

Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η μέθοδος Folin – Ciocalteu ελαφρώς τροποποιημένη [29]. Κατά τη διαδικασία αυτή, η οποία γίνεται σε σκοτεινό χώρο, 20 μl stock διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης στο εκάστοτε εκχύλισμα τοποθετούνται μαζί με 1 ml απιονισμένου νερού σε ένα eppendorf. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex, προσθήκη 100 μl του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και επώαση για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 300 μl Na_2CO_3 22% w/v και 580 μl απιονισμένου νερού. Ακολουθεί και πάλι ανάδευση και επώαση για 60 λεπτά στο σκοτάδι. Η παρουσία των φαινολικών ενώσεων υποδεικνύεται με την εμφάνιση μπλε χρώματος. Επιπλέον, παρασκευάζεται και το τυφλό διάλυμα, στο οποίο αντί για το δείγμα έχει προστεθεί απιονισμένο νερό.

Ως ουσία αναφοράς αξιοποιείται το γαλλικό οξύ (ένυδρο με μοριακή αναλογία 1:1), για το οποίο σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς ως εξής: ακολουθείται η ίδια διαδικασία με παραπάνω και έπειτα γίνεται σάρωση απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος ώστε να βρεθεί το κατάλληλο μήκος κύματος όπου εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση. Τελικά επιλέγεται φωτομέτρηση στα 755 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η τιμή έχει μικρή απόκλιση σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (760 nm) [72]. Για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (100% ως 10% γαλλικού οξέος) και μετράται η απορρόφησή τους. Κατά αυτόν τον τρόπο, σχεδιάζεται το γράφημα Συγκέντρωσης γαλλικού οξέος – Απορρόφησης και παρατηρείται γραμμική σχέση ανάμεσα στα δύο μεγέθη.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος (755nm).

Έτσι, τα ισοδύναμα γαλλικού οξέος θα υπολογίζονται μέσω της εξίσωσης:

$$C_{\text{γαλλικού οξέος}} = 0,7091 * A + 0,0262 \quad (6),$$

όπου $C_{\text{γαλλικού}}$ σε mg/ml και $A = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}$, με $A_{\text{δείγματος}}$ την απορρόφηση του μείγματος που περιέχει το Stock δείγμα και $A_{\text{τυφλού}}$ την απορρόφηση του τυφλού μείγματος.

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων θα ισούται με:

$$\text{TPC} \left(\frac{\text{mg}_{\text{γαλλ}}}{\text{g}_{\text{αγριου τρ.}}} \right) = \frac{C_{\text{γαλλ}} \left(\frac{\text{mg}_{\text{γαλλ}}}{\text{ml}_{\text{εκχ.}}} \right) * V_{\text{εκχ.}} (\text{ml}_{\text{εκχ.}})}{m_{\text{πρώτης ύλης}} (\text{g}_{\text{αγριου τρ.}})} * D \quad (7)$$

όπου:

$C_{\text{γαλλ}}$, η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος που υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης (6),

$V_{\text{εκχ.}}$, ο όγκος του εκχυλίσματος,

D , ο παράγοντας αραιώσης και

$m_{\text{πρώτης ύλης}}$, η μάζα του κονιοποιημένου άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Όσον αφορά στον παράγοντα αραιώσης, τα εκχυλίσματα αραιώνονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα με την αναλογία μάζας πρώτης ύλης/διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, με στόχο την επίτευξη ικανοποιητικών απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο, και όχι μεγαλύτερων του 1. Έτσι:

- ✓ Για αναλογία 5 mg_{πρώτης ύλης} /g_{διαλύτη} η συγκέντρωση του stock διαλύματος του εκχυλίσματος θα ισούται με 0,75 ml_{εκχ.} / ml_{νερού}, επομένως ο παράγοντας αραιώσης θα ισούται με 1,33
- ✓ Για αναλογία 40 mg_{πρώτης ύλης} /g_{διαλύτη} η συγκέντρωση του stock διαλύματος του εκχυλίσματος θα ισούται με 0,10 ml_{εκχ.} / ml_{νερού}, επομένως ο παράγοντας αραιώσης θα ισούται με 10 και
- ✓ Για αναλογία 75 mg_{πρώτης ύλης} /g_{διαλύτη} η συγκέντρωση του stock διαλύματος του εκχυλίσματος θα ισούται με 0,05 ml_{εκχ.} / ml_{νερού}, επομένως ο παράγοντας αραιώσης θα ισούται με 20.

Για τη μέτρηση των TPC εκχυλισμάτων που προέκυψαν από εκχύλιση με συμβατικό διαλύτη, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση γνωστής συγκέντρωσης του ξηρού εκχυλίσματος στο διαλύτη τους, δηλαδή σε αιθανόλη:νερό 70:30 % v/v για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με το διαλύτη αυτό, και σε 100% νερό για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με νερό. Έτσι, δημιουργείται ένα διάλυμα Stock ($2 \text{ mg}_{\text{εκχ.}}/\text{ml}_{\text{δ/τος}}$), στο οποίο προσδιορίζονται τα TPC με την προαναφερθείσα διαδικασία. Εφόσον είναι γνωστή η συνολική ποσότητα του ξηρού εκχυλίσματος που τελικά λήφθηκε, αν διαιρεθεί με τον όγκο του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε αρχικά, θα βρεθεί η ποσότητα του εκχυλίσματος που λήφθηκε σε mg ανά ml διαλύτη. Τελικά, ο παράγοντας αραιώσης θα ισούται με τη συγκέντρωση εκχυλίσματος ανά διαλύτη που λήφθηκε αρχικά, ανά τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών.

Όλα τα δείγματα παρασκευάζονται εις τριπλούν για έλεγχο επαναληψιμότητας, οπότε στους υπολογισμούς υπεισέρχεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

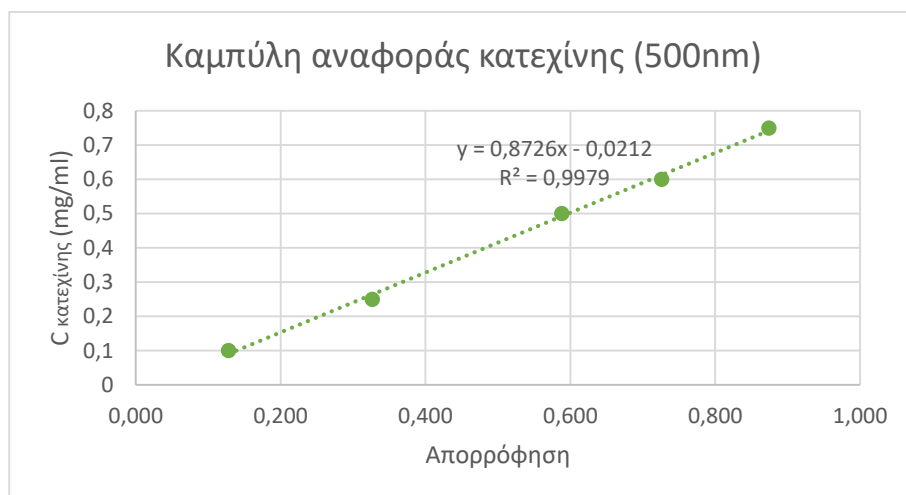
Το υπέρκορο διάλυμα Na_2CO_3 παρασκευάζεται με βάση το όριο διαλυτότητας του Na_2CO_3 (s) στο νερό, που ισούται με $22 \text{ g Na}_2\text{CO}_3/100 \text{ mL H}_2\text{O}$. Προστίθεται ποσότητα ίση με $30 - 33 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$ σε απιονισμένο νερό 100 mL και το μείγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση. Ακολουθεί ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται ακόμη μια μικρή ποσότητα Na_2CO_3 και το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να σχηματιστεί ίζημα ή κρύσταλλοι. Έπειτα, ακολουθεί διήθηση, από όπου παραλαμβάνεται το διήθημα ως ένα υπέρκορο διάλυμα.

2.4.4.2 Μέτρηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων

(TFC)

Εφαρμόζεται η χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αργιλίου ελαφρώς τροποποιημένη [33]. Κατά τη διαδικασία αυτή, 50 μl Stock διαλύματος του εκάστοτε εκχυλίσματος τοποθετούνται μαζί με 30 μl NaNO_2 5% w/v σε ένα eppendorf και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex και επώαση για 6 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 60 μl AlCl_3 10% w/v, ακολουθεί πάλι ανάδευση σε Vortex και επώαση για ακόμη 5 λεπτά. Τέλος, γίνεται προσθήκη 300 μl NaOH και 560 μl απιονισμένου νερού, ανάδευση σε vortex και 15 λεπτά επώαση. Το NaOH δρα ως ρυθμιστής pH και η παρουσία των φλαβονοειδών ενώσεων παρατηρείται με την εμφάνιση ροζ απόχρωσης. Επιπλέον παρασκευάζεται και το τυφλό διάλυμα, στο οποίο αντί για το δείγμα έχει προστεθεί απιονισμένο νερό.

Ως ουσία αναφοράς αξιοποιείται η κατεχίνη, για την οποία σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς ως εξής: ακολουθείται η ίδια διαδικασία με παραπάνω και γίνεται σκανάρισμα απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος ώστε να βρεθεί το κατάλληλο μήκος κύματος όπου εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση. Τελικά επιλέγεται φωτομέτρηση στα 500 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η τιμή έχει μικρή απόκλιση σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (510 nm) [28]. Για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (100% ως 10% κατεχίνης) και μετράται η απορρόφησή τους. Κατά αυτόν τον τρόπο, σχεδιάζεται το γράφημα Συγκέντρωσης κατεχίνης – Απορρόφησης και παρατηρείται γραμμική σχέση ανάμεσα στα δύο μεγέθη.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης (500nm).

Έτσι, τα ισοδύναμα κατεχίνης θα υπολογίζονται μέσω της εξίσωσης:

$$C_{\text{κατεχίνης}} = 0,8726 * A - 0,0212 \quad (8)$$

όπου $C_{\text{κατεχίνης}}$ σε mg/ml

και $A = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}$, με $A_{\text{δείγματος}}$ την απορρόφηση του μείγματος που περιέχει το Stock διάλυμα και $A_{\text{τυφλού}}$ την απορρόφηση του τυφλού μείγματος.

Το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων θα ισούται με:

$$\text{TFC} \left(\frac{\text{mg}_{\text{κατεχ.}}}{\text{g}_{\text{αγριου τρ.}}} \right) = \frac{C_{\text{γαλλ}} \left(\frac{\text{mg}_{\text{κατεχ.}}}{\text{ml}_{\text{εκχ.}}} \right) * V_{\text{εκχ}} (\text{ml}_{\text{εκχ.}})}{m_{\text{πρώτης ύλης}} (\text{g}_{\text{αγριου τρ.}})} * D \quad (9)$$

όπου: $C_{\text{κατεχίνης}}$, η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης που υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης (8),

$V_{\text{εκχ.}}$, ο όγκος του εκχυλίσματος,

D , ο παράγοντας αραιώσης και

$m_{\text{πρώτης ύλης}}$, η μάζα του κονιοποιημένου άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Ακόμη, για τον παράγοντα αραιώσης ακολουθείται πάλι η ίδια διαδικασία με τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και ισχύουν οι ίδιες συγκεντρώσεις για τις αντίστοιχες αναλογίες μάζας πρώτης ύλης/διαλύτη.

Όλα τα δείγματα παρασκευάζονται εις τριπλούν για έλεγχο επαναληψιμότητας, οπότε στους υπολογισμούς υπεισέρχεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Όσον αφορά στο διάλυμα NaNO_2 5% w/v, αυτό παρασκευάζεται μέσω προσθήκης 1 g NaNO_2 (s) σε 20 mL απιονισμένου νερού. Το μείγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα έως την πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού.

Το διάλυμα AlCl_3 10% w/v παρασκευάζεται μέσω προσθήκης 18,1 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (s) σε 100 mL απιονισμένου νερού, στον απαγωγό. Το μείγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα έως την πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού.

Τέλος, το διάλυμα NaOH 1 M παρασκευάζεται μέσω προσθήκης 1 g NaOH (s) σε 25 ml απιονισμένου νερού. Η διαδικασία προσθήκης του στερεού γίνεται σταδιακά και υπό ψύξη, λόγω του εξώθερμου φαινομένου. Το μείγμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα υπό ψύξη, έως την πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού.

2.4.4.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης

Εφαρμόζεται η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH ελαφρώς τροποποιημένη [34]. Κατά τη διαδικασία αυτή, ζυγίζονται με ακρίβεια 5mg της ρίζας DPPH και διαλύονται σε αιθανόλη σε ογκομετρική φιάλη, έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50ml. Ακολουθεί ανάδευση μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση και το διάλυμα αποθηκεύεται υπό ψύξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί, απουσία φωτός. Σημειώνεται πως δε φυλάσσεται για διάστημα μεγαλύτερο των τριών ημερών, με στόχο να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας[73].

Στα προκαταρκτικά πειράματα, δημιουργούνται διαλύματα εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 20 μl εκχ./ ml διαλύματος, λαμβάνοντας 20 μl εκχυλίσματος και προσθέτοντας 980 μl αιθανόλης. Για το πείραμα ελέγχου της αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, με αναλογία 75 mg_{πρώτης ύλης}/g_{διαλύτη}, επειδή το εκχύλισμα δε διαλύεται σε αιθανόλη, δημιουργείται διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 2,5 μl εκχ./ ml διαλύματος, λαμβάνοντας 5 μl εκχυλίσματος και προσθέτοντας 1995 μl απιονισμένο νερό.

Για τη συμβατική εκχύλιση με διαλύτη το σύστημα αιθανόλη:νερό 70:30% v/v, το εκχύλισμα δε διαλύεται σε αιθανόλη, επομένως δημιουργείται διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0,2 mg εκχ./ ml διαλύματος με διαλύτη αιθανόλη:νερό 70:30 %v/v.

Για τη συμβατική εκχύλιση με διαλύτη το νερό, πάλι το εκχύλισμα δε διαλύεται σε αιθανόλη, οπότε χρησιμοποιείται νερό για την παρασκευή του διαλύματος, το οποίο έχει συγκέντρωση 0,1 mg εκχ./ml διαλύματος.

Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, για τα πειράματα με αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη ίση με 5 mg_{πρώτης ύλης} /g_{διαλύτη}, επιλέγεται συγκέντρωση διαλύματος εκχυλίσματος ίση με 20 μl_{εκχ.}/ ml διαλύματος με αιθανόλη, ενώ για τα πιο πυκνά εκχυλίσματα (με αναλογία 40 και 75 mg_{πρώτης ύλης} /g_{διαλύτη}) που δε διαλύονται σε αιθανόλη, δημιουργούνται διαλύματα εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 2,5 μl_{εκχ.}/ ml διαλύματος με νερό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Μετά από μετρήσεις των δειγμάτων σε διάφορες αραιώσεις με τη μέθοδο DPPH, τελικά αξιοποιήθηκαν οι προαναφερθείσες έχοντας ως στόχο την εξαγωγή αποτελεσμάτων τα οποία προσαρμόζονται κατάλληλα στο γραμμικό μοντέλο του DPPH, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Οι αραιώσεις είναι ακραίες με στόχο τη μείωση του ιξώδους, το οποίο δημιουργεί προβλήματα κατά τις μετρήσεις.

Για κάθε ένα από αυτά τα αρχικά διαλύματα εκχυλισμάτων θα χρησιμοποιηθεί το ανάλογο Control διάλυμα όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Το αρχικό αυτό διάλυμα κάθε εκχυλίσματος θα αναφέρεται ως Stock και η αρχική αυτή συγκέντρωση θα αναφέρεται ως C. Αξιοποιείται plate 96 θέσεων, τοποθετώντας σε κάθε κυψελίδα 100μl διαλύματος DPPH και 100μl διαλύματος εκχυλίσματος σε κατάλληλες αραιώσεις από το Stock. Στο Stock, δηλαδή, γίνεται αραιώση με αιθανόλη, νερό ή μείγμα αιθανόλης:νερού (ανάλογα με το αρχικό Stock) ώστε να υπάρχουν στο plate οι συγκεντρώσεις C, 0,8C, 0,6C, 0,4C και 0,2C[73].

Πιο αναλυτικά, στην κυψελίδα που θα περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C, τοποθετούνται 100μl διαλύματος DPPH και 100μl του Stock διαλύματος, ενώ για το διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0,8C, τοποθετούνται 100μl διαλύματος DPPH, 80μl του Stock, 20μl είτε αιθανόλης, είτε νερού, είτε μείγματος αιθανόλης:νερού αναλόγως της διαλυτότητας του εκχυλίσματος σε αυτούς τους διαλύτες. Κατά τον ίδιο τρόπο δημιουργούνται και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 4: Διαδικασία συμπλήρωσης κυψελίδων στο plate 96 θέσεων.

Συγκέντρωση στην κυψελίδα (μl εκχ./μl δ/τος)	Όγκος διαλύματος DPPH (μl)	Όγκος διαλύματος Stock (μl)	Όγκος αιθανόλης/Νερού/Μείγματος αιθανόλης:νερού (μl)
C	100	100	-
0,8C	100	80	20
0,6C	100	60	40
0,4C	100	40	60
0,2C	100	20	80

Ακόμη, σε μια κυψελίδα τοποθετούνται 200 μl διαλύματος DPPH και σε μια άλλη 100μl DPPH και 100 μl από το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του Stock (χωρίς δείγμα), αναφερόμενα ως Control διαλύματα. Δηλαδή, για τα διαλύματα όπου έχει χρησιμοποιηθεί αιθανόλη, τοποθετούνται 100 μl αιθανόλης, για εκείνα που έχει χρησιμοποιηθεί νερό, τοποθετούνται 100 μl νερό, ενώ για εκείνα που έχει χρησιμοποιηθεί μείγμα αιθανόλης:νερού 70:30 %v/v, τοποθετούνται 70 μl αιθανόλης και 30 μl νερού.

Όλα τα δείγματα παρασκευάζονται εις διπλούν για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, οπότε στους υπολογισμούς υπεισέρχεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Η προετοιμασία του plate πραγματοποιείται όσο το δυνατόν απουσία φωτός, λόγω του ότι κατά την έκθεση στο φως, η απορρόφηση του DPPH τείνει να μειώνεται,. Έπειτα, το plate αφήνεται σε σκοτεινό χώρο και επώάζεται για 50 min και 90 min. Μετά το πέρας του κάθε χρόνου επώασης μετράται η απορρόφηση στα 515 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis [31,73].

Για κάθε εκχύλισμα που μετράται, λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης και σχεδιάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυψελίδων. Θα ισχύει ότι:

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (10)$$

όπου A_{control} η απορρόφηση του Control διαλύματος αιθανόλης/νερού χωρίς δείγμα και $A_{\text{δείγματος}}$ η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα[34,74].

Η γραφική παράσταση που προκύπτει είναι ευθεία γραμμή θετικής κλίσης, και μέσω της γραμμής τάσης που προκύπτει από αυτή υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος εκχυλίσματος που επιτυγχάνει μείωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50% (IC₅₀), με στόχο τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ισχύος[74].

Η συγκέντρωση αυτή δίνεται από τη σχέση:

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (11)$$

όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση της ευθείας.

Η θετική κλίση της γραφικής παράστασης της %αναστολής της ρίζας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος εκχυλίσματος, δείχνει πως η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος εκχυλίσματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ριζών που ανάγονται από τα αντιοξειδωτικά, άρα και την αύξηση της % αναστολής της ρίζας DPPH.

Επιπλέον, ο χρόνος επώασης του δείγματος παίζει σημαντικό ρόλο. Όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης των δειγμάτων μέχρι τη μέτρηση της απορρόφησής τους, η τιμή του IC₅₀ μειώνεται. Με την πάροδο του χρόνου τα αντιοξειδωτικά σαρώνουν τις ρίζες του DPPH στο σταθερό όγκο διαλύματος της κυψελίδας, οπότε η ποσότητα των ριζών και επομένως η συγκέντρωσή τους μειώνεται. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του διαλύματος σε εκχύλισμα είναι σταθερή, με την πάροδο του χρόνου επιτυγχάνεται μεγαλύτερη σάρωση των ριζών, δηλαδή για να σαρωθεί το 50% της αρχικής ποσότητας των ριζών DPPH, απαιτείται μικρότερη περιεκτικότητα διαλύματος σε εκχύλισμα, δηλαδή ο δείκτης IC₅₀ είναι μικρότερος.

Επιπλέον, ο διαλύτης που έχει χρησιμοποιηθεί κατά την εκχύλιση είναι καθοριστικός. Κατά τη χρήση διαλύτη NaDES, το υψηλό ιξώδες εμποδίζει την άμεση αλληλεπίδραση των ριζών DPPH με τα εκχυλισμένα βιοδραστικά συστατικά που υπάρχουν στο διαλύτη. Με την πάροδο του χρόνου, οι ενώσεις «απελευθερώνονται» από το NaDES και αλληλεπιδρούν με το DPPH οδηγώντας σε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Κατά τη χρήση συμβατικού διαλύτη (μείγματος αιθανόλης:νερού ή νερού) για την εκχύλιση, η ικανότητα σάρωσης του DPPH εμφανίζεται σε πολύ μικρότερους χρόνους. Αυτή η συμπεριφορά ενισχύει την πεποίθηση ότι τα NaDES δρουν ως «προστατευτικά» και «αποθηκευτικά» μέσα για τις εκχυλισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις[42].

Εκτός από το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, η μέθοδος αναστολής ρίζας DPPH εφαρμόζεται και στο καθαρό NaDES. Γίνεται έλεγχος αν η απόκριση αυτή οφείλεται αποκλειστικά στις εκχυλισμένες ενώσεις από την υπό εξέταση πρώτη ύλη και στο NaDES που έχει χρησιμοποιηθεί. Επομένως, με τα αποτελέσματα που προκύπτουν αποδεικνύεται πως οι εκχυλισμένες ενώσεις από το υπάνθιο του άγριου τριαντάφυλλου είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Χαρακτηρισμός NaDES

3.1.1 Πυκνότητα

Η πυκνότητα των NaDES προσδιορίστηκε προσεγγιστικά μέσω ζύγισης γνωστού όγκου διαλύτη για 10 επαναλήψεις. Έτσι, στον παρακάτω Πίνακα παρατίθενται οι τιμές των πυκνοτήτων που προσδιορίστηκαν πειραματικά, μαζί με την τυπική απόκλιση.

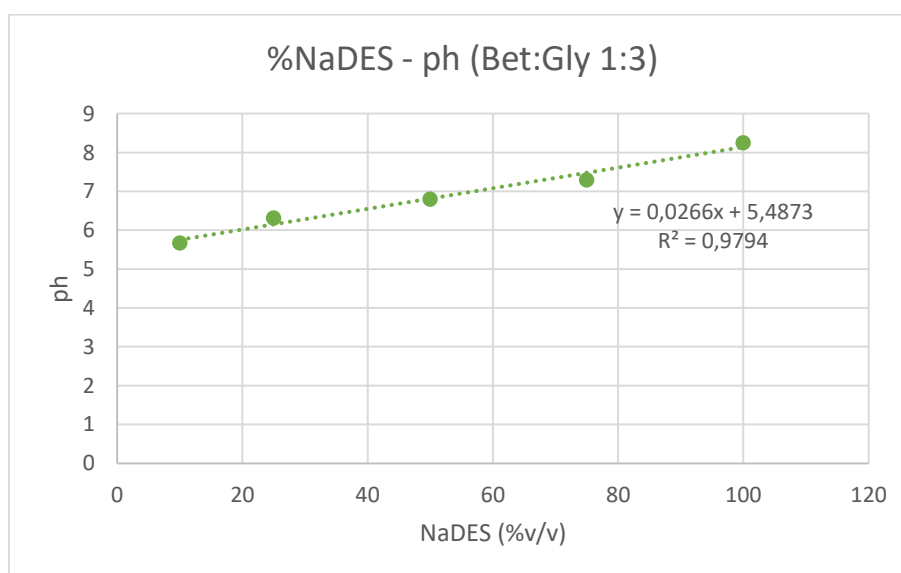
Πίνακας 5: Πειραματικές πυκνότητες NaDES.

NaDES	ρ (g/ml)
Bet:Gly 1:3	1,19±0,02
Bet:Gly:W 1:3:1	1,25±0,03
Bet:La:W* 1:2:2,5	1,16±0,01

Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα [51,75].

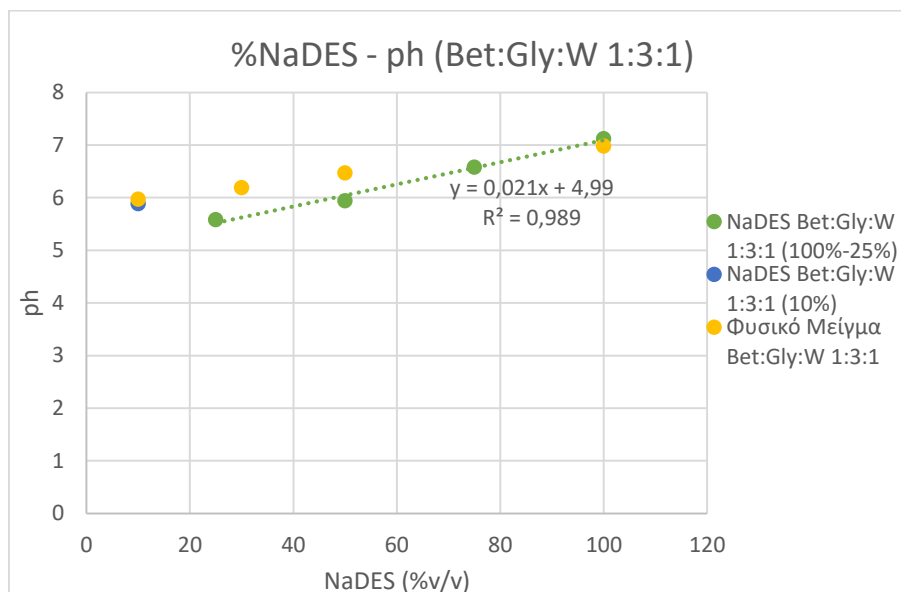
3.1.2 pH

Με τη βοήθεια πεχαμέτρου μετράται το pH των NaDES σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (21 ± 2 °C), για διάφορες αραιώσεις με νερό και δημιουργούνται τα γραφήματα του pH ως προς την % περιεκτικότητα κατ'όγκο του διαλύματος σε NaDES.



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:Gly 1:3 σε διάφορες συγκεντρώσεις.

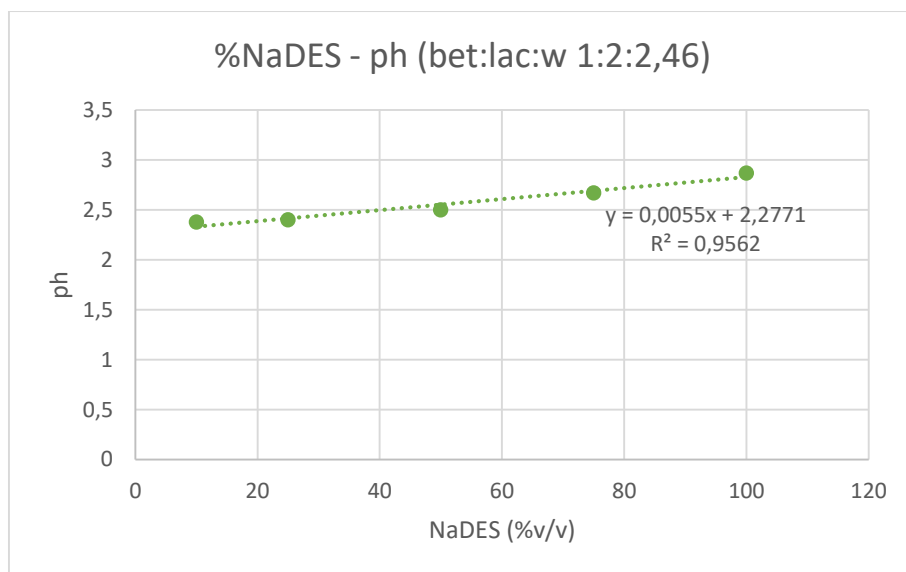
Το pH του NaDES Bet:Gly 1:3 βρέθηκε ίσο με 8,25. Με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό το pH μειώνεται, ενώ η γραμμική σχέση των δύο μεγεθών διατηρείται και σε ακραίες αραιώσεις (10% NaDES v/v).



Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1 σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Το pH του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1 βρέθηκε ίσο με 7,12. Με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό το pH μειώνεται, ενώ η γραμμική σχέση διατηρείται ως την περιεκτικότητα 30% NaDES v/v.

Για περιεκτικότητα ίση με 10% NaDES v/v παρατηρείται μια αύξηση του pH. Έτσι, κρίθηκε σκόπιμο να μετρηθεί και το pH του φυσικού μείγματος της βεταΐνης:γλυκερόλης:νερού 1:3:1, με απλή ανάδευση των συστατικών σε διάφορες περιεκτικότητες κατ'όγκο του διαλύματος σε φυσικό μείγμα. Παρατηρείται πως στην αραιώση του NaDES 10% v/v, το pH του NaDES και εκείνο του φυσικού μείγματος είναι πολύ κοντά, γεγονός που είναι πιθανώς ενδεικτικό της διάρρηξης του συστήματος, ή τμήματος αυτού, των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του NaDES και την συμπεριφορά του ως ένα απλό μείγμα των τριών συστατικών.



Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση του pH του NaDES Bet:La:W* 1:2:2,5 σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Το pH του NaDES Bet:La:W* 1:2:2,5 βρέθηκε ίσο με 2,87. Παρατηρείται πως με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό το pH μειώνεται, ενώ η γραμμική σχέση των δύο μεγεθών διατηρείται και σε ακραίες αραιώσεις (10% NaDES v/v).

Βιβλιογραφικά βρέθηκε πως το pH του NaDES Bet:La:W* 1:2:1,11 (D,L-γαλακτικό οξύ 90% υδατικό διάλυμα) είναι ίσο με 2,51, τονίζοντας την οξύτητά του λόγω της παρουσίας του γαλακτικού οξέος[46,76].

3.1.3 Ιξώδες

Οι τιμές ιξώδους των NaDES υπολογίστηκαν με τη βοήθεια ιξωδόμετρου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (21 ± 2 °C) και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Πειραματικές τιμές ιξώδους για τα τρία NaDES.

NaDES	Ιξώδες (Pa*s)
Bet:Gly 1:3	0,9492
Bet:Gly:W 1:3:1	0,5190
Bet:La:W* 1:2:2,5	0,1398

Παρατηρείται πως το ιξώδες του Bet:Gly 1:3 είναι μεγαλύτερο από εκείνο του Bet:Gly:W 1:3:1. Η παρουσία του νερού στο NaDES Bet:Gly:W βοήθησε στη μείωση του ιξώδους και στην ευκολότερη διαχείριση του NaDES.

Σημειώνεται, πως συνήθως τα NaDES μετρούνται σε υψηλότερες θερμοκρασίες εξαιτίας των προβλημάτων που δημιουργεί το υψηλό ιξώδες στην περιστροφή του ιξωδόμετρου σε χαμηλότερες θερμοκρασίες[46].

Τα αποτελέσματα για το NaDES Bet:Gly 1:3 έρχονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [50,77].

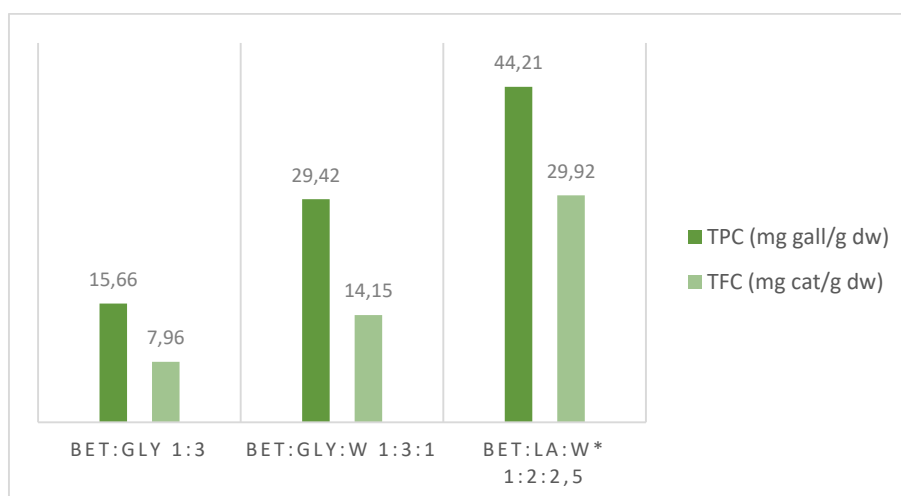
3.2 Επιλογή NaDES για τη διαδικασία βελτιστοποίησης

Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιούνται πειράματα εκχύλισης με στόχο την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη από τους τρεις προαναφερθέντες. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συνθήκες των πειραμάτων και τα αποτελέσματα, ενώ στο διάγραμμα εμφανίζονται τα αποτελέσματα για το περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, με στόχο τον ευκολότερο έλεγχο. Τα γραφήματα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων του δείκτη IC₅₀ και για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων του δείκτη IC₅₀ σε mg_{εκχ.}/ml_{δ/τος} παρατίθενται στο Παράρτημα Ι. Σημειώνεται πως όλα τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία 40 °C

Ως περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό στον πίνακα αναφέρεται η προσθήκη συνδιαλύτη στο NaDES για τη βελτίωση της εκχύλισης. Επειδή στην προκειμένη περίπτωση μελετώνται οι τρεις ευτηκτικοί διαλύτες ως προς την αποτελεσματικότητά τους ως διαλυτών εκχύλισης, δεν έχει πραγματοποιηθεί προσθήκη επιπλέον νερού στο σύστημα, για αυτό και η αντίστοιχη στήλη του πίνακα δεν είναι συμπληρωμένη.

Πίνακας 7: Συγκριτική αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου του άγριου τριαντάφυλλου για τα τρία NaDES ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.

Κωδικός πειράματος	Διαλύτης	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
							50 min	90 min
BON6	Bet:La:W*	60	-	25	44,21	29,92	35,64	22,80
BON10	Bet:Gly	60	-	25	15,66	7,96	56,88	39,11
BON12	Bet:Gly:W	60	-	25	29,42	14,15	57,21	31,29



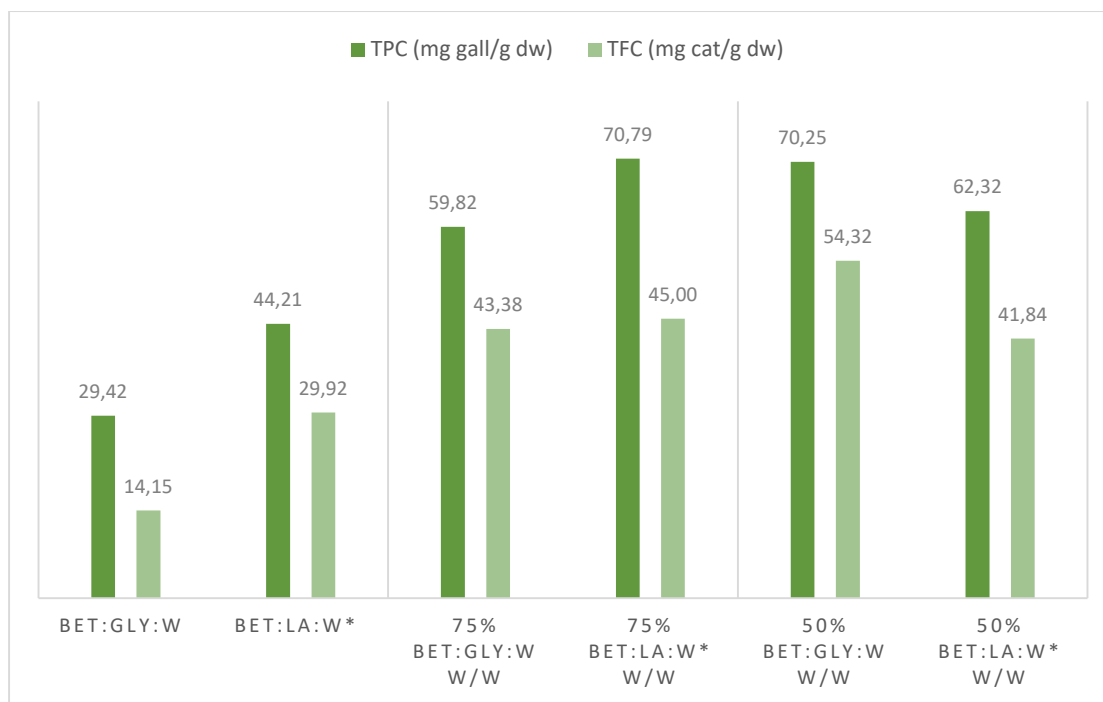
Διάγραμμα 6: Γράφημα με τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με χρήση των τριών NaDES.

Καλύτερα αποτελέσματα και στα τρία μεγέθη παρατηρούνται στα εκχυλίσματα που έχουν προκύψει με χρήση των NaDES Bet:Gly:W και Bet:La:W*. Παρατηρείται μεγαλύτερο περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, ενώ μικρότερος δείκτης IC₅₀, άρα και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ των NaDES Bet:Gly και Bet:Gly:W παρατηρούνται καλύτερα αποτελέσματα σε εκείνο που έχει ως τρίτο συστατικό το νερό. Αυτό οφείλεται στο χαμηλότερο ιξώδες του διαλύτη, καθώς και στην αύξηση της πολικότητας, λόγω της προσθήκης νερού, με επακόλουθο την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων. Ο δείκτης IC₅₀ για τα δύο αυτά NaDES είναι πολύ κοντά, λόγω του μεγάλου ιξώδους, που όπως προαναφέρθηκε παίζει καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών με τη ρίζα DPPH.

Διεξάγονται επιπλέον πειράματα για τους διαλύτες Bet:Gly:W και Bet:La:W* με συνδιαλύτη το νερό. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συνθήκες των πειραμάτων και τα αποτελέσματα, ενώ στο διάγραμμα εμφανίζονται τα αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, με στόχο τον ευκολότερο έλεγχο.

Πίνακας 8: Συγκριτική αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου άγριου τριαντάφυλλου για τα NaDES Bet:Gly:W και Bet:La:W* με τη χρήση συνδιαλύτη ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.

Κωδικός πειράματος	Διαλύτης	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα τα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
							50 min	90 min
BON6	Bet:La:W*	60	-	25	44,21	29,92	35,64	22,80
BON13	Bet:La:W*	60	25	25	70,79	45,00	21,74	14,08
BON17	Bet:La:W*	60	50	25	62,32	41,84	24,60	15,29
BON12	Bet:Gly:W	60	-	25	29,42	14,15	57,22	31,29
BON24	Bet:Gly:W	60	25	25	59,82	43,38	25,18	15,63
BON30	Bet:Gly:W	60	50	25	70,25	54,33	21,99	15,08



Διάγραμμα 7: Γράφημα με τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με χρήση των NaDES Bet:Gly:W και Bet:La:W* και τη χρήση συνδιαλύτη.

Παρατηρείται πως τα εκχυλίσματα με διαλύτη το Bet:La:W* έχουν τα βέλτιστα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται συνδιαλύτης 25% w/w, ενώ με την περαιτέρω αύξηση του συνδιαλύτη μειώνεται το περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις. Η ίδια τάση παρατηρείται και στο δείκτη IC₅₀, με την τιμή του να αυξάνεται με την περαιτέρω αύξηση του νερού πάνω από 25% w/w, επομένως μειώνεται η αντιοξειδωτική δράση.

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα με διαλύτη το Bet:Gly:W, φαίνεται πως με την αύξηση του νερού βελτιώνονται όλες οι αποκρίσεις.

Και οι δύο διαλύτες φαίνεται πως μπορούν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, εάν βρεθεί το κατάλληλο εύρος τιμών των παραμέτρων με στόχο τη βελτιστοποίηση. Παρόλα αυτά, λόγω της ευρείας χρήσης της γλυκερόλης στη βιομηχανία καλλυντικών, επιλέγεται για περαιτέρω χρήση ο διαλύτης που περιέχει αυτό το συστατικό, δηλαδή το NaDES Bet:Gly:W.

3.3 Χαρακτηρισμός NaDES Bet:Gly:W 1:3:1

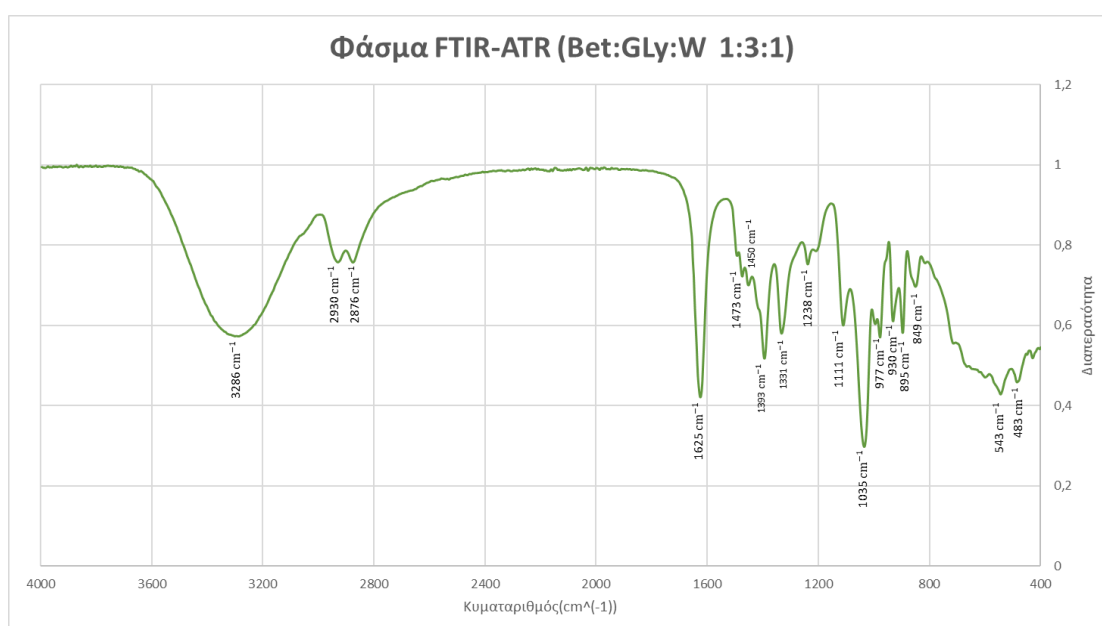
3.3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Αποσβένουσα Ολική

Ανάκλαση (FTIR-ATR)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ανάλυση FTIR-ATR του δείγματος NaDES Bet:Gly:W 1:3:1.

Σημειώνεται πως η σχέση που συνδέει την απορρόφηση (A) με τη διαπερατότητα (T), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό του φάσματος, είναι η ακόλουθη:

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) \quad (12)$$



Διάγραμμα 8: Φάσμα FTIR-ATR του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1

Στο παραπάνω φάσμα, στα 3286 cm⁻¹ παρατηρείται ευρεία κορυφή που υποδεικνύει τη δόνηση τάσης των ελεύθερων υδροξυλίων -OH.

Οι κορυφές στα 2930 cm⁻¹ και 2876 cm⁻¹ υποδεικνύουν C-H δονήσεις τάσης των μεθυλενίων της γλυκερόλης (ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση αντίστοιχα), ενώ στα 1625 cm⁻¹ και 1473 cm⁻¹ παρατηρείται δόνηση τάσης του -COO⁻ (ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση αντίστοιχα) του μορίου της βεταΐνης.

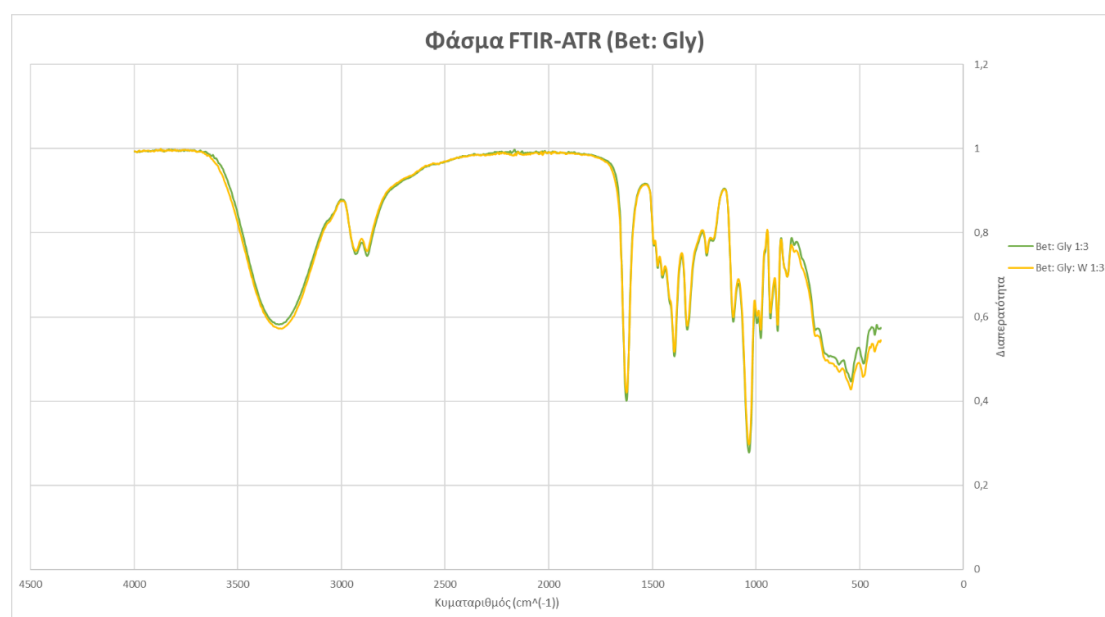
Το τεταρτοταγές αμμώνιο της βεταΐνης δεν παρουσιάζει ούτε δόνηση τάσης ούτε κάμψης N-H.

Γενικά, παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση των κορυφών ως προς τους κυματαριθμούς, λόγω των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του HBD (γλυκερόλης) και HBA (βεταΐνης). Έτσι, η αλληλεπίδραση που γίνεται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του -COO⁻ της βεταΐνης και του -OH της γλυκερόλης, οδηγεί σε

μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του ανιόντος καρβοξυλίου. Ο ενδομοριακός δεσμός, επίσης, μειώνει τη δόνηση τάσης του -OH.

Η κορυφή στα 1393 cm^{-1} οφείλεται στις $\text{CH}_3\text{-N}$ δονήσεις κάμψης της βεταΐνης, ενώ στα 1331 cm^{-1} στις δονήσεις κάμψης C-OH της γλυκερόλης. Στα 1035 cm^{-1} εντοπίζεται δόνηση τάσης C-O του πρωτοταγούς υδροξυλίου στη γλυκερόλη. Τέλος, οι κορυφές στα 543 cm^{-1} και 483 cm^{-1} αντιστοιχούν σε C-C δονήσεις κάμψης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR-ATR των NaDES Bet:Gly 1:3 και Bet:Gly:W 1:3:1 σε ένα κοινό διάγραμμα, με στόχο τη σύγκριση.



Διάγραμμα 9: Φάσματα FTIR-ATR για τα NaDES Bet:Gly 1:3 και Bet:Gly:W 1:3:1

Κατά τη συγκριτική μελέτη των δύο φασμάτων δεν παρατηρούνται ποιοτικές αλλαγές, λόγω του ότι όλες οι κορυφές εντοπίζονται στους ίδιους κυματάρθμους. Επιπλέον, παρατηρώντας τις τιμές της διαπερατότητας για τα δύο NaDES, φαίνεται πως υπάρχουν πολύ μικρές μεταβολές, οπότε και πολύ μικρές ποσοτικές διαφορές των δεσμών.

3.3.2 Πολικότητα

Ακολουθώντας τη διαδικασία που προαναφέρθηκε στο Πειραματικό Μέρος (βλ. [Ενότητα 2.4.3.2](#)), μετράται η πολικότητα, με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου UV-VIS, του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέγιστου μήκους κύματος και των τιμών E_{NR} που έχουν προκύψει για το διαλύτη NaDES, αραιωμένο κάθε φορά με νερό, του οποίου η περιεκτικότητα εκφράζεται ως % περιεκτικότητα κατά μάζα σε νερό του διαλύτη (%w/w).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα πολικότητας του NaDES Bet:Gly:W 1:3:1 για διάφορες περιεκτικότητες κατά μάζα σε νερό (% w/w).

NaDES	Συνδιαλύτης (%w/w)	λ_{\max} (nm)	E_{NR} (kcal/mol)
Bet:Gly:W	-	572	49,98
	25	584	48,96
	50	592	48,30
	75	591	48,38

Παρατηρείται πως με την προσθήκη νερού η πολικότητα αυξάνεται, όπως έχει εξηγηθεί και στο Θεωρητικό Μέρος (βλ. [Ενότητα 1.3.4.7](#)). Υπενθυμίζεται πως οι διαλύτες με υψηλότερη πολικότητα μετατοπίζουν το λ_{\max} σε υψηλότερες τιμές μήκους κύματος και επομένως σε χαμηλότερες τιμές E_{NR} . Σε μεγάλες περιεκτικότητες του συνδιαλύτη, η πολικότητα του διαλύτη είναι κοντά σε εκείνη του νερού (48,21 kcal/mol).

3.4 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

3.4.1 Πρώτη σειρά πειραμάτων – Χρήση NaDES ως διαλύτη

εκχύλισης

Έχοντας επιλέξει ως κατάλληλο διαλύτη, το Bet:Gly:W 1:3:1, διεξάγονται κάποια πειράματα σύμφωνα με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε, με στόχο τον προσδιορισμό του εύρους τιμών των τριών παραμέτρων που θα μελετηθούν, έπειτα από το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων. Τα γραφήματα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων του δείκτη IC_{50} παρατίθενται στο Παράρτημα I.

3.4.1.1 Προσδιορισμός εύρους περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη

Αρχικά, διεξάγονται εκχυλίσεις στον ίδιο χρόνο εκχύλισης και με την ίδια αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα κατά βάρος του συνδιαλύτη. Υπενθυμίζεται πως όλα τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία 40 °C.

Πίνακας 10: 1^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπανθίου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας την περιεκτικότητα %w/w του διαλύτη εκχύλισης σε νερό.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ.} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ.} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ.} /ml _{δ.})	
						50 min	90 min
BON12	60	-	25	29,42	14,15	57,22	31,29
BON31	60	10	25	56,20	44,56	41,26	24,91
BON24	60	25	25	59,82	43,38	25,18	15,63
BON35	60	30	25	63,49	48,34	25,67	15,59
BON30	60	50	25	70,25	54,33	21,99	15,08
BON36	60	70	25	66,63	48,15	57,22	31,29

Παρατηρείται πως όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα κατά βάρος σε συνδιαλύτη, τόσο αυξάνεται το περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, μέχρι την περιεκτικότητα 50% w/w, όπου παρατηρείται το μέγιστο, ενώ αυξάνοντας σε 70% παρατηρείται πτώση των τιμών των παραμέτρων αυτών.

Όσον αφορά το δείκτη IC₅₀, παρατηρείται μείωσή του, δηλαδή αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, ως την περιεκτικότητα 50% w/w σε συνδιαλύτη, όπου παρατηρείται η ελάχιστη τιμή του δείκτη. Με την περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό, παρατηρείται αύξηση του δείκτη IC₅₀, οπότε και μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης.

Με βάση τα αποτελέσματα, επιλέγεται το εύρος της περιεκτικότητας κατά βάρος σε νερό να είναι 25% w/w – 75% w/w.

Για την επιλογή του εύρους αυτού λήφθηκαν υπόψη βιβλιογραφικές πηγές που υποστηρίζουν τη χρήση NaDES σε συνδυασμό με υψηλά ποσοστά νερού. Σύμφωνα λοιπόν με τη βιβλιογραφία, αξιοποιούνται περιεκτικότητες σε νερό ως και 80% w/w, εάν αυτό βοηθά στην εκχύλιση των ενώσεων-στόχων[24,57,58]. Βέβαια, αξίζει να αναφερθεί πως το πρόσθετο νερό κρίνεται σημαντικός παράγοντας για την ύπαρξη του ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου, που χαρακτηρίζει τα NaDES. Σε κάποιες μελέτες, αναφέρεται πως περιεκτικότητες σε νερό άνω του 50% v/v μπορεί οδηγούν σε καταστροφή του δικτύου αυτού, άρα και καταστροφή του NaDES[37,52,58]. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη NaDES ακόμα και σε μικρότερες ποσότητες, φαίνεται να βοηθάει στην απόδοση της εκχύλισης συγκριτικά με την εκχύλιση που χρησιμοποιείται μόνο νερό ως διαλύτης, καθώς επίσης το NaDES μπορεί μετέπειτα να δρα προστατευτικά για το εκχύλισμα ή ακόμα και να οδηγεί σε εκχύλιση διαφορετικών ενώσεων-στόχων σε σχέση με τη χρήση αποκλειστικά νερού ως διαλύτη.

3.4.1.2 Προσδιορισμός εύρους χρόνου εκχύλισης

Έπειτα, διεξάγονται εκχυλίσεις με την ίδια περιεκτικότητα κατά βάρος σε συνδιαλύτη και την ίδια αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη, μεταβάλλοντας τη διάρκεια της εκχύλισης. Όλα τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία 40 °C

Πίνακας 11: 1^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας τη διάρκεια εκχύλισης.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (% w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC		TFC		IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
				(mg _{γ_{αλλ}} /g _{αγρ.τρ.})	(mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	50 min	90 min		
BON24	60	25	25	59,82	43,38	25,18	15,63		
BON29	180	25	25	63,70	52,25	24,08	13,91		
BON28	360	25	25	69,25	61,78	22,14	13,98		

Παρατηρείται πως με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης δεν υπάρχει μεγάλη αύξηση του περιεχομένου σε συνολικές φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, ούτε και μεγάλη μείωση του δείκτη IC₅₀. Η αύξηση του χρόνου εκχύλισης βοηθά στην

περαιτέρω εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, αλλά μεγάλοι χρόνοι αυξάνουν και το κόστος της διεργασίας. Επομένως, επιλέγεται το εύρος του χρόνου εκχύλισης να κυμαίνεται μεταξύ 30 min και 4 h.

3.4.1.3 Προσδιορισμός εύρους αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη

Στη συνέχεια, διεξάγονται εκχυλίσεις με την ίδια περιεκτικότητα κατά βάρος σε συνδιαλύτη και την ίδια διάρκεια εκχύλισης, μεταβάλλοντας την κατά βάρος αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Όλα τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία 40 °C

Πίνακας 12: 1^η σειρά πειραμάτων: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση, μεταβάλλοντας την κατά βάρος αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (% w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /gδ/τη)	TPC (mg _{γαλλ.} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ.} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ.} /mlδ.)	
						50 min	90 min
BON37	180	25	5	53,16	44,72	74,46	50,04
BON29	180	25	25	63,70	52,25	26,58	13,19
BON32	180	25	75	69,11	53,88	1,40	1,34

Παρατηρείται πως με την αύξηση της κατά βάρος αναλογίας, υπάρχει αύξηση στο ολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, η οποία βέβαια δεν είναι πολύ μεγάλη. Η αναλογία φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο στο δείκτη IC₅₀, όπου για μικρή ποσότητα πρώτης ύλης, ο δείκτης είναι υψηλός, γεγονός που δείχνει πως η αντιοξειδωτική δράση είναι χαμηλή, ενώ όσο αυξάνεται η πρώτη ύλη ανά γραμμάριο διαλύτη, η βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης είναι ραγδαία.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, επιλέγεται το εύρος της αναλογίας κατά βάρος πρώτης ύλης ανά διαλύτη να είναι ίσο με 5 mg_{αγρ.τρ.}/gδ/τη – 75 mg_{αγρ.τρ.}/gδ/τη.

3.4.2 Πρώτη σειρά πειραμάτων - Χρήση συμβατικών διαλυτών εκχύλισης

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκχύλισης χρησιμοποιώντας συμβατικούς διαλύτες, όπως το σύστημα αιθανόλης:νερού 70:30 v/v και ο διαλύτης 100% νερό, που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 °C.

Πίνακας 13: Συμβατικές εκχύλισεις: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Διαλύτης	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /ml _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
						50 min	90 min
BON8	24	Αιθανόλη:νερό (70:30 v/v)	25	40,15	36,33	0,20	0,06
BON40	1	Νερό	25	84,99	72,42	0,04	0,03

Παρατηρούνται σαφώς καλύτερα αποτελέσματα στην εκχύλιση με χρήση νερού ως διαλύτη, αντί του μείγματος αιθανόλης:νερού, γεγονός το οποίο συμφωνεί και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα[7,16], όπως αναφέρθηκαν στις συνήθεις μεθόδους εκχύλισης του άγριου τριαντάφυλλου, στο Θεωρητικό Μέρος (βλ. [Ενότητα 1.2.7](#)).

Σημειώνεται πως τα αποτελέσματα της εκχύλισης με χρήση νερού είναι καλύτερα από εκείνα με χρήση NaDES και συνδιαλύτη, σε όλες τις περιεκτικότητες συνδιαλύτη που δοκιμάστηκαν στις ίδιες συνθήκες (βλ. [Ενότητα 3.4.1.1](#)). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή πολικότητα του νερού, το οποίο μπορεί να διαλυτοποιεί τα πολικά μόρια, δηλαδή μεγάλο μέρος από τις βιοδραστικές ενώσεις του υπανθίου του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου.

Για την εκχύλιση με χρήση νερού, επιλέχθηκε ως χρόνος εκχύλισης η 1 ώρα, καθότι σε βιβλιογραφική αναφορά παρατηρήθηκε ότι μετά τη 1 ώρα παρουσιάστηκε πλατώ[7].

Εφόσον το νερό ως διαλύτης είναι πιο αποτελεσματικό για την εκχύλιση φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων από το υπάνθιο, αυτό θα αποτελέσει και το διαλύτη αναφοράς προς σύγκριση των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από τον πειραματικό σχεδιασμό.

3.4.3 Δεύτερη σειρά πειραμάτων- Πειράματα Πειραματικού σχεδιασμού

Μετά την πραγματοποίηση των προκαταρκτικών πειραμάτων και την επιλογή του κατάλληλου εύρους τιμών των παραμέτρων, λαμβάνουν χώρα τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού.

Για κάθε μια από τις ανεξάρτητες μεταβλητές (παραμέτρους) ορίζονται τρεις τιμές (3³ πειραματικός σχεδιασμός), που χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα -, 0, + σε αύξουσα σειρά, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως.

Πίνακας 14: Αντιστοίχιση μεταβλητών του πειραματικού σχεδιασμού με τις κωδικοποιημένες μορφές.

Ανεξάρτητη μεταβλητή	Μονάδες	Συμβολισμός της μεταβλητής	Κωδικοποιημένη μορφή		
			-	0	+
Χρόνος	min	X ₁	30	135	240
Συνδιαλύτης	% w/w	X ₂	25	50	75
Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη	mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη}	X ₃	5	40	75

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα 17 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού, με επανάληψη 5 φορές του κεντρικού σημείου (0 0 0).

Τα πειράματα πραγματοποιούνται με τυχαία σειρά για να αποφευχθούν οι επιπτώσεις εξωτερικών μεταβλητών[57].

Πίνακας 15: Συνθήκες εκχύλισης πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού και συμβολισμός αυτών κατά Box-Behnken.

Κωδικός πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg αγρ.τρ./g δ/τη)
BON53	--0	30	25	40
BON57	+0	240	25	40
BON54	--0	30	75	40
BON50	++0	240	75	40
BON48	-0-	30	50	5
BON58	+0-	240	50	5
BON49	-0+	30	50	75
BON45	+0+	240	50	75
BON44	0--	135	25	5
BON43	0+-	135	75	5
BON46	0-+	135	25	75
BON59	0++	135	75	75
BON55	000	135	50	40
BON56	000	135	50	40
BON51	000	135	50	40
BON47	000	135	50	40
BON52	000	135	50	40

Μετά την εκτέλεση των πειραμάτων, ακολουθώντας τη συνηθισμένη διαδικασία, έπεται αξιολόγηση των εκχυλισμάτων ως προς τις τρεις προαναφερθείσες αποκρίσεις. Τα γραφήματα για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων του δείκτη IC₅₀ παρατίθενται στο Παράρτημα II.

3.4.3.1 Περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες κάθε εκχύλισης και η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις ανά μονάδα μάζας της πρώτης ύλης.

Πίνακας 16: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ.} /g _{αγρ.τρ.})
BON53	30	25	40	70,70
BON57	240	25	40	81,43
BON54	30	75	40	80,12
BON50	240	75	40	82,50
BON48	30	50	5	57,87
BON58	240	50	5	63,30
BON49	30	50	75	82,22
BON45	240	50	75	90,11
BON44	135	25	5	73,36
BON43	135	75	5	72,68
BON46	135	25	75	83,09
BON59	135	75	75	93,25
BON55	135	50	40	86,99
BON56	135	50	40	83,72
BON51	135	50	40	82,02
BON47	135	50	40	85,39
BON52	135	50	40	79,41

3.4.3.2 Περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες κάθε εκχύλισης και η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε φλαβονοειδείς ενώσεις ανά μονάδα μάζας της πρώτης ύλης.

Πίνακας 17: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς το ολικό περιεχόμενο των φλαβονοειδών ενώσεων.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TFC (mg _{κουτ.} /g _{αγρ.τρ.})
BON53	30	25	40	46,74
BON57	240	25	40	55,46
BON54	30	75	40	57,45
BON50	240	75	40	61,05
BON48	30	50	5	37,09
BON58	240	50	5	43,26
BON49	30	50	75	51,66
BON45	240	50	75	58,70
BON44	135	25	5	44,89
BON43	135	75	5	38,42
BON46	135	25	75	53,41
BON59	135	75	75	56,93
BON55	135	50	40	53,41
BON56	135	50	40	54,40
BON51	135	50	40	50,89
BON47	135	50	40	58,40
BON52	135	50	40	50,32

3.4.3.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων κατά τη

μέθοδο DPPH

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες κάθε εκχύλισης και η αντιοξειδωτική ικανότητα κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH κάθε εκχυλίσματος για τους δύο χρόνους επώασης.

Πίνακας 18: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	IC ₅₀ (mg _{εκχ.} /ml _{δ.})	
				50 min	90 min
BON53	30	25	40	2,39	1,20
BON57	240	25	40	1,84	1,65
BON54	30	75	40	2,61	2,36
BON50	240	75	40	2,52	2,29
BON48	30	50	5	43,36	36,27
BON58	240	50	5	22,97	19,93
BON49	30	50	75	1,46	1,38
BON45	240	50	75	1,12	0,94
BON44	135	25	5	45,77	37,10
BON43	135	75	5	37,43	31,80
BON46	135	25	75	1,37	1,23
BON59	135	75	75	1,14	1,03
BON55	135	50	40	5,68	3,42
BON56	135	50	40	2,39	2,25
BON51	135	50	40	7,20	5,71
BON47	135	50	40	2,14	1,97
BON52	135	50	40	2,01	1,87

3.4.3.4 Συγκριτική μελέτη αποτελεσμάτων

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πειραματικές συνθήκες κάθε εκχύλισης, η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις ανά μονάδα μάζας της πρώτης ύλης, καθώς και η αντιοξειδωτική ικανότητά του κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH για τους δύο χρόνους επώασης.

Πίνακας 19: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /gδ/τη)	TPC (mg _{γλώλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
						50 min	90 min
BON53	30	25	40	70,70	46,74	2,39	1,20
BON57	240	25	40	81,43	55,46	1,84	1,65
BON54	30	75	40	80,12	57,45	2,61	2,37
BON50	240	75	40	82,50	61,05	2,52	2,29
BON48	30	50	5	57,87	37,09	43,36	36,27
BON58	240	50	5	63,30	43,26	22,97	19,93
BON49	30	50	75	82,22	51,66	1,46	1,38
BON45	240	50	75	90,11	58,70	1,12	0,94
BON44	135	25	5	73,36	44,89	45,77	37,10
BON43	135	75	5	72,68	38,42	37,43	31,80
BON46	135	25	75	83,09	53,41	1,37	1,23
BON59	135	75	75	93,25	56,93	1,14	1,03
BON55	135	50	40	86,99	53,41	5,68	3,42
BON56	135	50	40	83,72	54,40	2,39	2,25
BON51	135	50	40	82,02	50,89	7,20	5,71
BON47	135	50	40	85,39	58,40	2,14	1,97
BON52	135	50	40	79,41	50,32	2,01	1,87

✓ Παράμετρος του χρόνου εκχύλισης

Συγκρίνονται τα ζεύγη πειραμάτων BON53-BON57, BON54-BON50, BON48-BON58, BON49-BON45, που έχουν σταθερές τις παραμέτρους της %w/w περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη και της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, ενώ κάθε φορά μεταβάλλεται ο χρόνος εκχύλισης. Παρατηρείται πως για όλα τα προαναφερθέντα ζεύγη, με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, σημειώνεται αύξηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και για την αντιοξειδωτική δράση κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH των παραπάνω ζευγών, όπου ο υψηλότερος χρόνος εκχύλισης οδηγεί σε τιμές που αντιστοιχούν σε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, η οποία δηλώνεται μέσω του χαμηλότερου δείκτη IC₅₀.

✓ Παράμετρος της % w/w περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη

Συγκρίνονται τα ζεύγη πειραμάτων BON53-BON54, BON50-BON57, BON46-BON59 και BON44-BON43, που έχουν σταθερές τις παραμέτρους του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, ενώ κάθε φορά μεταβάλλεται η % w/w περιεκτικότητα σε συνδιαλύτη. Παρατηρείται ότι στα τρία

πρώτα ζεύγη, με την αύξηση της % w/w περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη, υπάρχει αύξηση και στην περιεκτικότητα σε φαινολικές και σε φλαβονοειδείς ενώσεις. Όσον αφορά στο ζεύγος BON44-BON43, φαίνεται πως με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό υπάρχει ελάχιστη μείωση στο περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων. Βέβαια, στο ζεύγος αυτό έχει χρησιμοποιηθεί μικρή αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη, γεγονός που μπορεί να έχει οδηγήσει στη μη αποτελεσματική εκχύλιση. Όσον αφορά στο δείκτη IC₅₀, φαίνεται πως δεν υπάρχει ξεκάθαρη επιρροή, με τα παραπάνω ζεύγη να μην εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά.

Όσον αφορά την επίδραση της % w/w περιεκτικότητας του διαλύτη σε νερό στην αντιοξειδωτική δράση, είναι σημαντική η παρατήρηση των δύο χρόνων επώασης. Όπως έχει αναφερθεί (βλ. [Ενότητα 2.4.4.3](#)), με την αύξηση του χρόνου επώασης η τιμή IC₅₀ μειώνεται καθώς οι αντιοξειδωτικές ενώσεις έχουν περισσότερο χρόνο ώστε να έρθουν σε επαφή και να αντιδράσουν με την ρίζα του DPPH. Παρατηρώντας τα ζεύγη BON53-BON54 φαίνεται πως στο εκχύλισμα BON53, το οποίο είναι εκχύλισμα που προέκυψε από εκχύλιση με χρήση νερού ως συνδιαλύτη σε μικρότερη αναλογία (25% w/w), ο δείκτης IC₅₀ έχει συνεχή μείωση μέχρι ακόμη και τα 90 min επώασης όπου μειώνεται στο μισό (IC_{50,50min}: 2,39 mg_{εκχ.}/ml_{δ.} και IC_{50,90min}: 1,20 mg_{εκχ.}/ml_{δ.}). Αντιθέτως, το BON54, το οποίο είναι εκχύλισμα που προέκυψε από εκχύλιση με χρήση νερού σε υψηλότερη περιεκτικότητα (75% w/w), ήδη από τα 50 min έχει μικρό δείκτη IC₅₀, ο οποίος δε μεταβάλλεται πολύ με την πάροδο του χρόνου και έως τα 90 min (IC_{50,50min}: 2,61 mg_{εκχ.}/ml_{δ.} και IC_{50,90min}: 2,37 mg_{εκχ.}/ml_{δ.}).

Αυτή η παρατήρηση είναι πιθανή ένδειξη του προστατευτικού χαρακτήρα του NaDES ως προς τις εκχυλιζόμενες ενώσεις όπως έχει αναφερθεί και επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες[42].

Αυτή η τάση δεν παρατηρείται σε όλα τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού παρα μόνο σε αυτά που έχουν διεξαχθεί σε μικρό χρόνο εκχύλισης (30 min). Πιθανώς ο αρκετά μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης, οδηγεί σε εκχυλίσματα με κπερισσότερες βιοδραστικές ενώσεις (αντιοξειδωτικά) και επομένως ο δείκτης IC₅₀ είναι χαμηλός από την μέτρηση από τον πρώτο κι όλας χρόνο επώασης.

✓ Παράμετρος της αναλογίας της μάζας πρώτης ύλης προς τη μάζα του διαλύτη Συγκρίνονται τα ζεύγη πειραμάτων BON58-BON45, BON43-BON59, BON48-BON49 και BON44-BON46, που έχουν σταθερές τις παραμέτρους του χρόνου εκχύλισης και της % w/w περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη, ενώ κάθε φορά μεταβάλλεται η αναλογία μάζας πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Παρατηρείται πως για όλα τα προαναφερθέντα ζεύγη, υπάρχει αύξηση του περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων με την αύξηση της αναλογίας. Επιπλέον, η ίδια συμπεριφορά φαίνεται και στην αντιοξειδωτική δράση κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH, η οποία παρουσιάζει μεγάλη διαφορά με την αύξηση της αναλογίας, εφόσον τα εκχυλίσματα με μικρή αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη έχουν πολύ μεγάλο δείκτη IC₅₀, άρα και μικρή αντιοξειδωτική δράση, έναντι των εκχυλισμάτων με μεγαλύτερη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

3.5 Πειραματικός σχεδιασμός

Μέσω του λογισμικού Design Expert 12 (Stat-Ease, Inc. - Trial Version), προσδιορίστηκαν τα 17 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, έχοντας επιλέξει πέντε επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Τα πειράματα αυτά εκπονήθηκαν και συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα των αποκρίσεων (TPC, TFC και IC₅₀ για χρόνο επώασης 50 min), πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση αυτών και εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση συναρτήσει των τριών παραμέτρων (ανεξάρτητων μεταβλητών).

3.5.1 Προσδιορισμός μοντέλου πρόβλεψης αποκρίσεων

3.5.1.1 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις

Για τη μελέτη της απόκρισης αυτής, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής Reduced Cubic Model, δηλαδή απλοποιημένο κυβικό. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει τους όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C², A²B, A²C και AB², όπου με A, B, C συμβολίζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή ο χρόνος εκχύλισης σε min, η περιεκτικότητα του νερού στο διαλύτη εκχύλισης σε %w/w και η αναλογία μάζας πρώτης ύλης ανά μάζα διαλύτη σε mg/g, αντίστοιχα.

Από τη μορφή αυτή αφαιρούνται οι όροι που δεν είναι σημαντικοί, δηλαδή που έχουν υψηλά p-values και επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το κυβικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι A²B και AB².

Πίνακας 20: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1306,56	10	130,66	22,47	0,0006	significant
A-TIME	87,41	1	87,41	15,04	0,0082	
B-WATER	49,85	1	49,85	8,58	0,0263	
C-S/L	229,53	1	229,53	39,48	0,0008	
AB	17,40	1	17,40	2,99	0,1343	
AC	1,52	1	1,52	0,2613	0,6275	
BC	29,36	1	29,36	5,05	0,0657	
A ²	152,56	1	152,56	26,24	0,0022	
B ²	6,07	1	6,07	1,04	0,3463	
C ²	71,17	1	71,17	12,24	0,0128	
A ² C	54,40	1	54,40	9,36	0,0222	
Residual	34,88	6	5,81			
Lack of Fit	0,1360	2	0,0680	0,0078	0,9922	not significant
Pure Error	34,74	4	8,69			
Cor Total	1341,44	16				

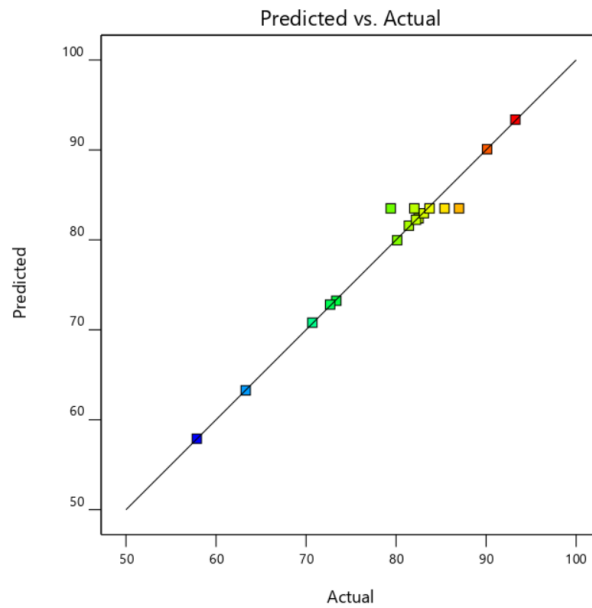
Η F-value του μοντέλου ισούται με 22,47, που υποδηλώνει πως το μοντέλο είναι σημαντικό και υπάρχει πιθανότητα μόλις 0,06% αυτή η τιμή να έχει προκύψει από θόρυβο. Επιπλέον, η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit) έχει τιμή p-value 0,9922, υποδεικνύοντας ότι αυτή δεν είναι σημαντική και σχετική με το καθαρό σφάλμα του μοντέλου, με αποτέλεσμα τη σωστή προσαρμογή του. Παρατηρείται πως οι όροι AB, AC, BC και B² δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, με τους όρους AB, B² να διατηρούνται λόγω της συνεισφοράς στην καλύτερη συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης, ενώ ο όρος AC διατηρείται για την ιεραρχία του μοντέλου.

Στη συνέχεια, στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή R² του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, η οποία τείνει στο 1. Αυτό υποδεικνύει μια καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Η τιμή “Adjusted R²” δεν αποκλίνει περισσότερο από 0,2 μονάδες από την τιμή “Predicted R²”, οπότε η τιμή R² κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή “Adequate precision” σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, ίση με 18,2939, που υποδεικνύει ότι η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Std. Dev.	2,41		R²	0,9740
Mean	79,30		Adjusted R²	0,9307
C.V. %	3,04		Predicted R²	0,9555
			Adeq Precision	18,2939

Το διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως φαίνεται, η συσχέτιση είναι πολύ καλή, καθώς τα σημεία είναι όλα πολύ κοντά στη διαγώνιο, δηλώνοντας πως οι προβλεπόμενες τιμές προσεγγίζουν ικανοποιητικά τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 10: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Έτσι, η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων είναι η εξής:

$$\text{TPC} = 83,51 + 3,31 * A + 2,50 * B + 7,58 * C - 2,09 * AB + 0,6163 * AC + 2,71 * BC - 6,02 * A^2 + 1,20 * B^2 - 4,11 * C^2 + 5,22 * A^2C.$$

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

Η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων είναι η εξής:

$$\text{TPC} = 46,96980 + 0,357893 * \text{time} - 0,108848 * \text{water} + 0,553798 * \text{S/L} - 0,000795 * \text{time} * \text{water} - 0,003482 * \text{time} * \text{S/L} + 0,003096 * \text{water} * \text{S/L} - 0,001087 * \text{time}^2 + 0,001921 * \text{water}^2 - 0,003356 * (\text{S/L})^2 + 0,000014 * \text{time}^2 * \text{S/L}.$$

Η εξίσωση με τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα, με τη διαφορά ότι τα επίπεδα πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν παράγοντα. Αυτή η εξίσωση δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε παράγοντα, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται ώστε να φιλοξενούν τις μονάδες κάθε παράγοντα.

3.5.1.2 Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις

Για αυτή τη μελέτη, επιλέχθηκε πάλι το απλοποιημένο κυβικό μοντέλο, στο οποίο δεν περιλαμβάνονται οι μη σημαντικοί όροι.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν έχουν αφαιρεθεί οι όροι A^2C και AB^2 .

Πίνακας 22: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	758,28	10	75,83	10,60	0,0046	significant
A-TIME	81,37	1	81,37	11,37	0,0150	
B-WATER	2,19	1	2,19	0,3059	0,6002	
C-S/L	406,86	1	406,86	56,87	0,0003	
AB	6,57	1	6,57	0,9183	0,3749	
AC	0,1901	1	0,1901	0,0266	0,8758	
BC	24,95	1	24,95	3,49	0,1111	
A^2	0,9612	1	0,9612	0,1344	0,7265	
B^2	6,20	1	6,20	0,8663	0,3879	
C^2	166,19	1	166,19	23,23	0,0029	
A^2B	46,42	1	46,42	6,49	0,0437	
Residual	42,92	6	7,15			
Lack of Fit	1,22	2	0,6076	0,0583	0,9442	not significant
Pure Error	41,71	4	10,43			
Cor Total	801,21	16				

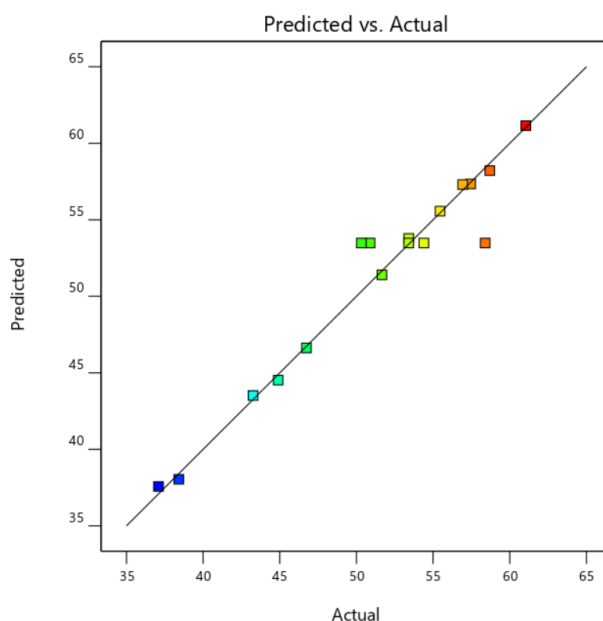
Η F-value του μοντέλου ισούται με 10,60, δηλαδή το μοντέλο είναι σημαντικό και υπάρχει πιθανότητα μόλις 0,46% αυτή η τιμή να έχει προκύψει από θόρυβο. Ακόμη, η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit) έχει τιμή p-value 0,9442, επομένως δεν είναι σημαντική και σχετική με το καθαρό σφάλμα του μοντέλου, με αποτέλεσμα τη σωστή προσαρμογή του. Παρατηρείται πως οι όροι B, AB, AC, BC, A^2 και B^2 δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, με τους όρους A^2 και AB να διατηρούνται για την ιεραρχία του μοντέλου, ενώ οι υπόλοιποι όροι διατηρούνται λόγω της συνεισφοράς τους στην καλύτερη συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Στη συνέχεια, στον πίνακα παρουσιάζεται η τιμή R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, η οποία έχει τιμή κοντά στο 1, καθιστώντας καλή τη συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Η τιμή “Adjusted R^2 ” δεν αποκλίνει περισσότερο από 0,2 μονάδες από την τιμή “Predicted R^2 ”, οπότε η τιμή R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή “Adequate precision” είναι πάλι μεγαλύτερη από το 4, ίση με 10,9614 και δηλώνει ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Std. Dev.	2,67	R^2	0,9464
Mean	51,32	Adjusted R^2	0,8571
C.V. %	5,21	Predicted R^2	0,8580
		Adeq Precision	10,9614

Το διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζει τη συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο και των πραγματικών τιμών που προέκυψαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως φαίνεται, η συσχέτιση είναι πολύ καλή καθώς τα σημεία είναι όλα πολύ κοντά στη διαγώνιο, δηλαδή οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές δεν αποκλίνουν σημαντικά από τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 11: : Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Έτσι, η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών ενώσεων είναι η εξής:

$$TFC = 53,48 + 3,19 * A - 0,7396 * B + 7,13 * C - 1,28 * AB + 0,2180 * AC + 2,50 * BC + 0,4778 * A^2 + 1,21 * B^2 - 6,28 * C^2 + 4,82 * A^2B,$$

ενώ η πραγματική εξίσωση είναι η:

$$TFC = 26,95342 + 0,276670 * time + 0,046581 * water + 0,463321 * S/L - 0,005207 * time * water + 0,000059 * time * S/L + 0,002854 * water * S/L - 0,000831 * time^2 + 0,001941 * water^2 - 0,005129 * (S/L)^2 + 0,000017 * time^2 * S/L.$$

3.5.1.3 Αντιοξειδωτική δράση κατά τη μέθοδο DPPH (χρόνος επώασης 50 min)

Σε αυτήν την περίπτωση, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής Reduced Quadratic Model, δηλαδή απλοποιημένο τετραγωνικό. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει τους όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B² και C² όπου με A, B, C συμβολίζονται οι ανεξάρτητες μεταβλητές, όπως έχει γίνει λόγος παραπάνω.

Από το μοντέλο αφαιρούνται οι όροι με υψηλά p-values που μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου, οπότε στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, όταν από το τετραγωνικό μοντέλο έχει αφαιρεθεί ο όρος B².

Πίνακας 24: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Quadratic Model που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	63,05	8	7,88	20,57	0,0001	significant
A-TIME	0,8629	1	0,8629	2,25	0,1719	
B-WATER	0,1398	1	0,1398	0,3648	0,5626	
C-S/L	49,10	1	49,10	128,11	< 0,0001	
AB	0,0143	1	0,0143	0,0373	0,8516	
AC	0,7761	1	0,7761	2,03	0,1925	
BC	0,3042	1	0,3042	0,7936	0,3990	
A ²	0,7243	1	0,7243	1,89	0,2065	
C ²	11,42	1	11,42	29,79	0,0006	
Residual	3,07	8	0,3832			
Lack of Fit	1,36	4	0,3405	0,7996	0,5832	not significant
Pure Error	1,70	4	0,4259			
Cor Total	66,12	16				

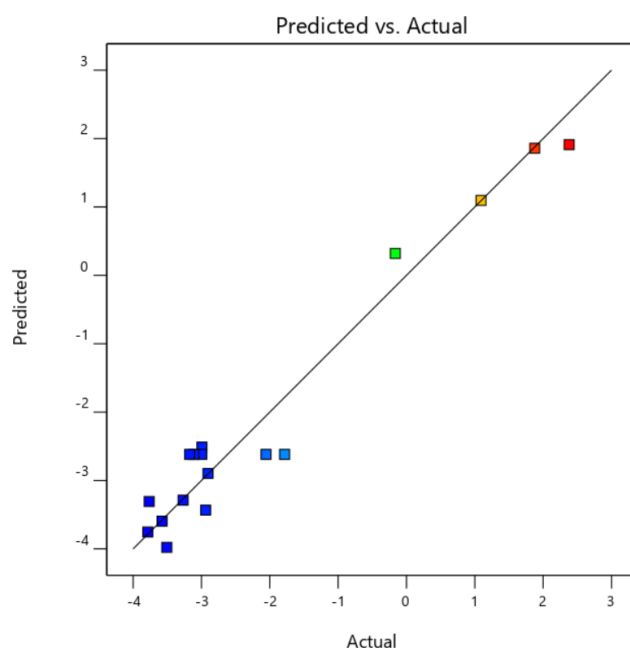
Η F-value του μοντέλου είναι ίση με 20,57, καθιστώντας το μοντέλο είναι σημαντικό, ενώ η πιθανότητα αυτή η τιμή να έχει προκύψει από θόρυβο είναι μόλις 0,01%. Η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit) έχει τιμή p-value 0,5832, άρα δεν είναι σημαντική και σχετική με το καθαρό σφάλμα του μοντέλου. Παρατηρείται πως οι πιο σημαντικοί όροι είναι οι C και C², ενώ όλοι οι υπόλοιποι δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, αλλά διατηρούνται λόγω της συνεισφοράς τους στην καλύτερη συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζεται η τιμή R² του μοντέλου που περιγράφει την αντιοξειδωτική δράση για χρόνο επώασης 50 min, η οποία είναι πολύ κοντά στη μονάδα. Αυτό εκφράζει μια καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Η τιμή “Adjusted R²” δεν αποκλίνει περισσότερο από 0,2 μονάδες από την τιμή “Predicted R²”, οπότε η τιμή R² κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή “Adequate precision”, που σχετίζεται με το λόγο του σήματος προς το θόρυβο, είναι πάλι μεγαλύτερη από το 4, ίση με 13,0738, δηλαδή ικανοποιητική και το μοντέλο δύναται να χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.

Std. Dev.	0,6191	R²	0,9536
Mean	-2,04	Adjusted R²	0,9073
C.V. %	30,36	Predicted R²	0,7571
		Adeq Precision	13,0738

Όπως φαίνεται από το ακόλουθο διάγραμμα συσχέτισης προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών, στο οποίο τα σημεία βρίσκονται κοντά στη διαγώνιο. Οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές είναι κοντά στις αντίστοιχες πειραματικές.



Διάγραμμα 12: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min.

Έτσι, η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH για χρόνο επώασης 50 min είναι η:

$$\ln \left(\frac{IC_{50} - 0,05}{50 - IC_{50}} \right) = -2,62 - 0,3284 * A - 0,1322 * B - 2,48 * C + 0,0598 * AB + 0,4405 * AC + 0,2757 * BC - 0,4142 * A^2 + 1,64 * C^2,$$

ενώ η πραγματική εξίσωση της απόκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 min είναι η:

$$\ln \left(\frac{IC_{50} - 0,05}{50 - IC_{50}} \right)$$

$$= 3,79401 + 0,001082 * \text{time} - 0,020969 * \text{water} - 0,210100$$

$$* S/L + 0,000023 * \text{time} * \text{water} + 0,000120 * \text{time} * S/L$$

$$+ 0,000315 * \text{water} * S/L - 0,000038 * \text{time}^2 + 0,001342$$

$$* (S/L)^2.$$

3.6 Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με τη βοήθεια του λογισμικού Design-Expert 12, δηλαδή εύρεση των τιμών εκείνων των πειραματικών συνθηκών που επιτυγχάνουν:

- ✓ τη μεγιστοποίηση μόνο του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις,
- ✓ τη μεγιστοποίηση μόνο του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις,
- ✓ την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις.

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα τρία σενάρια που προαναφέρθηκαν.

- ✓ **Μεγιστοποίηση μόνο του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων**

Οι μεταβλητές για τη βελτιστοποίηση καθώς και οι τιμές των αποκρίσεων που προέκυψαν από το λογισμικό παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 26: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις.

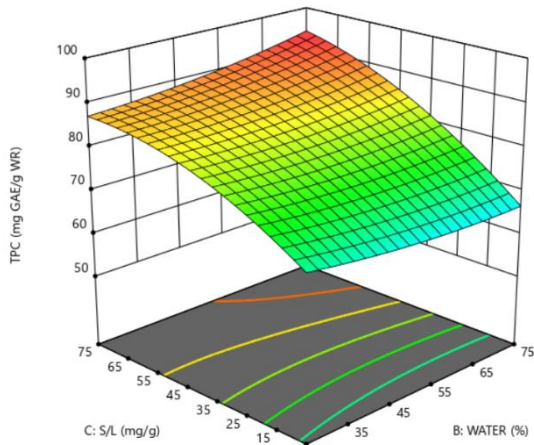
Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γωλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.}) (50 min)
217	73,5	71,1	93,30	62,07	1,37

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης, συναρτήσεως δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, ενώ η τρίτη έχει λάβει τη βέλτιστη τιμή της.

57,868 93,2481

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 216

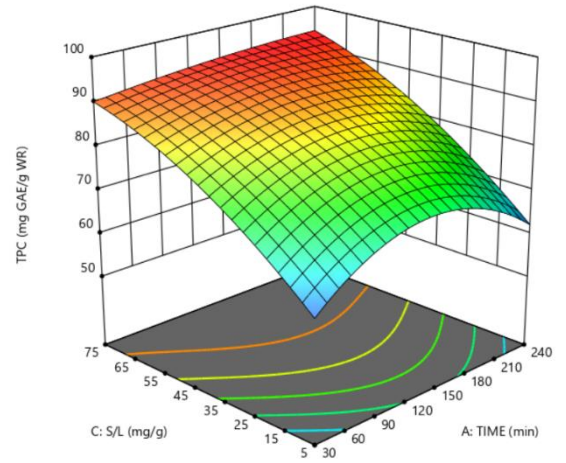


A

57,868 93,2481

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 73,5

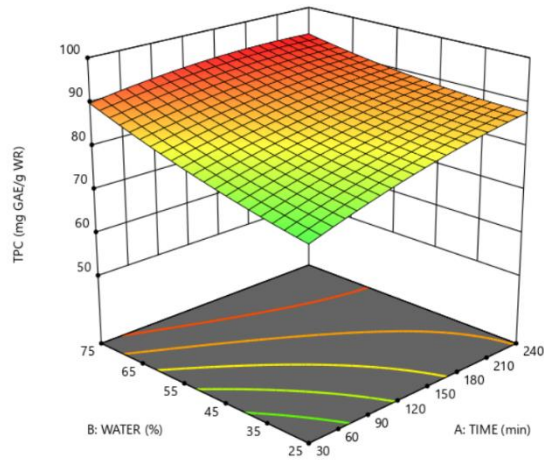


B

57,868 93,2481

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

Actual Factor
C: S/L = 71,1



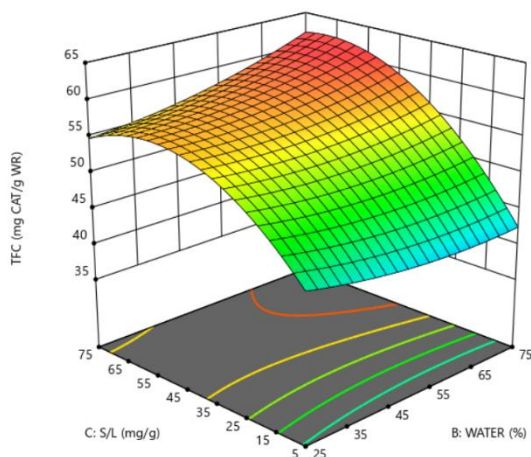
C

Διάγραμμα 13: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

37,0895 61,0471

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 216

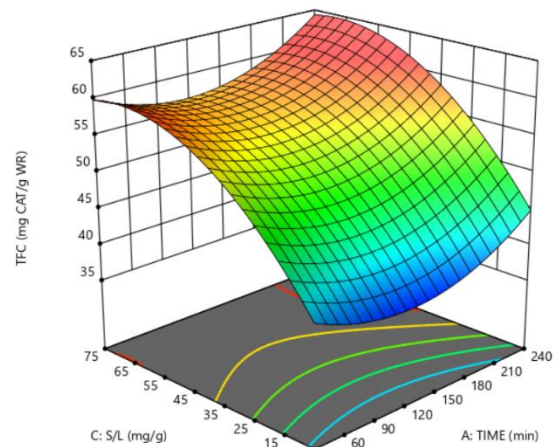


A

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 73,5

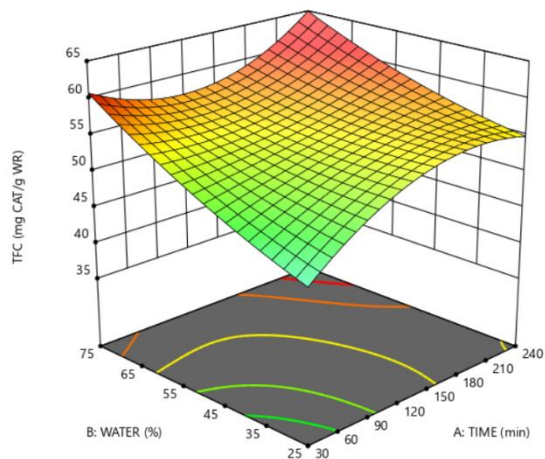


B

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

Actual Factor
C: S/L = 71,1



C

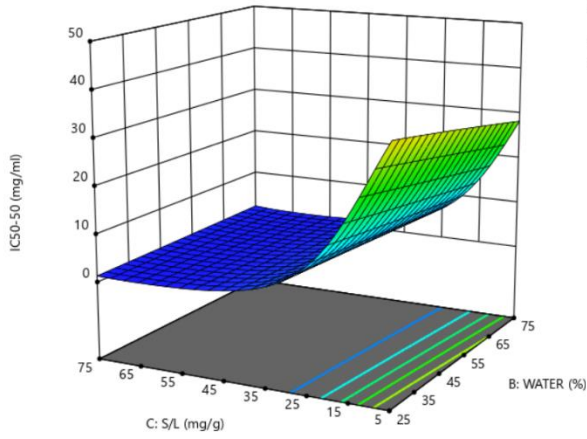
Διάγραμμα 14: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

1,11556 45,7686

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 216

A

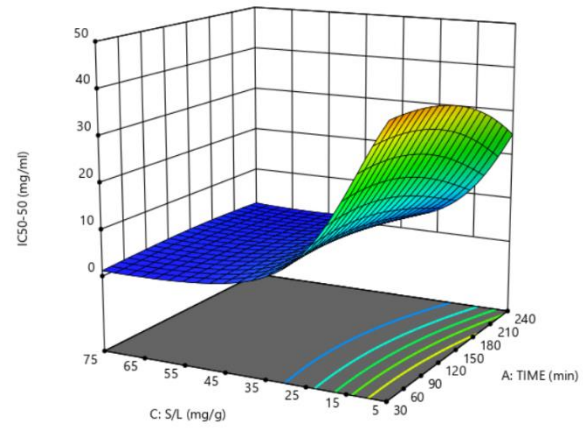


1,11556 45,7686

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 73,5

B

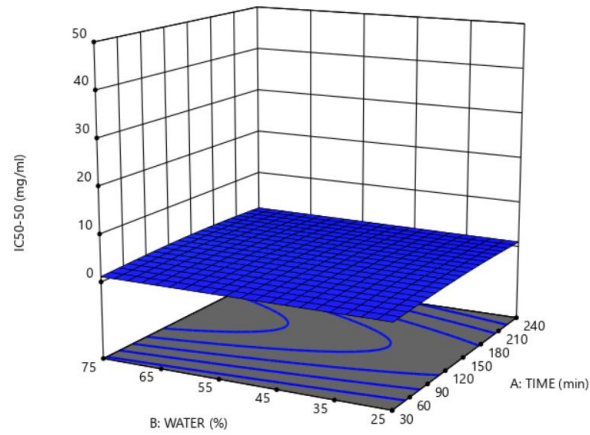


1,11556 45,7686

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

Actual Factor
C: S/L = 71,1

C



Διάγραμμα 15: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

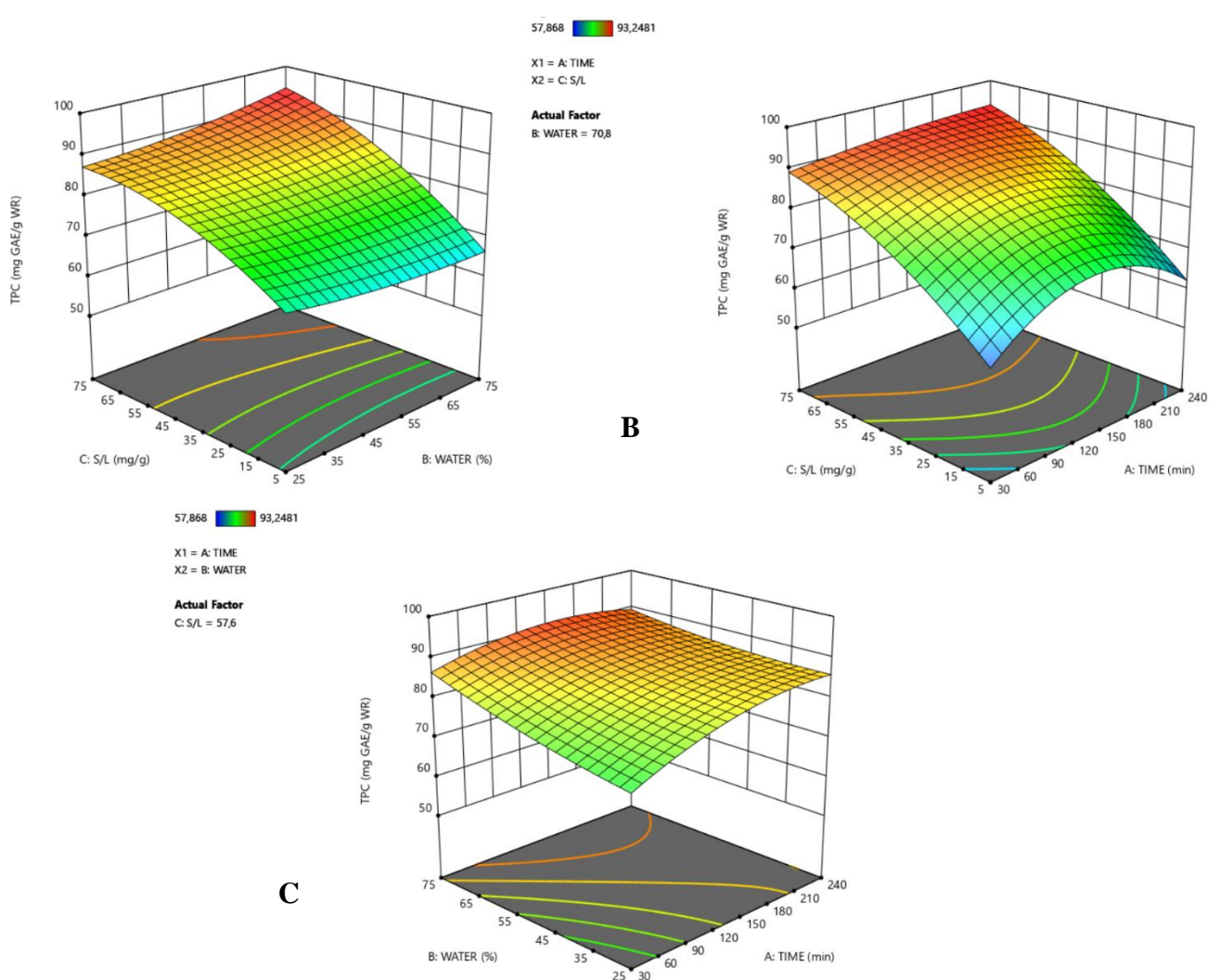
✓ **Μεγιστοποίηση μόνο του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων**

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές για τη βελτιστοποίηση καθώς και οι τιμές των αποκρίσεων που προέκυψαν από το λογισμικό παρουσιάζονται στον πίνακα.

Πίνακας 27: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φλαβονοειδείς ενώσεις.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /gδ/τη)	TPC (mg _{γωλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.}) (50 min)
217	70,8	57,6	89,74	61,21	1,17

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης, συναρτήσε δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, ενώ η τρίτη έχει λάβει τη βέλτιστη τιμή της.

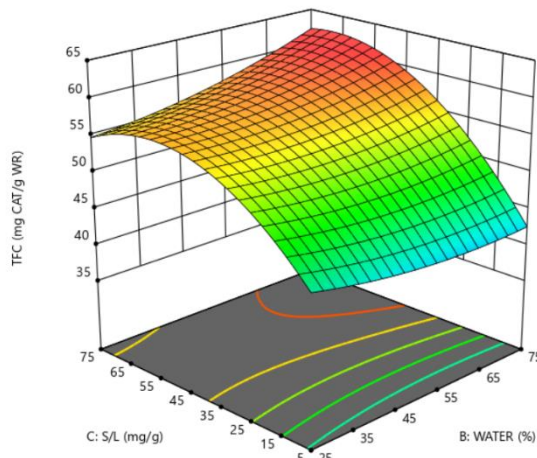


Διάγραμμα 16: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

37,0895 61,0471

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 217

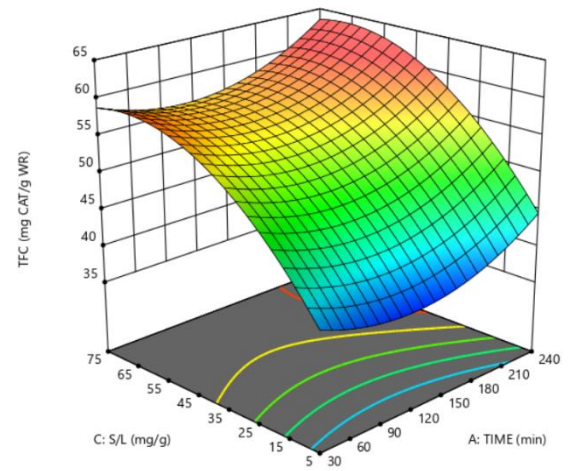


A

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 70,8

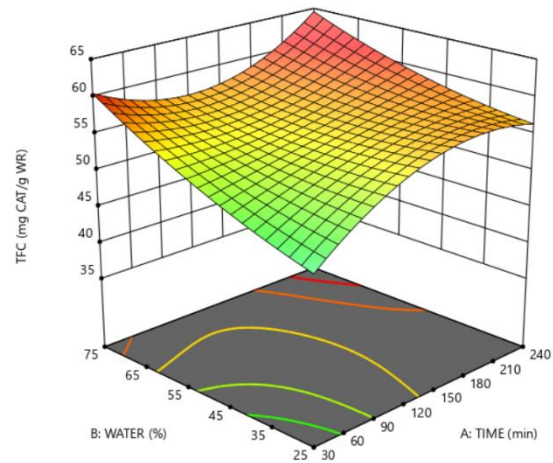


B

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

Actual Factor
C: S/L = 57,6



C

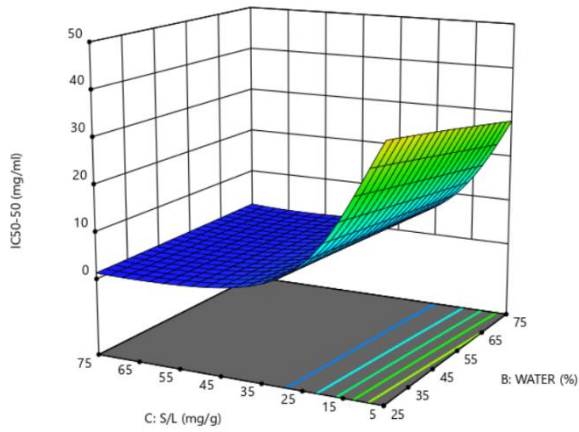
Διάγραμμα 17: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

1,11556 45,7686

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 217

A

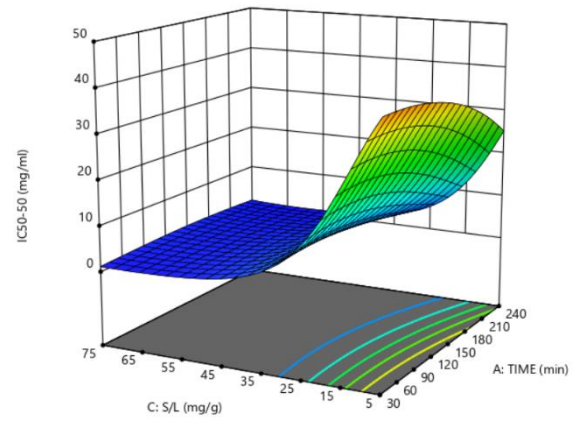


1,11556 45,7686

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 70,8

B

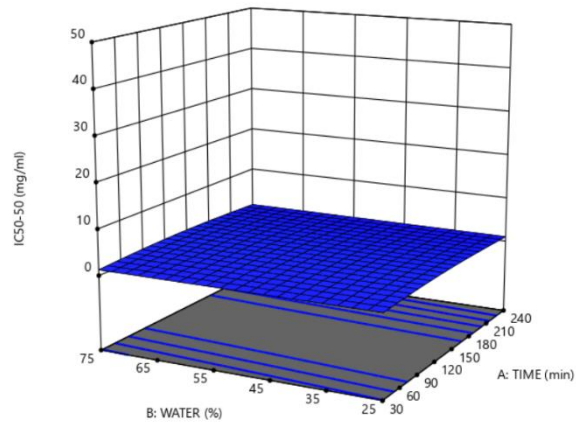


1,11556 45,7686

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

Actual Factor
C: S/L = 57,6

C



Διάγραμμα 18: Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

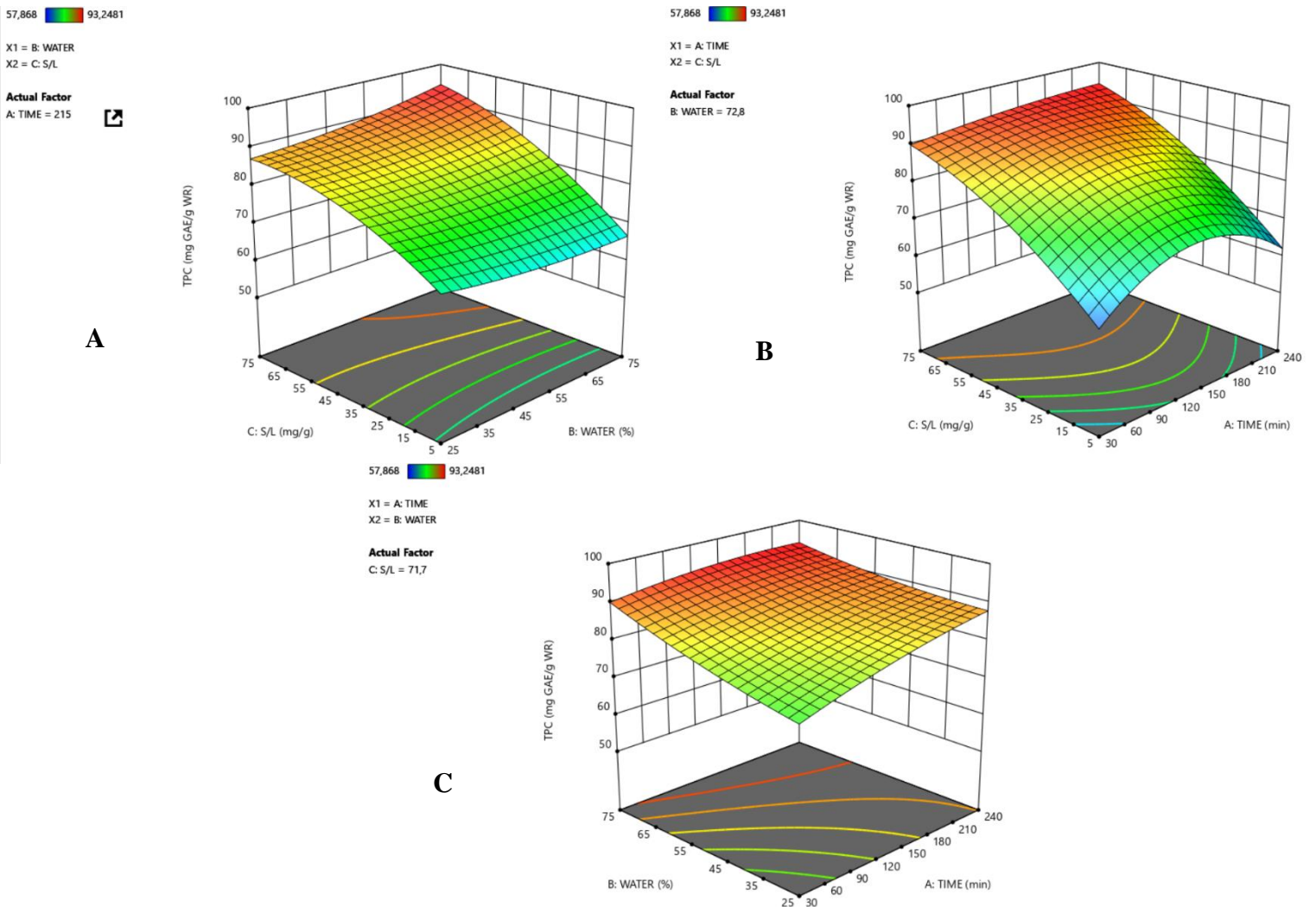
✓ Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις

Οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων για τη βελτιστοποίηση καθώς και οι προκύπτουσες τιμές των αποκρίσεων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 28: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του περιεχομένου του εκχυλίσματος σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.}) (50 min)
215	72,8	71,7	93,27	61,79	1,40

Ακολουθως, δίνονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης, συναρτήσεϊ δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών κάθε φορά, ενώ η τρίτη έχει λάβει τη βέλτιστη τιμή της, όπως βρέθηκε προηγουμένως.

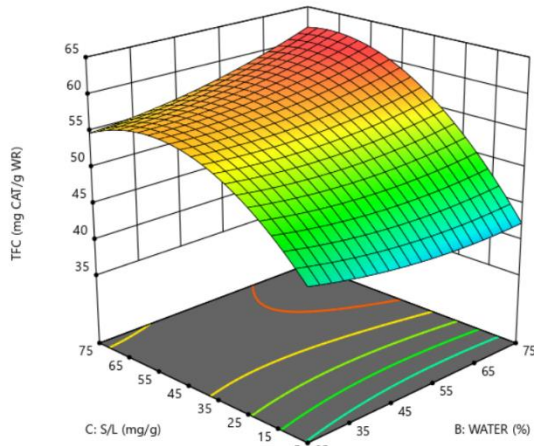


Διάγραμμα 19: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φαινολικών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

37,0895 61,0471

X1 = B: WATER
X2 = C: S/L

Actual Factor
A: TIME = 215

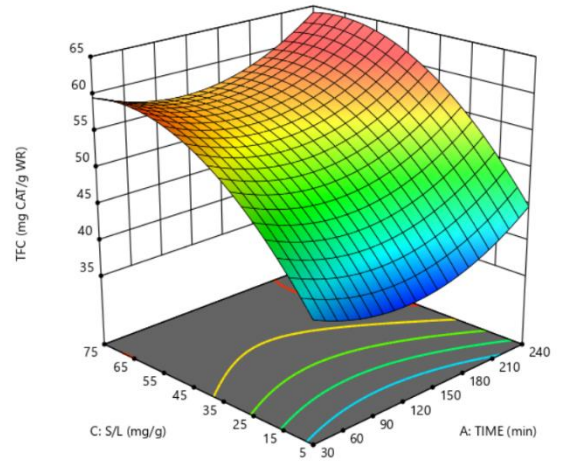


A

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = C: S/L

Actual Factor
B: WATER = 72,8

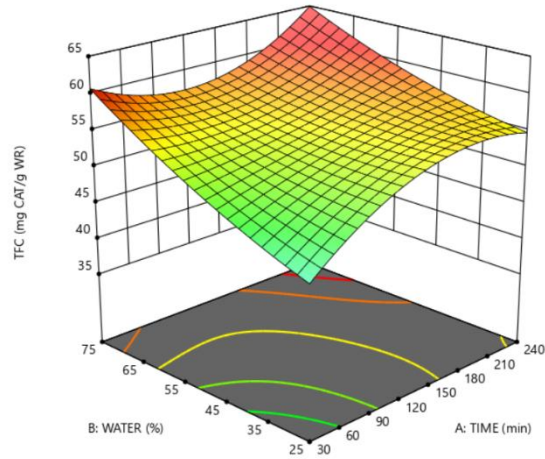


B

37,0895 61,0471

X1 = A: TIME
X2 = B: WATER

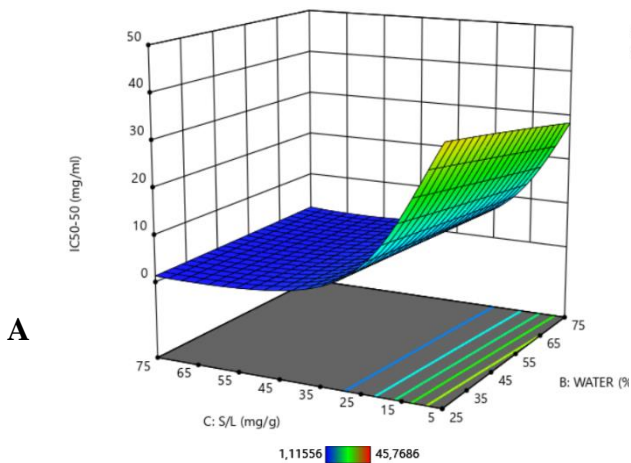
Actual Factor
C: S/L = 71,7



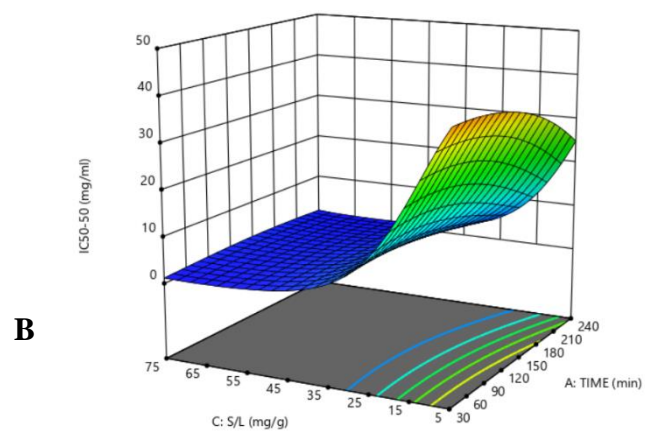
C

Διάγραμμα 20: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης φλαβονοειδών ενώσεων (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

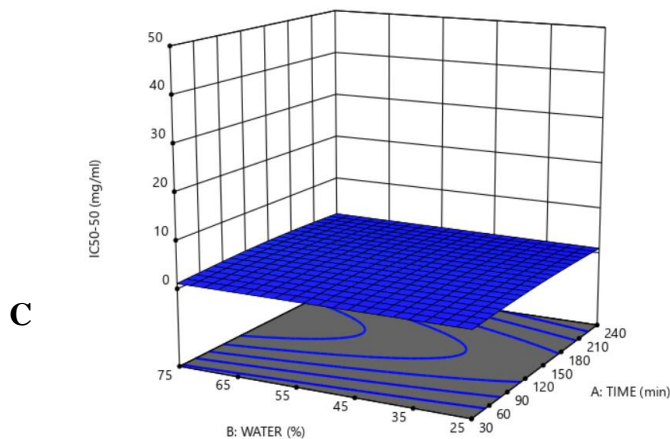
1,11556 45,7686
 X1 = B: WATER
 X2 = C: S/L
 Actual Factor
 A: TIME = 215



1,11556 45,7686
 X1 = A: TIME
 X2 = C: S/L
 Actual Factor
 B: WATER = 72,8



1,11556 45,7686
 X1 = A: TIME
 X2 = B: WATER
 Actual Factor
 C: S/L = 71,7



Διάγραμμα 21: Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων - 3D Γραφήματα απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης για χρόνο επώασης 50 λεπτά (A) για βέλτιστο χρόνο, (B) για βέλτιστη περιεκτικότητα σε νερό, (C) για βέλτιστη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

Από την παρατήρηση των παραπάνω τρισδιάστατων γραφημάτων για την απόκριση των ολικών φαινολικών ενώσεων (Διάγραμμα 19), σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης και της βελτιστοποίησης, γίνεται αντιληπτό ότι και οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές είναι σημαντικές για τον καθορισμό του συνολικού φορτίου των φαινολικών ενώσεων. Η αύξηση της αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη συνεπάγεται σημαντική αύξηση του ολικού φαινολικού φορτίου, ενώ από την άλλη η αύξηση της περιεκτικότητας σε συνδιαλύτη (νερό) δεν επιφέρει τόσο ραγδαία αύξηση στις φαινολικές ενώσεις (Διάγραμμα 19A). Ο χρόνος φαίνεται να επιδρά στο TPC με μια μορφή τύπου «καμπάνα», όταν η αναλογία πρώτης ύλης-διαλύτη είναι χαμηλή (Διάγραμμα 19B) και επομένως το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις είναι χαμηλό, ενώ η αύξησή του δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα TPC όταν οι άλλες δύο παράμετροι έχουν υψηλές τιμές (άρα και τα TPC είναι υψηλά). Με λίγα λόγια, ο πιο καθοριστικός παράγοντας για το TPC είναι η αναλογία πρώτης ύλης-διαλύτη, όπως επιβεβαιώνεται από το ελάχιστο p-value της (ίσο με 0,0008) αλλά και από το συντελεστή της (ίσο με 7,58), ο οποίος είναι ο υψηλότερος από τους υπόλοιπους συντελεστές των παραμέτρων στην εξίσωση της απόκρισης που μελετάται.

Παρατηρώντας τα διαγράμματα των επιφανειών απόκρισης για τα ολικά φλαβονοειδή (Διάγραμμα 20), διαπιστώνεται ότι καθοριστική είναι η επίδραση της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, και πιο συγκεκριμένα η αύξηση των ολικών φλαβονοειδών με την αύξηση της αναλογίας αυτής. Η κατά βάρος περιεκτικότητα του διαλύτη εκχύλισης σε νερό προκαλεί μια αύξηση στην τιμή της απόκρισης όταν αυξάνεται η ίδια, αλλά όχι τόσο απότομη (Διάγραμμα 19Α). Όπως φαίνεται από την ANOVA, δεν είναι τόσο σημαντικός παράγοντας για το περιεχόμενο των ολικών φλαβονοειδών, αν ληφθούν υπόψη οι υψηλές τιμές p των όρων του μοντέλου όπου περιέχεται αυτός ο παράγοντας (με εξαίρεση τον A^2B που έχει p -value 0,04). Παρατηρείται πάλι πως ο πιο καθοριστικός παράγοντας είναι η αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη έχοντας χαμηλό p -value (0,0003) και υψηλό συντελεστή στην κωδικοποιημένη εξίσωση (7,13).

Για την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH για χρόνο επώασης 50 λεπτά, από τα παραπάνω τρισδιάστατα γραφήματα (Διάγραμμα 21) και από τα αποτελέσματα της ANOVA, είναι προφανές πως κύριο ρόλο παίζει η κατά βάρος αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Στόχος για μέγιστη αντιοξειδωτική δράση είναι η ελαχιστοποίηση του δείκτη IC_{50} , όπως έχει αναφερθεί. Σε όλα τα γραφήματα φαίνεται πως υψηλή αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη οδηγεί σε υψηλή αντιοξειδωτική δράση, η οποία δεν εξαρτάται από το χρόνο εκχύλισης ή από την κατά βάρος περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό. Η σημαντικότητα της παραμέτρου επιβεβαιώνεται και από το χαμηλό p -value της ($<0,0001$) και από τον υψηλό συντελεστή της (2,48) στην εξίσωση της απόκρισης. Με τη χρήση υψηλής αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, εκχυλίζονται περισσότερες βιοδραστικές (άρα και αντιοξειδωτικές) ενώσεις για ορισμένη μάζα διαλύτη εκχύλισης, με αποτέλεσμα την υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Με άλλα λόγια, το αποτέλεσμα της μελέτης της απόκρισης αυτής έρχεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα για τις ολικές φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις.

Σε όλες δηλαδή τις προαναφερθείσες αποκρίσεις ως σημαντικότερη παράμετρος εμφανίζεται η αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη.

3.7 Επιβεβαίωση μοντέλου

Με στόχο την επιβεβαίωση του μοντέλου που προέκυψε, πραγματοποιείται ένα πείραμα ελέγχου, το οποίο βρίσκεται εντός του εύρους των ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί. Έτσι, προσδιορίζεται το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών ενώσεων και η αντιοξειδωτική δράση σε χρόνο επώασης 50 min, σε εκχύλιση στους 40°C υπό ανάδευση για 178 min, με 75,0% w/w συνδιαλύτη νερό και αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη ίση με 66,0 mg/g.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και οι πειραματικές τιμές όλων των αποκρίσεων βρίσκονται εντός του εύρους που προβλέπεται κάθε φορά από το αντίστοιχο μοντέλο, αλλά και κοντά στις προβλεπόμενες τιμές, γεγονός που αποδεικνύει την εγκυρότητα του μοντέλου.

Πίνακας 29: Πειραματικές συνθήκες και πειραματικές τιμές των αποκρίσεων για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Περιεκτικότητα διαλύτη εκχύλισης σε νερό (%w/w)	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.}) (50 min)
BON62	178	75	66,0	93,54	60,61	1,60

Πίνακας 30: Πειραματικές τιμές ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών ενώσεων και αντιοξειδωτικής δράσης επώασης 50 για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean†	95% PI high
	TPC	92,8972	92,8972		2,4111	1	3,05003	85,4341	93,538	100,36
	TFC	59,3767	59,3767		2,67472	1	3,40963	51,0337	60,614	67,7198
	IC50-50‡	1,68764	1,43646		0,9312	1	N/A	0,260151	1,594	7,24637

Επιπλέον, για τις προσδιοριζόμενες τιμές χρόνου και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης ανά διαλύτη, που προέκυψαν από το μοντέλο για εκχύλιση με χρήση διαλύτη το NaDES Bet:Gly:W, πραγματοποιείται και μία συμβατική εκχύλιση στους 40 °C με χρήση αποκλειστικά νερού ως διαλύτη για συγκριτικούς λόγους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 31: Συμβατική εκχύλιση με χρήση νερού: Αξιολόγηση εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική τους δράση.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Διαλύτης	Αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη (mg _{αγρ.τρ.} /g _{δ/τη})	TPC (mg _{γαλλ} /g _{αγρ.τρ.})	TFC (mg _{κατ} /g _{αγρ.τρ.})	IC ₅₀ (mg _{εκχ} /ml _{δ.})	
						50 min	90 min
BON63	178	Νερό	66,0	72,98	46,36	0,07	0,06

Τα αποτελέσματα του τελευταίου αυτού πειράματος επιβεβαίωσης είναι καλύτερα όσον αφορά στο ολικό περιεχόμενο των φαινολικών (TPC=93,54 mg_{γαλλ}/g_{αγρ.τρ.}) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC=60,61 mg_{κατ}/g_{αγρ.τρ.}) συγκριτικά με το αντίστοιχο πείραμα με χρήση αποκλειστικά νερού ως διαλύτη (TPC=72,98 mg_{γαλλ}/g_{αγρ.τρ.} και TFC=46,36 mg_{κατ}/g_{αγρ.τρ.}).

Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κατά την αναστολή της ρίζας DPPH, για την περίπτωση του NaDES, το εκχύλισμα προτείνεται να χρησιμοποιηθεί ως έχει, χωρίς απομάκρυνση του διαλύτη, όντας ένα ενισχυμένο εκχύλισμα που περιλαμβάνει και αυτόν (IC₅₀=1,60 mg_{εκχ}/ml_{δ.}), ενώ στην περίπτωση του νερού αξιοποιείται το ξηρό εκχύλισμα (IC₅₀=0,07 mg_{εκχ}/ml_{δ.}). Επομένως, η σύγκριση δεν είναι δυνατή παρά μόνο με τη χρήση μιας ένωσης αναφοράς (π.χ. έκφραση σε ισοδύναμα Trolox [8,19,23]).

Για μια πρώτη σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών τιμών του IC₅₀, μπορεί να γίνει αναγωγή των τιμών τους στον όγκο του υγρού εκχυλίσματος ώστε οι τιμές του δείκτη να μετατραπούν σε μονάδες ml_{εκχ}/ml_{δ.}. Η τιμή που προκύπτει για το εκχύλισμα με

χρήση NaDES ως διαλύτη ισούται με 1,53 $\mu\text{l}_{\text{εκχ.}}/\text{ml}_{\text{δ.}}$, ενώ για το εκχύλισμα με χρήση αποκλειστικά νερού, ο δείκτης ισούται με 2,70 $\mu\text{l}_{\text{εκχ.}}/\text{ml}_{\text{δ.}}$. Επομένως, παρατηρείται πως ο δείκτης για το εκχύλισμα με χρήση NaDES είναι χαμηλότερος, επομένως αυτό το εκχύλισμα έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη σε εργαστηριακή κλίμακα και η βελτιστοποίηση μιας διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ουσιών από το υπάνθιο άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.) με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES).

Έλαβε χώρα η σύνθεση τριών διαλυτών NaDES, συγκεκριμένα των Βεταΐνη:Γλυκερόλη 1:3, Βεταΐνη:Γαλακτικό οξύ:Νερό* 1:2:2,5 και Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό 1:3:1, τα οποία αξιοποιήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα για τις ενώσεις-στόχους του υπάνθιου του *R.canina* και, έπειτα από διερεύνηση, επιλέχθηκε ως καταλληλότερο το Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό 1:3:1 για την περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Το NaDES αυτό χαρακτηρίστηκε δομικά με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR-ATR).

Σημειώνεται πως, αν και το NaDES Bet:La:W* να είχε καλύτερα αποτελέσματα στις αποκρίσεις που μελετώνται, παρόλα αυτά επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάπτυξη και βελτιστοποίηση το NaDES Bet:Gly:W λόγω της ευρείας χρήσης της γλυκερόλης στα καλλυντικά προϊόντα, καθώς και του υψηλότερου pH του, σε αντίθεση με το όξινο pH του Bet:La:W*, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα αστάθειας. Δεσμευτικός παράγοντας για τη διαχείριση του Bet:Gly:W μπορεί να είναι το υψηλό ιξώδες του, ωστόσο αυτό διορθώνεται εύκολα με την αυξημένη θερμοκρασία της εκχύλισης, καθώς και με την προσθήκη νερού ως συνδιαλύτη, που τελικά είναι κρίσιμη παράμετρος για τον εκχυλιστικό ρόλο του NaDES. Επιπλέον, μπορεί να θεωρηθεί ότι το τελικά χρησιμοποιηθέν NaDES δύναται να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών χωρίς να είναι επικίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, λόγω της φυσικής προέλευσης των συστατικών του. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη φυτική πρώτη ύλη, καθιστά τα τελικά προϊόντα (εκχυλίσματα) δυνητικά μη τοξικά και βιοσυμβατά. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το ότι το NaDES, που δεν απομακρύνεται από το εκχύλισμα, μπορεί να λειτουργήσει ως αποθηκευτικό και προστατευτικό μέσο για τις εκχυλισθείσες βιοδραστικές ουσίες, έναντι της οξειδωτικής φθοράς.

Η διεργασία βελτιστοποιήθηκε με πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken, με ανεξάρτητες μεταβλητές το χρόνο εκχύλισης, την κατά βάρος περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό και την κατά βάρος αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Ο παράγοντας της θερμοκρασίας δε μελετήθηκε, ενώ οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 °C, η οποία βρίσκεται στο εύρος που εφαρμόζεται συνήθως για εκχυλίσεις βιοενεργών συστατικών, με στόχο τη βελτίωση της διεργασίας εκχύλισης (π.χ. βελτίωση ιξώδους), την προστασία των βιολογικά ενεργών ουσιών, ώστε να μην αποσυντεθούν καθώς και για τη διατήρηση του πράσινου χαρακτήρα της διεργασίας. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση κατά της ελεύθερης ρίζας DPPH, μεγέθη που χρησιμοποιήθηκαν ως αποκρίσεις. Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εξήχθησαν τα ακόλουθα μαθηματικά μοντέλα για την απόκριση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις, του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις και της αντιοξειδωτικής τους δράσης, αντίστοιχα:

$$\text{TPC} = 46,96980 + 0,357893 * \text{time} - 0,108848 * \text{water} + 0,553798 * \text{S/L} - 0,000795 * \text{time} * \text{water} - 0,003482 * \text{time} * \text{S/L} + 0,003096 * \text{water} * \text{S/L} - 0,001087 * \text{time}^2 + 0,001921 * \text{water}^2 - 0,003356 * (\text{S/L})^2 + 0,000014 * \text{time}^2 * \text{S/L},$$

$$\text{TFC} = 26,95342 + 0,276670 * \text{time} + 0,046581 * \text{water} + 0,463321 * \text{S/L} - 0,005207 * \text{time} * \text{water} + 0,000059 * \text{time} * \text{S/L} + 0,002854 * \text{water} * \text{S/L} - 0,000831 * \text{time}^2 + 0,001941 * \text{water}^2 - 0,005129 * (\text{S/L})^2 + 0,000017 * \text{time}^2 * \text{S/L},$$

$$\ln \left(\frac{\text{IC}_{50} - 0,05}{50 - \text{IC}_{50}} \right) = 3,79401 + 0,001082 * \text{time} - 0,020969 * \text{water} - 0,210100 * \text{S/L} + 0,000023 * \text{time} * \text{water} + 0,000120 * \text{time} * \text{S/L} + 0,000315 * \text{water} * \text{S/L} - 0,000038 * \text{time}^2 + 0,001342 * (\text{S/L})^2.$$

Με στόχο τη βελτιστοποίηση, πραγματοποιήθηκαν τα εξής: μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις, μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις και ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο αυτών αποκρίσεων. Για τη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, εξήχθη το συμπέρασμα πως χρειάζεται υψηλή περιεκτικότητα του διαλύτη σε νερό (72,8% w/w) καθώς και υψηλή αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη (71,7 mg_{αγρ.τρ}/g_{δ/τη}) και σχετικά υψηλός χρόνος εκχύλισης (215 min). Αυτό γίνεται αντιληπτό και από τα 3D γραφήματα των επιφανειών απόκρισης που έχουν παρουσιαστεί, τονίζοντας τη σημαντικότητα των παραμέτρων αυτών. Η ύπαρξη υψηλής περιεκτικότητας νερού βοηθά στη μείωση του ιξώδους αλλά και την αύξηση της πολικότητας του διαλύτη εκχύλισης, όπως αποδείχθηκε, βοηθώντας στη διαδικασία εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων, που ως επί το πλείστον είναι πολικές. Η αναλογία της πρώτης ύλης ανά διαλύτη είναι επιθυμητό να είναι υψηλή, γιατί συντελεί στην αύξηση των εκχυλιζόμενων ενώσεων-στόχων. Η αναλογία έχει διατηρηθεί σε ένα εύρος-όριο, το οποίο δεν εμποδίζει τη διαδικασία εκχύλισης, διατηρώντας στο σύστημα ικανοποιητική επιφάνεια επαφής δείγματος-διαλύτη για την εκχύλιση. Τέλος, φαίνεται πως μεγαλύτεροι χρόνοι οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα, εκχυλίζοντας περισσότερες ενώσεις-στόχους.

Από την παρατήρηση των πειραματικών συνθηκών που μελετώνται για τις τρεις προαναφερθείσες βελτιστοποιήσεις, υποδεικνύεται πως για τη μεγιστοποίηση αποκλειστικά του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις απαιτείται χαμηλότερη αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη σε σχέση με αυτή που απαιτείται για τη μεγιστοποίηση αποκλειστικά των φαινολικών ενώσεων καθώς και την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση.

Στις αποκρίσεις του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, όλες οι ανεξάρτητες μεταβλητές παίζουν σημαντικό ρόλο, με τη μεγαλύτερη επίδραση εκείνη της αναλογίας πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Η απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά DPPH επηρεάζεται σχεδόν αποκλειστικά από την αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη. Συνολικά, η αναλογία πρώτης ύλης ανά διαλύτη είναι εκείνη που παίζει τον καθοριστικότερο ρόλο για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης που μελετάται.

5 Προτάσεις για το μέλλον

Από την παραπάνω μελέτη φαίνεται πως υπάρχουν ενδιαφέρουσες προοπτικές για την εκχύλιση του άγριου τριαντάφυλλου με τη χρήση φυσικών βαθέως ευθηκτικών διαλυτών. Πέραν του διαλύτη που αξιοποιήθηκε, θα μπορούσε να γίνει χρήση νέων NaDES υπό τις ίδιες συνθήκες που μελετήθηκαν, με στόχο την ανάδειξη νέων ικανών NaDES ως εκχυλιστικών μέσων για τον καρπό του *Rosa canina* L.

Επίσης, είναι ανάγκη να μελετηθεί η δομή του διαλύτη Bet:Gly:W στις διάφορες περιεκτικότητες σε συνδιαλύτη (νερό) που διερευνώνται, με στόχο τον έλεγχο της ύπαρξης NaDES ή υδατικού διαλύματος των επιμέρους συστατικών, και την εύρεση του πώς αυτό βοηθά στην καλύτερη εκχύλιση των ενώσεων-στόχων.

Επιπλέον, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί κάποια μέθοδος χρωματογραφίας, όπως για παράδειγμα υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με σκοπό τον πλήρη χαρακτηρισμό των ενώσεων-στόχων που έχουν εκχυλιστεί (φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων). Κατά αυτόν τον τρόπο, θα μπορεί να γίνει σύγκριση σε διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, αναλόγως τις μεταβλητές που μελετώνται.

Λόγω της μεγάλης εξάρτησης των ενώσεων-στόχων από τις συνθήκες στις οποίες καλλιεργήθηκε το άγριο τριαντάφυλλο, είναι σημαντικό να μελετηθεί το πώς επηρεάζεται το φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων από το χρόνο συγκομιδής, τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν ή ακόμα και τη θερμοκρασία ξήρανσης.

Στην εν λόγω μελέτη, ως πρώτη ύλη αξιοποιήθηκε το υπάνθιο του καρπού, επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να εξετασθεί και η εκχύλιση των σπόρων του καρπού.

Για την ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα της εκχύλισης, υπάρχουν διαθέσιμες τεχνικές υψηλής ενέργειας, όπως η χρήση υπερήχων ή μικροκυμάτων, οι οποίες είναι γνωστό ότι συνδυάζονται αποτελεσματικά με τη χρήση NaDES.

Θα μπορούσε ακόμη να πραγματοποιηθεί μελέτη της τοξικότητας των NaDES και των εκχυλισμάτων, για την περαιτέρω χρήση τους στη βιομηχανία καλλυντικών. Τέλος, αξίζει να αναπτυχθεί μια μεθοδολογία παραγωγής καλλυντικών κρεμών, με ενσωματωμένα τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις με NaDES.

6 Βιβλιογραφία

1. Stéphane, F.F.Y., Jules, B.K.J., Batiha, G.E., Ali, I., & Bruno, L.N. (2021). Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In El-Shemy, H.A. (Ed), *Natural Medicinal Plants*, <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>
2. Mehta, S.K., & Gowder, S.J.T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* <https://doi.org/10.5772/61884>
3. Mármol, I., Sánchez de Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. (2017). Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1137. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061137>
4. Özdemir, N., Pashazadeh, H., Zannou, O., & Koca, I. (2022). Phytochemical content, and antioxidant activity, and volatile compounds associated with the aromatic property, of the vinegar produced from rosehip fruit (*Rosa canina* L.). *LWT - Food and Science Technology*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112716>
5. Selahvarzian, A., Alizadeh, A., Baharvand, P.A., Eldahshan, O.A., & Rasouljan, B. (2018). Medicinal Properties of *Rosa canina* L.. *Herbal Medicines Journal*, 3(2), 77-84. <https://doi.org/10.22087/hmj.v3i2.703>
6. Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., & Ombódi, A. (2018). Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some Rosa Species. *Medicines*, 5(3), 84. <https://doi.org/10.3390/medicines5030084>
7. Angelov, G., Boyadzhieva, S., & Georgieva, S. (2014). Rosehip extraction: Process optimization and antioxidant capacity of extracts. *Central European Journal of Chemistry*, 12(4), 502-508. <http://dx.doi.org/10.2478/s11532-013-0395-0>
8. Paunović, D., Kalušević, A., Petrović, T., Urošević, T., Djinović, D., Nedović, V., & Popović-Djordjević, J. (2018). Assessment of Chemical and Antioxidant Properties of Fresh and Dried Rosehip (*Rosa canina* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 108-113. <https://doi.org/10.15835/nbha47111221>
9. Winther, K., Vinther Hansen, A. S., & Campbell-Tofte J. (2016). Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and antiinflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, 6, 11-23. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S91385>
10. Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, 104(4), 1379-1384, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.053>.
11. MacPhail, V. J., & Kevan P.G. (2009). Review of the Breeding Systems of Wild Roses (*Rosa* spp.). *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 3(1), 1-13.
12. Chrubasik, C., Roufogalis, B.D., Müller-Ladner, U., & Chrubasik, S. (2008). A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research*, 22(6), 725-733. <https://doi.org/10.1002/ptr.2400>
13. Zohra, B.C., Chaieb, I., Haouala, F., & Harzallah-Skhiri, F. (2013). Effects of wild rose (*Rosa* sp.) crude seed extracts on two legume aphids. *Pharmacognosy Communications*, 3(2), 45-49. <http://dx.doi.org/10.5530/pc.2013.2.10>

14. Ayati, Z., Amiri, M.S., Ramezani, M., Delshad, E., Sahebkar, A., & Emami, S.A. (2018) Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(35), 4101-4124. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181010151849>
15. Ozkan, G., Stübler, A.S., Aganovic, K., Draeger, G., Esatbeyoglu, T., & Capanoglu, E. (2021). A comparative study on physicochemical properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds in rosehip (*Rosa canina* L.) infusions treated by non-thermal and thermal treatments. *Journal of Food Processing and Preservation*, <https://doi.org/10.1111/jfpp.16096>
16. Ilbay, Z., Sahin, S., & Kırbaşlar, S.İ. (2013) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. *J Sci Food Agric*, 93(11), 2804-2809. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6104>
17. Cutler, R.R. (2003). Secondary Metabolites: Medicinal and Pharmaceutical Uses. In Roberts, A.V. (Ed), *Encyclopedia of Rose Science*, 716-726. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00094-X>
18. Adamczak, A., Buchwald, W., Zieliński, J., & Mielcarek, S. (2012). Flavonoid and Organic Acid Content in Rose Hips (*Rosa* L., Sect. *Caninae* Dc. Em. Christ.). *Acta biologica Cracoviensia*, 54, 105-112. <http://dx.doi.org/10.2478/v10182-012-0012-0>
19. Roman, I., Stănilă, A., & Stănilă, S. (2013) Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153x-7-73>
20. Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., Uggla M. (2000). Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2021-2027. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:14%3C2021::AID-JSFA745%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:14%3C2021::AID-JSFA745%3E3.0.CO;2-2)
21. Moldovan, C., Babotă, M., Mocan, A., Menghini, L., Cesa, S., Gavan, A., Sisea, C., Vodnar, D., Inês, M., Pereira, C., Ferreira, I., Crișan, G., & Barros, L. (2021). Optimization of drying process for autumn fruits rich in antioxidants: a study focusing rosehip (*Rosa canina* L.) and sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A.Nelson) and their bioactive properties. *Food & Function*, 12, 3939–3953. <http://dx.doi.org/10.1039/D0FO02783A>
22. Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., & Valéro J.R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227-249, <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
23. Polumackanycz, M., Kaszuba, M., Konopačka, A., Marzec-Wróblewska, U., Wesolowski, M., Waleron, K., Buciński, A., & Viapiana, A. (2020). Phenolic Composition and Biological Properties of Wild and Commercial Dog Rose Fruits and Leaves. *Molecules*, 25(22), 5272. <https://doi.org/10.3390/molecules25225272>
24. Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Applied Sciences*, 9(19), 4169. <https://doi.org/10.3390/app9194169>
25. Taneva, I., Petkova, N., Dimov, I., Ivanov, I., & Denev, P. (2016). Characterization of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits Extracts and Evaluation of Their in vitro Antioxidant Activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 35-38.

26. Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z., Yousefian, S. (2011). Phytochemical contents and biological activities of Rosa Canina fruit from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4584-4589.
27. Fascella, G., D'Angiolillo, F., Mammano, M.M., Amenta, M., Romeo, F.V., Rapisarda, P., & Ballistreri, G. (2019) Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora, *Food Chemistry*, 289, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.127>
28. Magalhães, L.M., Almeida, M.I.G.S., Barreiros, L., Reis, S., & Segundo, M.A. (2012). Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Anal. Methods*, 5, 530–539. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9278-1>
29. Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
30. Csepregi, K., Kocsis, M., & Hideg, E. (2013). On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4), 500–509. <https://doi.org/10.1556/abiol.64.2013.4.10>
31. Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9080709>
32. Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
33. Suresh, J., Ahuja, J., Paramakrishnan, N., & Sebastian, M. (2013). Total Phenolic and Total Flavonoids Content of Aerial Parts of *Artemisia abrotanum* Linn. and *A. pallens* Wall. *Analytical Chemistry Letters*, 2(3), 186-191. <https://doi.org/10.1080/22297928.2000.10648268>
34. Boly, R., Lamkami, 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*, 8(1), 29-34.
35. Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.
36. Benvenuti, L., Ferreira Zielinski, A. A., & Salvador Ferreira, S. R. (2019). Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 133-146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.003>
37. Yang, Z. (2019). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 168, 31-59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67
38. Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21 (6), 628-638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>
39. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS*

- Sustainable Chemistry & Engineering*, 2 (5), 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
40. Santana, A. P. R., Mora-Vargas, J. A., Guimarães, T. G. S., Amaral, C. D. B., Oliveira, A., & Gonzalez, M.H. (2019). Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111452. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452>
 41. Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., VeHrpoorte, R., & Choi, Y. H., (2019). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (15), 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>
 42. Tzani, A., Kalafateli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A.R.N., & Detsi, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*, 2(4), 576-598. <https://doi.org/10.3390/suschem2040032>
 43. Mitar, A., Panić, M., Prlić Kardum, J., Halambek, J., Sander, A., Zagajski Kučan, K., Radojčić Redovniković, I., & Radošević, K. (2019). Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33, 1-18. <http://dx.doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>
 44. Hikmawanti, N., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants* (Basel, Switzerland), 10(10), 2091. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>
 45. Farooq, M. Q., Abbasi, N. M., & Anderson, J. L. (2020). Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1633, 461613. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461613>
 46. Škulcová, A., & Jablonský, M. (2018). Properties and thermal behavior of deep eutectic solvents based lactic acid. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 25, 75-80.
 47. Ijardar, S. P., Singh, V., & Gardas, R. L. (2022). Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, 27(4), 1368. <https://doi.org/10.3390/molecules27041368>
 48. Wils, L., Hilali, S., & Boudesocque-Delaye, L. (2021). Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France?. *Molecules*, 26(21), 6556. <https://doi.org/10.3390/molecules26216556>
 49. Fanali, C., Gallo, V., Della Posta, S., Dugo, L., Mazzeo, L., Cocchi, M., Piemonte, V., & De Gara, L. (2021). Choline Chloride–Lactic Acid-Based NADES As an Extraction Medium in a Response Surface Methodology-Optimized Method for the Extraction of Phenolic Compounds from Hazelnut Skin. *Molecules*, 26(9), 2652. <https://doi.org/10.3390/molecules26092652>
 50. Zhou, Y., Wu, Y.J., Wang, L., Han, J, Wu, J.C., Li, C.M., & Wang, Y.(2021) Natural deep eutectic solvents as green and biocompatible reaction medium for carbonic anhydrase catalysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.221>
 51. Mulia, K., Adam, D., Zahrina, I., & Krisanti, E.A. (2018). Green Extraction of Palmitic Acid from Palm Oil using Betaine-based Natural Deep Eutectic

- Solvents. *International Journal of Technology*, 9(2), 335-344. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v9i2.1008>
52. Monteiro, H., Paiva, A., Duarte, A.R.C., & Galamba, N. (2022). Structure and Dynamic Properties of a Glycerol–Betaine Deep Eutectic Solvent: When Does a DES Become an Aqueous Solution?. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(11), 3501-3512. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c07461>
 53. Ngaha Njila, M. I., Mahdi, E., Massoma Lembe, D., Nde, Z., NDE4 , & Nyonseu, D. (2017). Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. *7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences, May 22-24, Kuala Lumpur (Malaysia)*. <https://doi.org/10.15242/IIIE.C0517024>
 54. Çiğeroğlu, Z., Kırbaslar, Ş.I., Şahin, S., & Köprücü, G., (2017). Optimization and Kinetic Studies of Ultrasound-Assisted Extraction on Polyphenols from Satsuma Mandarin (Citrus Unshiu Marc.) Leaves. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 36, 163-171.
 55. Makris, D. P., & Lalas, S. (2020). Glycerol and Glycerol-Based Deep Eutectic Mixtures as Emerging Green Solvents for Polyphenol Extraction: The Evidence So Far. *Molecules*, 25(24), 5842. <https://doi.org/10.3390/molecules25245842>
 56. Benoit, C., Virginie, C., & Boris, V. (2021). Chapter Twelve -The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research*, 97, 309-332, <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.009>
 57. Bajkacz, S., & Adamek, J. (2018) Development of a Method Based on Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Flavonoids from Food Samples. *Food Analytical Methods*, 11, 1330–1344. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1118-5>
 58. Panić, M., Andlar, M., Tišma, M., Rezić, T., Šibalić, D., Bubalo, M.C., & Redovniković, I.R. (2021). Natural deep eutectic solvent as a unique solvent for valorisation of orange peel waste by the integrated biorefinery approach. *Waste Management*, 120, 340-350. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.052>
 59. Rigano, L., Dell'acqua, G., & Leporatti, R. (2000). Benefits of trimethylglycine (betaine) in personal-care formulations. *Cosmetics and toiletries*, 115, 47-54.
 60. Cholewa, J.M., Guimarães-Ferreira, L., & Zanchi, N.E. (2014) Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids*, 46(8), 1785-1793. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1748-5>
 61. Becker, L.C., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G. Jr., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Gill, L.J., & Heldreth, B. (2019). Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 38(3_suppl), 6S-22S. <https://doi.org/10.1177/1091581819883820>
 62. Ata, R., Aladdin, A., Othman, N., Malek, R.A., Leng, O., Aziz, R. & El Enshasy, H. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10), 729-735.
 63. Mitra, A., Patil, M., & Banerjee, N. (2014). Optimization of Vehicle Suspension Parameters for Ride Comfort Based on RSM. *Journal of The Institution of Engineers*, 96(2), 165-173. <http://dx.doi.org/10.1007/s40032-014-0156-7>.
 64. Aydar, A. (2018). Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials. *Statistical Approaches With*

- Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*, 157-169 <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73690>
65. Ferreira, S.L., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., & dos Santos, W.N. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
 66. Demirel, C., Kabutey, A., Herák, D., Sedlaček, A., Mizera, Č., & Dajbych, O. (2022). Using Box–Behnken Design Coupled with Response Surface Methodology for Optimizing Rapeseed Oil Expression Parameters under Heating and Freezing Conditions. *Processes*, 10(3), 490. <https://doi.org/10.3390/pr10030490>
 67. Theophanides, T. (2012). Introduction to Infrared Spectroscopy. In Theophanides, T. (Ed), *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.5772/49106>
 68. Méndez, J.R.R., Aguilar, N.V.P., Espinosa G.A., & Rodríguez, J.L.D. (2012). FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. In Theophanides, T. (Ed), *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. <http://dx.doi.org/10.5772/36044>
 69. Larkin, P.J. (2018). Chapter 2 - Basic Principles. In Larkin, P.J. (Ed), *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*. 7-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804162-8.00002-1>.
 70. Silverstein, R.M., Webster, F.X., & Kiemle, D.J. (2005). Chapter 2 - Infrared Spectrometry. *Spectrometric Identification of Organic Compounds (Seventh Edition)*, 72-110.
 71. Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M.T., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R.L., Duarte, A.R.C., & Paiva, A. (2016). Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 215, 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>.
 72. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
 73. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>
 74. Nariya, P.B., Shukla, V.J., & Acharya, R.N. (2013). Phytochemical Screening and in vitro evaluation of free radical scavenging activity of Cordia macledodii bark. (HOOK.F. & THOMSON). *Free Radicals and Antioxidants*, 2(3), 36-40. <https://doi.org/10.5530/ax.2012.3.5>
 75. Sánchez, P. B., González, B., Salgado, J., Parajó, J. J., & Domínguez, Á. (2019). Physical properties of seven deep eutectic solvents based on l-proline or betaine. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 131, 517-523, <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.12.017>.
 76. Jablonsky, M., Skulcova, A., Russ, A., & Sima, J. (2018). The pH Behavior of Seventeen Deep Eutectic Solvents. *Bioresources*, 13(3), 5042-5051. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.13.3.5042-5051>
 77. Kučan, K. Z., Perković, M., Cmrk, K., Načinović, D., & Rogošić. M. (2018). Betaine + (Glycerol or Ethylene Glycol or Propylene Glycol) Deep Eutectic

Solvents for Extractive Purification of Gasoline. *ChemistrySelect*, 3 (44), 12582-12590. <https://doi.org/10.1002/slct.201803251>

Βιβλιογραφία Εικόνων και Σχημάτων

Εικόνα 1: Winther, K., Vinther Hansen, A. S., & Campbell-Tofte J. (2016). Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and antiinflammatory properties: in vitro studies. *Botanics: Targets and Therapy*, 6, 11-23. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S91385>

Εικόνα 2: Cutler, R.R. (2003). Secondary Metabolites: Medicinal and Pharmaceutical Uses. In Roberts, A.V. (Ed), *Encyclopedia of Rose Science*, 716-726. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00094-X>

Εικόνα 3 & 5: Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9080709>

Σχήμα 2: Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Applied Sciences*, 9(19), 4169. <https://doi.org/10.3390/app9194169>

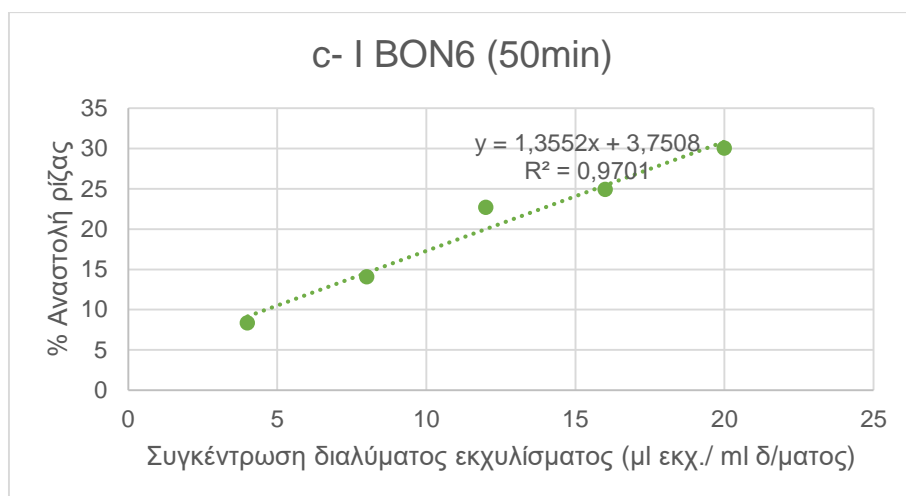
Σχήμα 3: Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9080709>

Σχήμα 4: Ferreira, S.L., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., & dos Santos, W.N. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

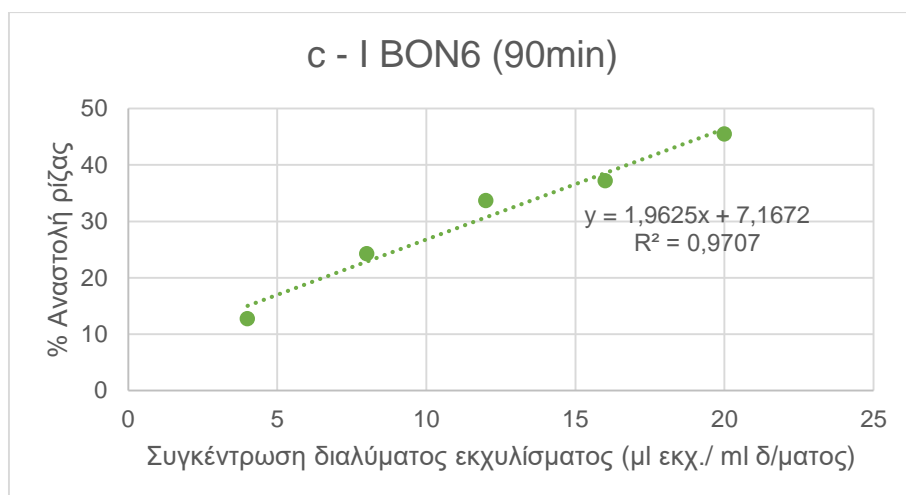
Η χρωματική παλέτα της Εικόνας 4 απεικονίστηκε με την online έκδοση του Colors (<https://colors.co/gradients>)

Οι συντακτικοί τύποι των ενώσεων σχεδιάστηκαν με την online έκδοση του Chemdraw (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html#>)

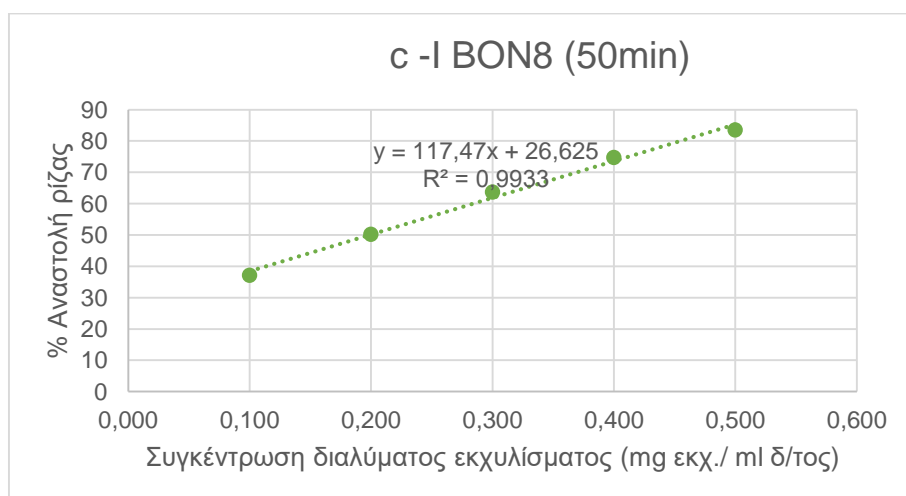
Παράρτημα I



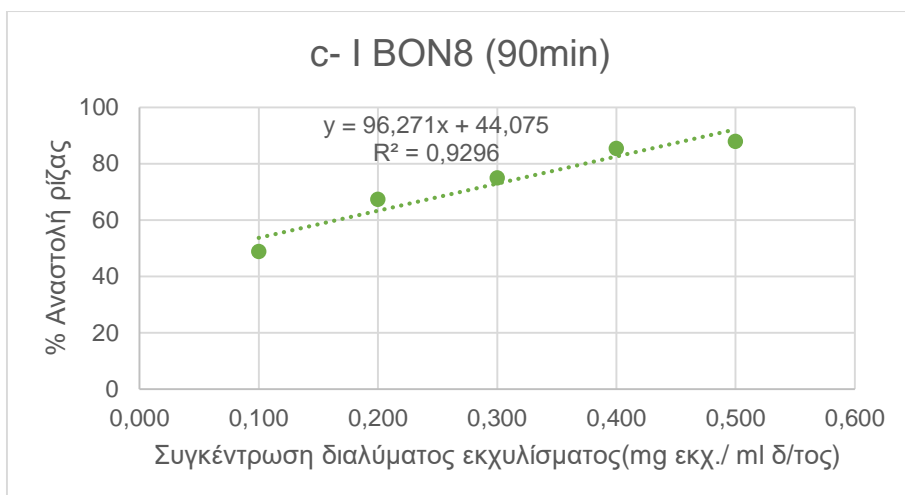
Διάγραμμα 22: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON6 για χρόνο επώασης 50 min.



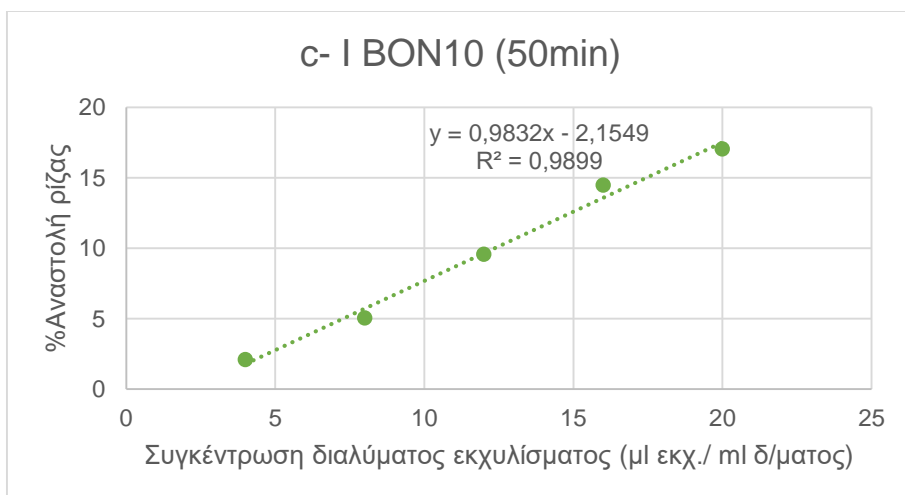
Διάγραμμα 23: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON6 για χρόνο επώασης 90 min.



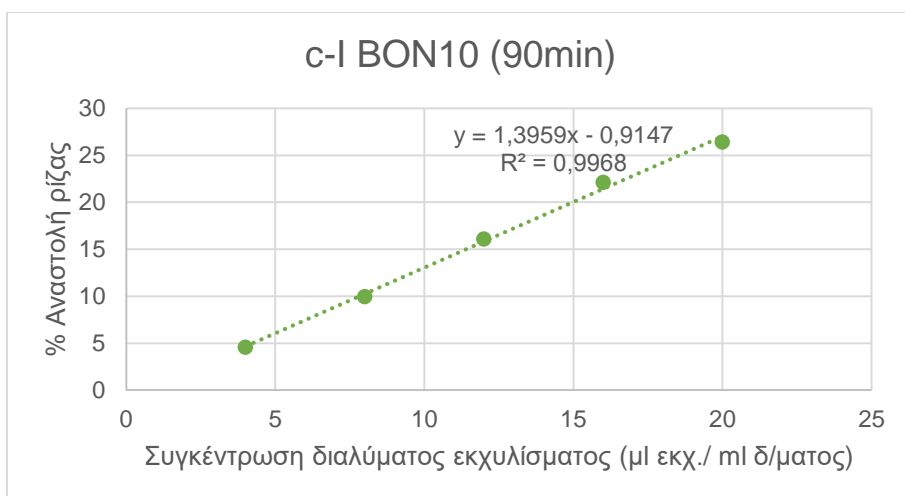
Διάγραμμα 24: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON8 για χρόνο επώασης 50 min.



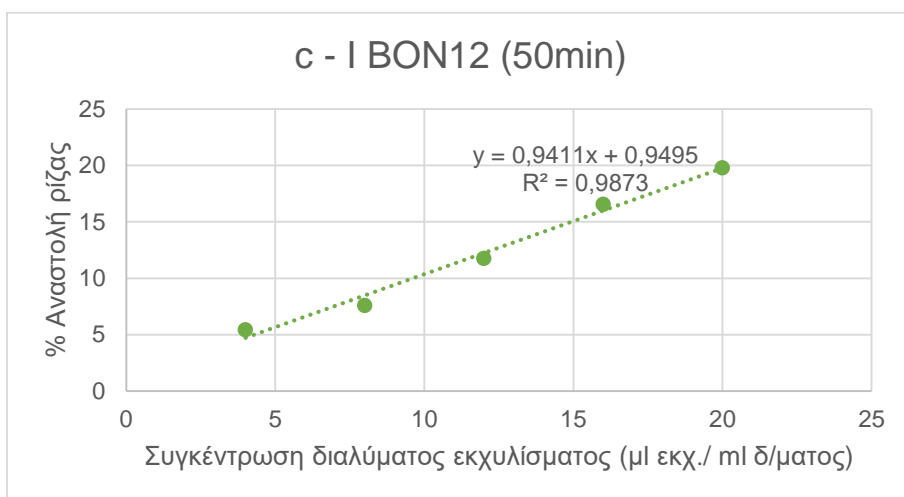
Διάγραμμα 25: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON8 για χρόνο επώασης 90 min.



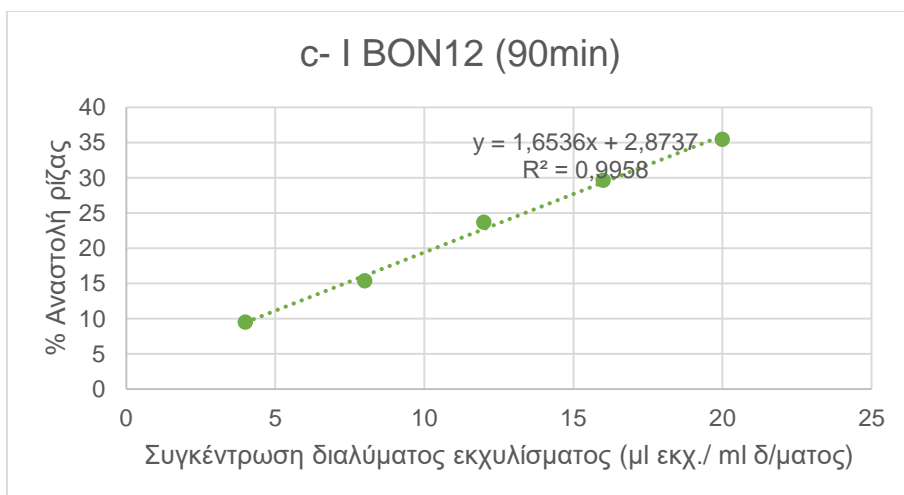
Διάγραμμα 26: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON10 για χρόνο επώασης 50 min.



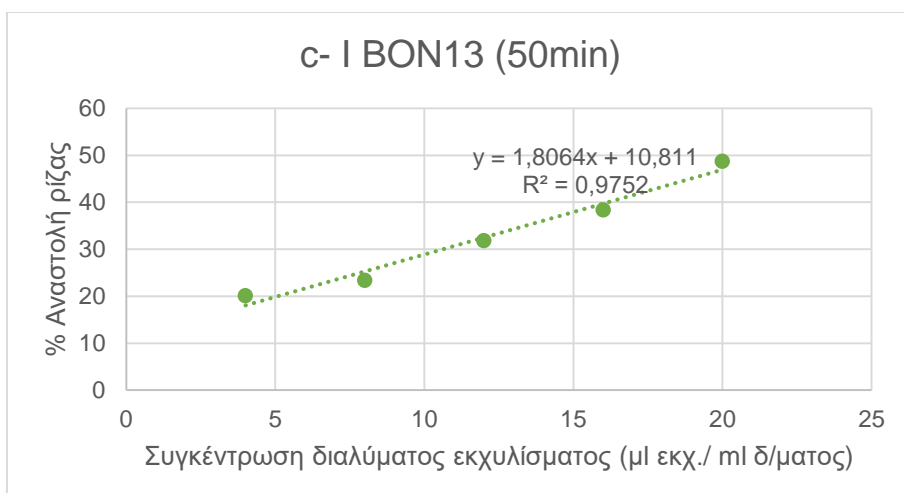
Διάγραμμα 27: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON10 για χρόνο επώασης 90 min.



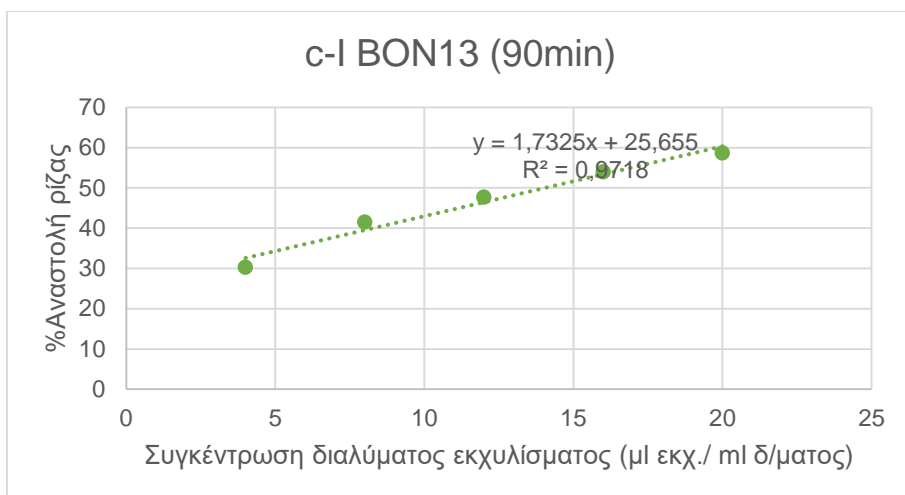
Διάγραμμα 28: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON12 για χρόνο επώασης 50 min.



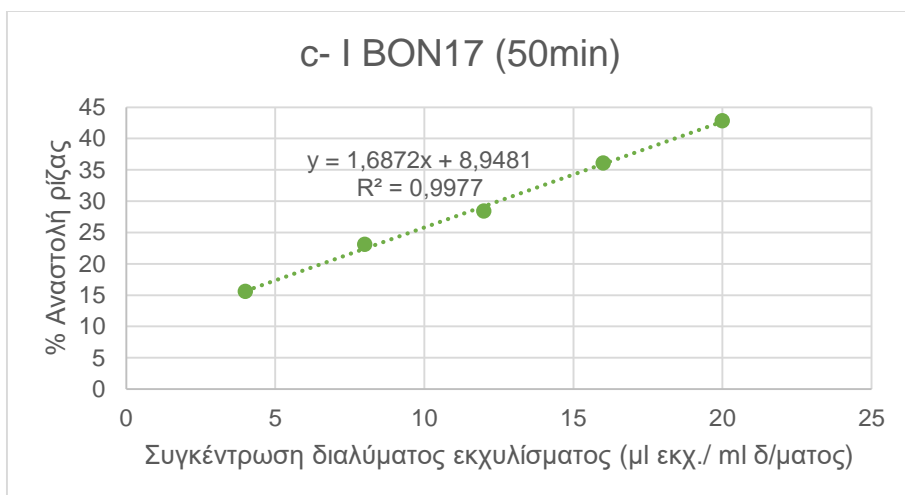
Διάγραμμα 29: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON12 για χρόνο επώασης 90 min.



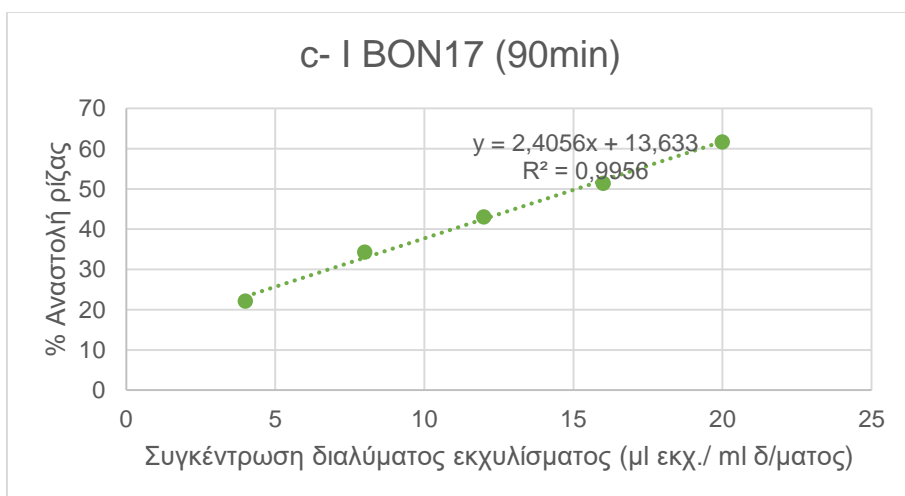
Διάγραμμα 30: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON13 για χρόνο επώασης 50 min.



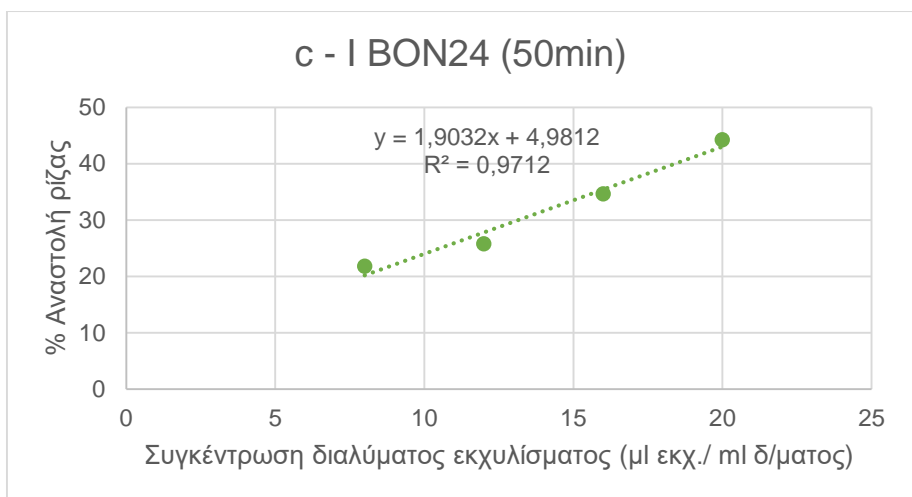
Διάγραμμα 31: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON13 για χρόνο επώασης 90 min.



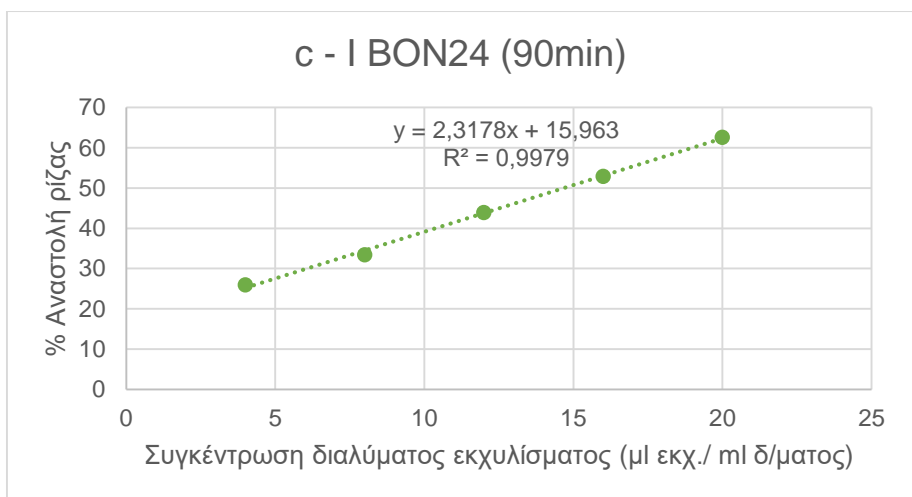
Διάγραμμα 32: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON17 για χρόνο επώασης 50 min.



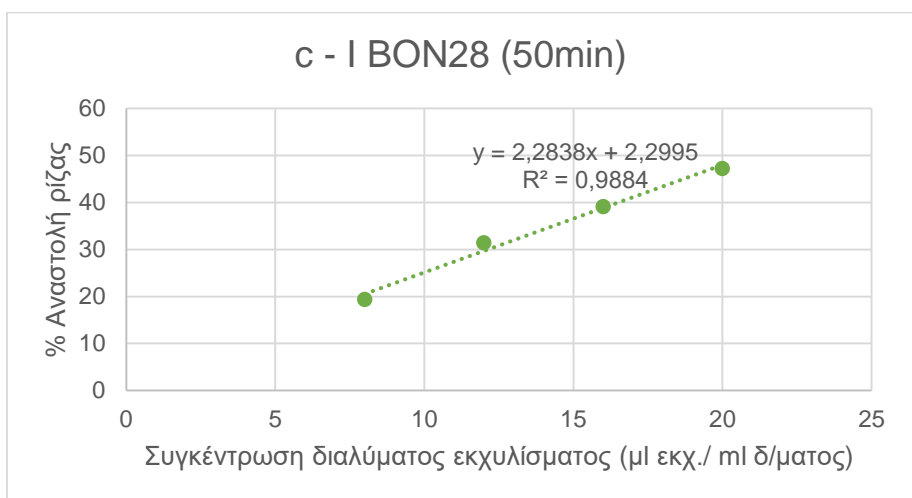
Διάγραμμα 33: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON17 για χρόνο επώασης 90 min.



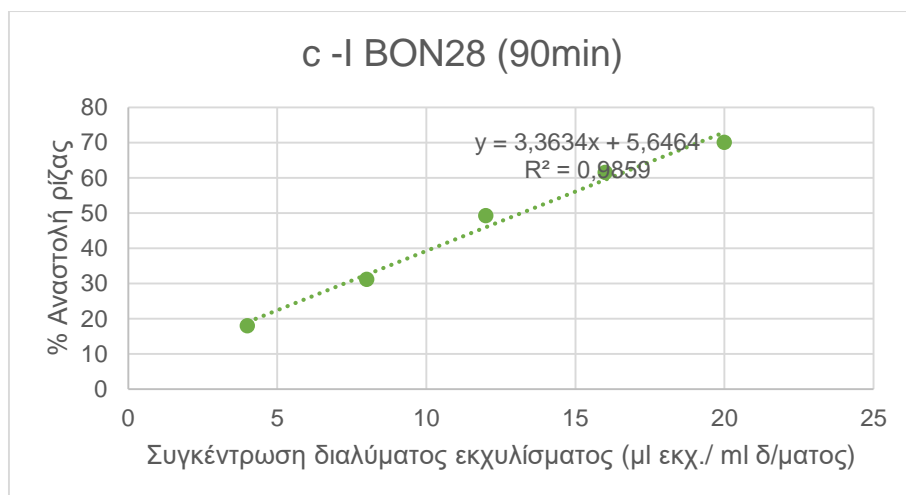
Διάγραμμα 34: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON24 για χρόνο επώασης 50 min.



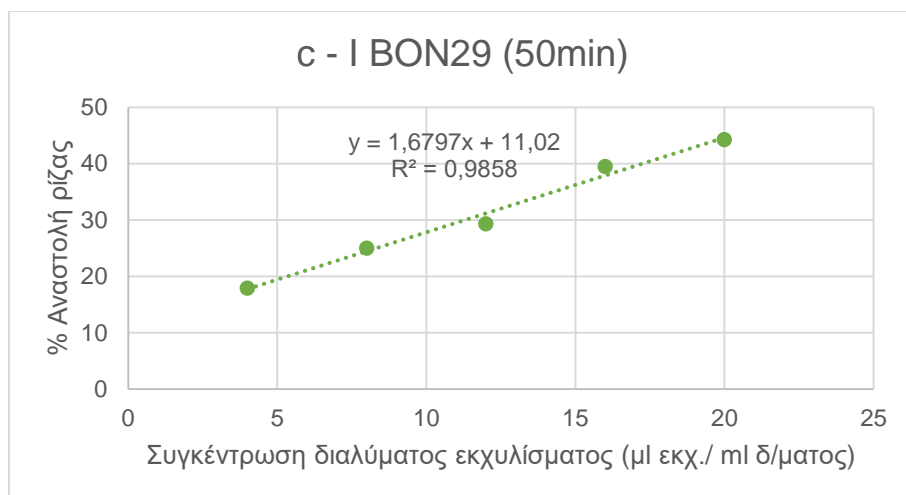
Διάγραμμα 35: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON24 για χρόνο επώασης 90 min.



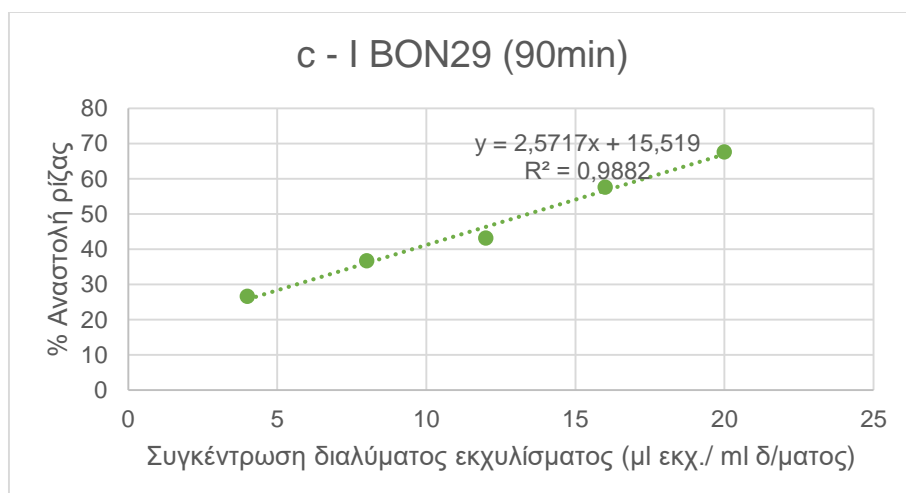
Διάγραμμα 36: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON28 για χρόνο επώασης 50 min.



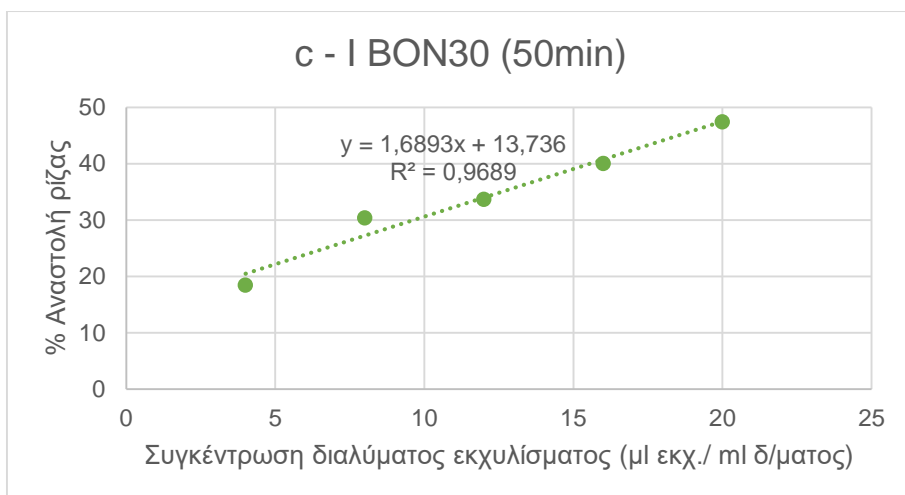
Διάγραμμα 37: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON28 για χρόνο επώασης 90 min.



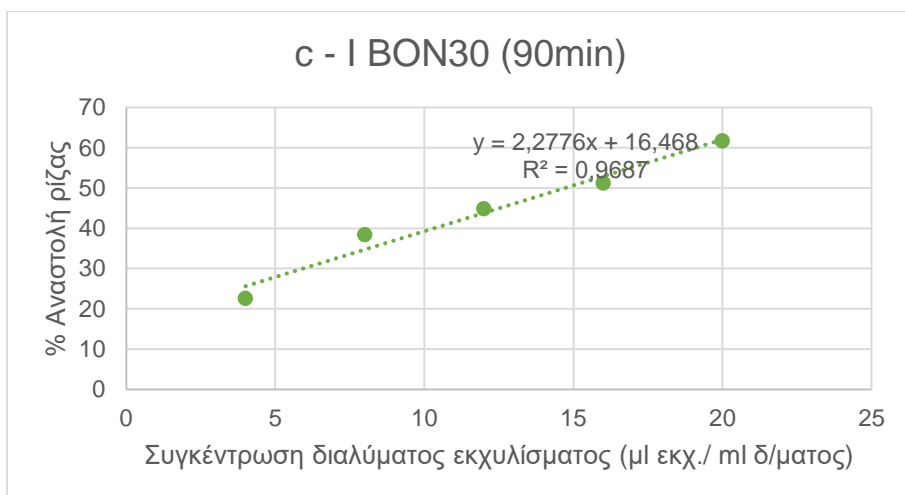
Διάγραμμα 38: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON29 για χρόνο επώασης 50 min.



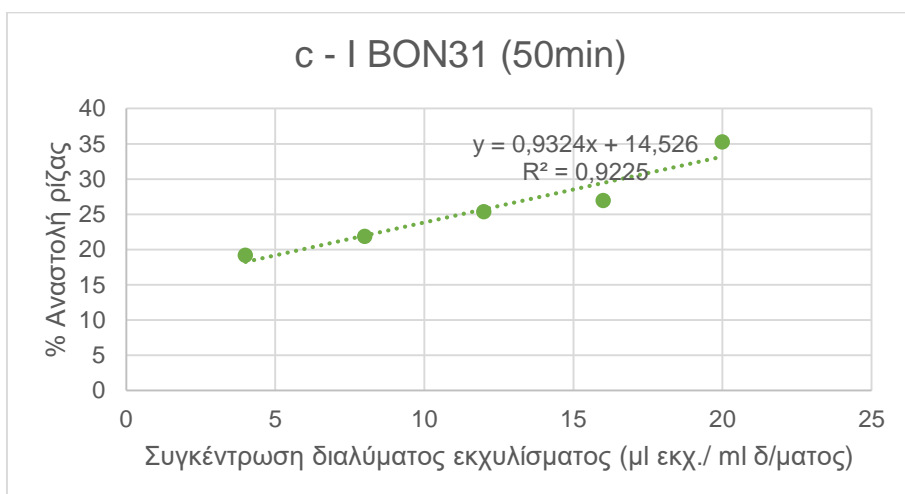
Διάγραμμα 39: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON29 για χρόνο επώασης 90 min.



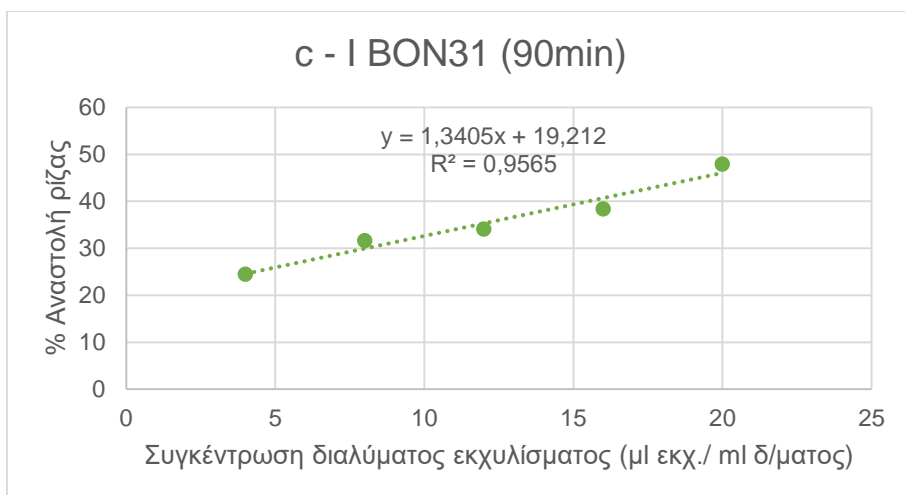
Διάγραμμα 40: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON30 για χρόνο επώασης 50 min.



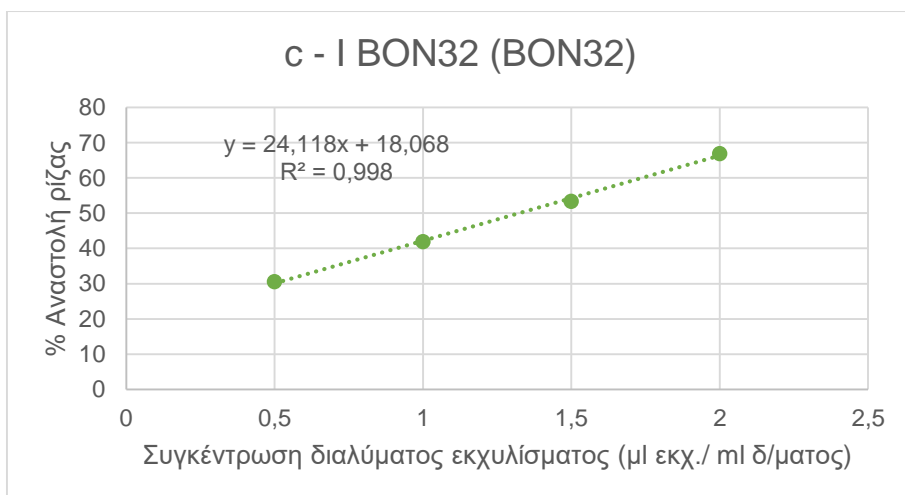
Διάγραμμα 41: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON30 για χρόνο επώασης 90 min.



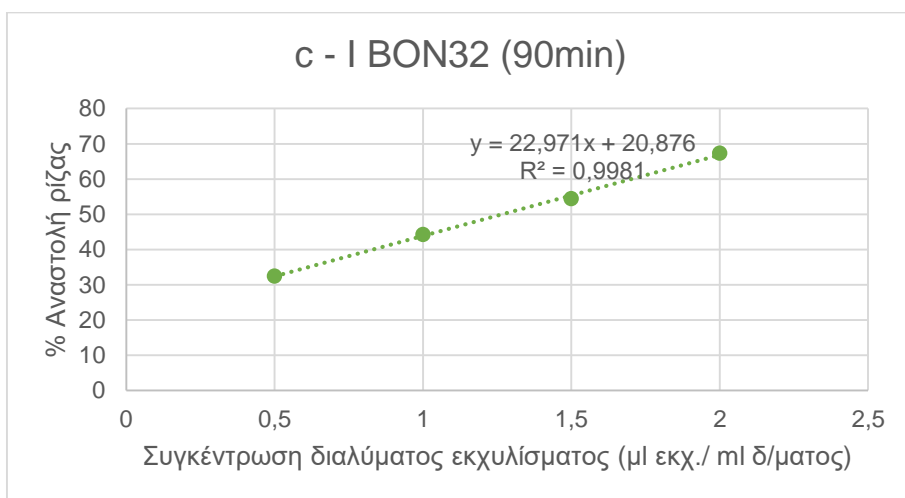
Διάγραμμα 42: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON31 για χρόνο επώασης 50 min.



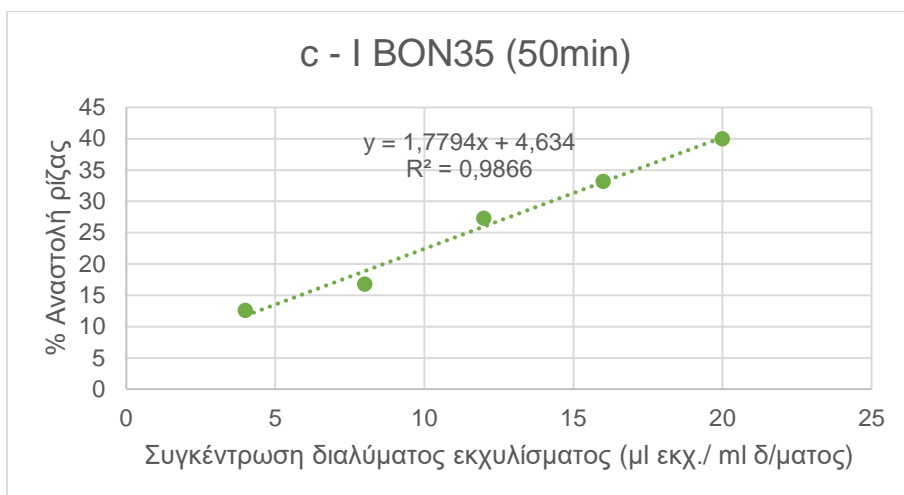
Διάγραμμα 43: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON31 για χρόνο επώασης 90 min.



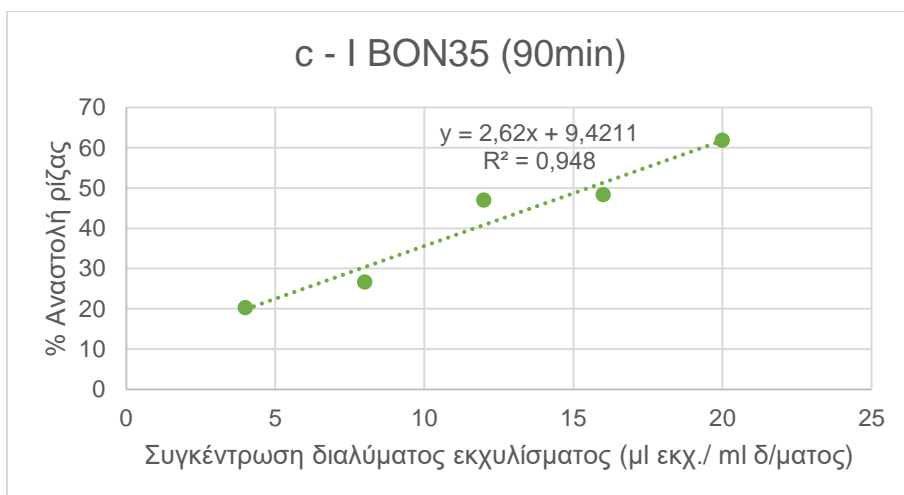
Διάγραμμα 44: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON32 για χρόνο επώασης 50 min.



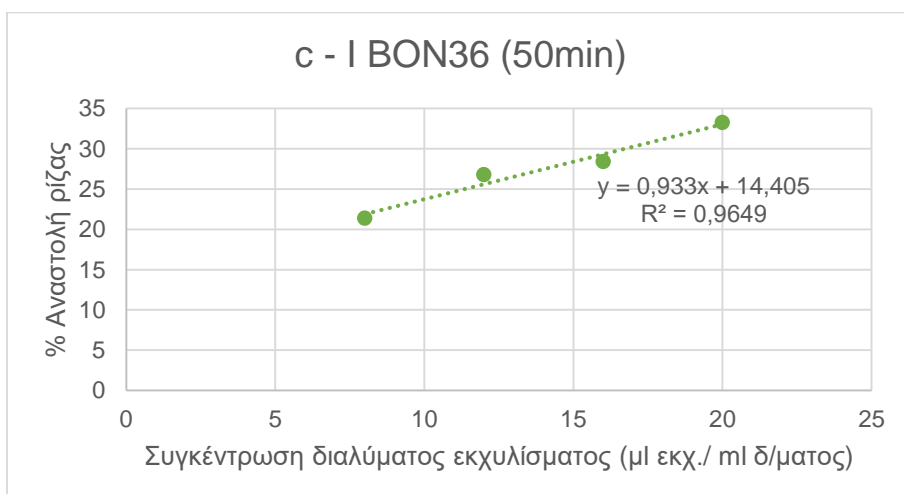
Διάγραμμα 45: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON32 για χρόνο επώασης 90 min.



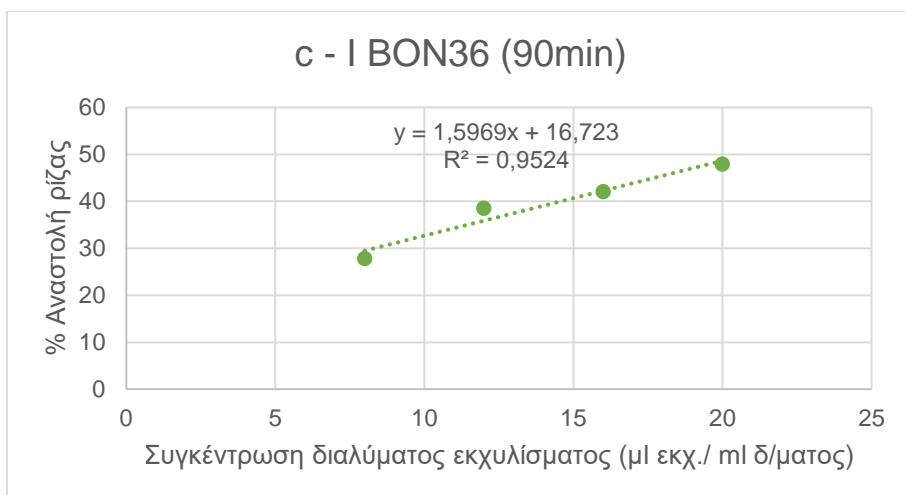
Διάγραμμα 46: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON35 για χρόνο επώασης 50 min.



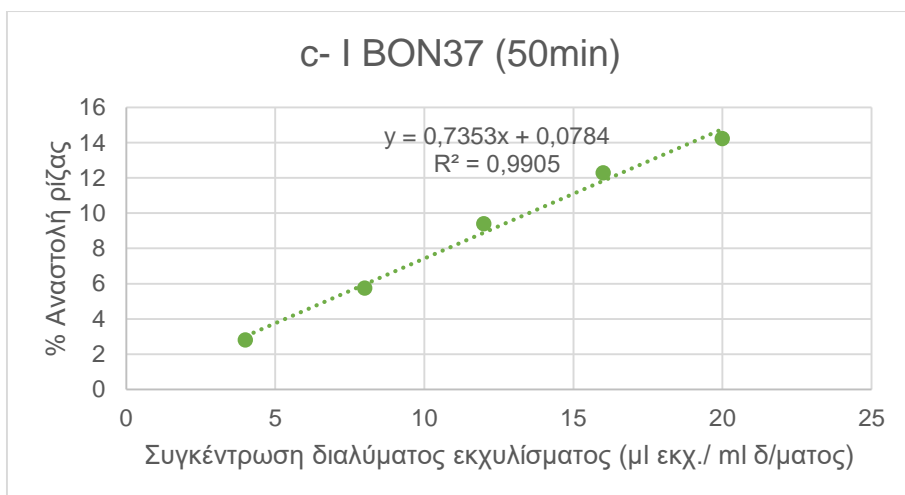
Διάγραμμα 47: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON35 για χρόνο επώασης 90 min.



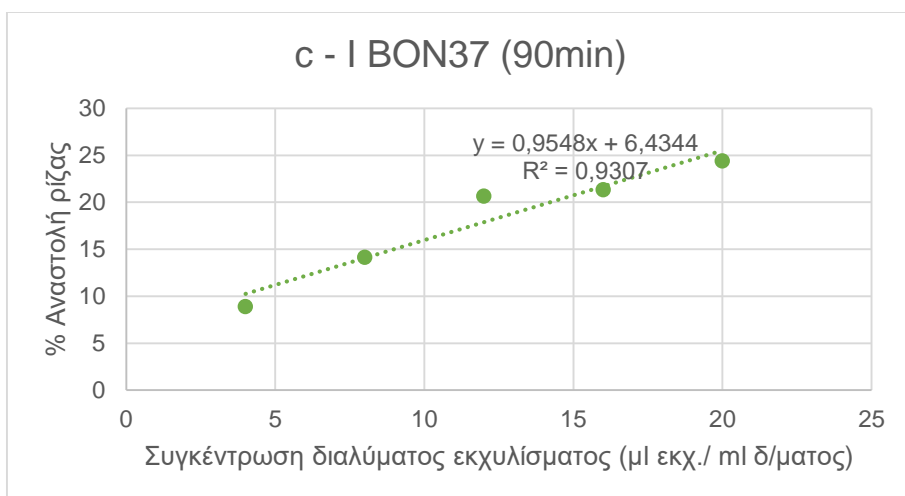
Διάγραμμα 48: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON36 για χρόνο επώασης 50 min.



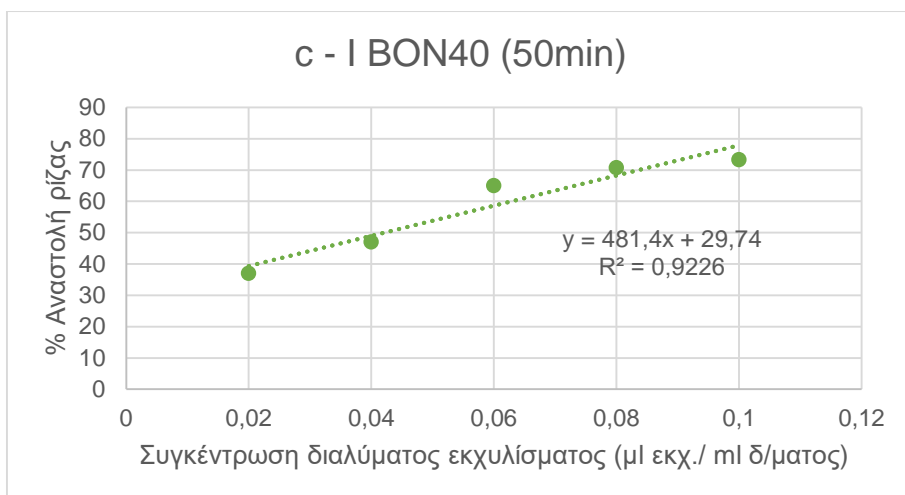
Διάγραμμα 49: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON36 για χρόνο επώασης 90 min.



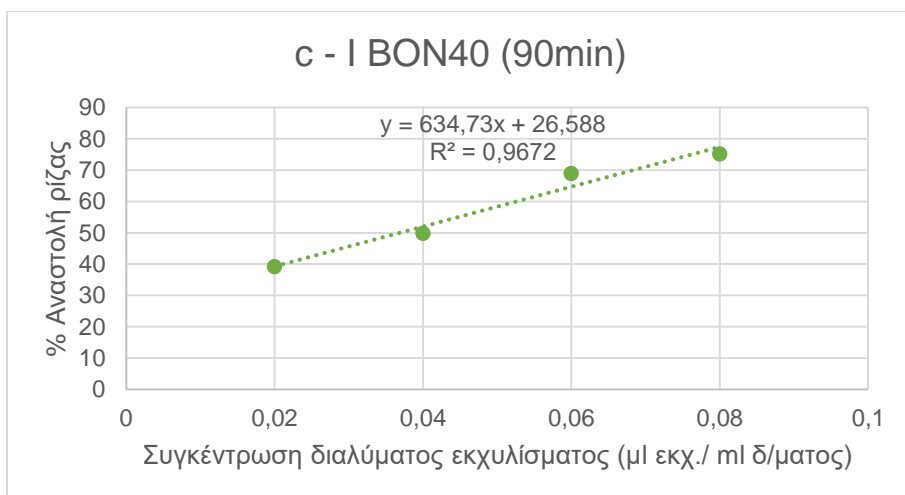
Διάγραμμα 50: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON37 για χρόνο επώασης 50 min.



Διάγραμμα 51: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON37 για χρόνο επώασης 90 min.

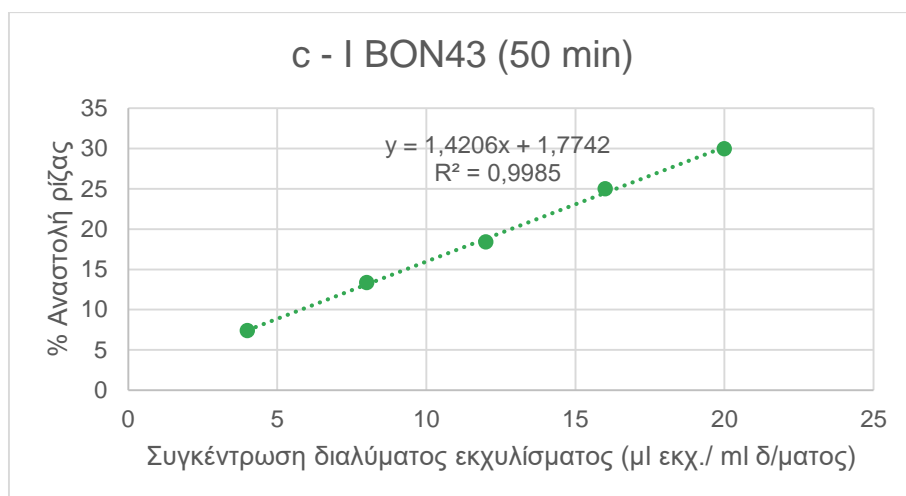


Διάγραμμα 52: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON40 για χρόνο επώασης 50 min.

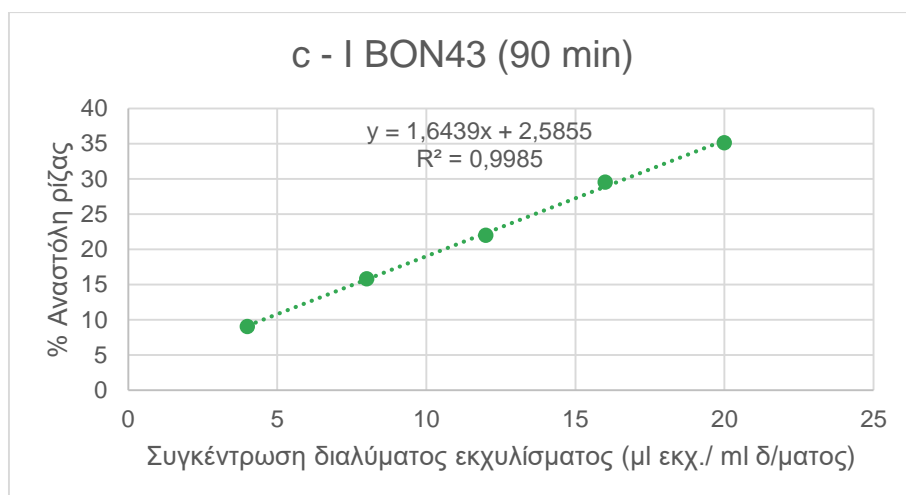


Διάγραμμα 53: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON40 για χρόνο επώασης 90 min.

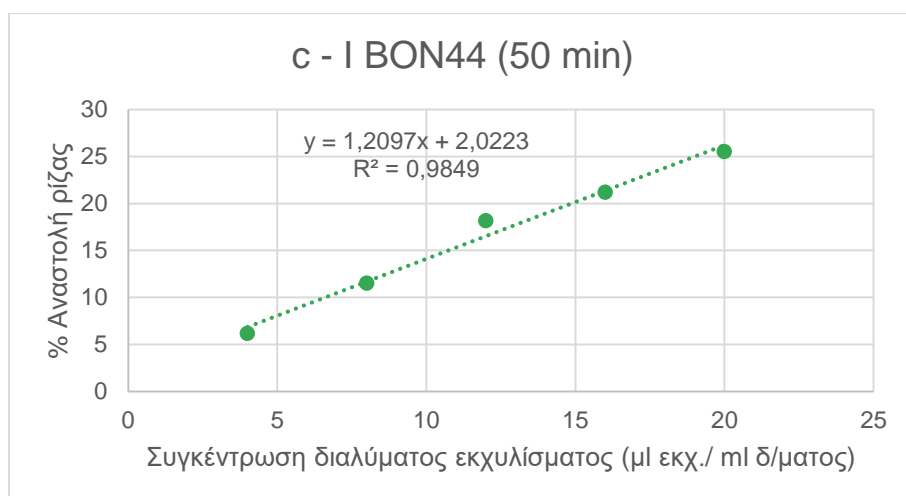
Παράρτημα II



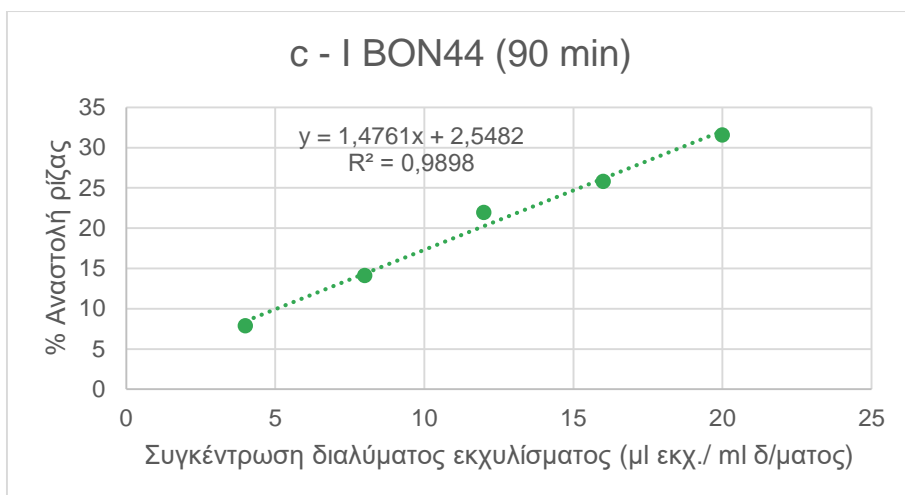
Διάγραμμα 54: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON43 για χρόνο επώασης 50 min.



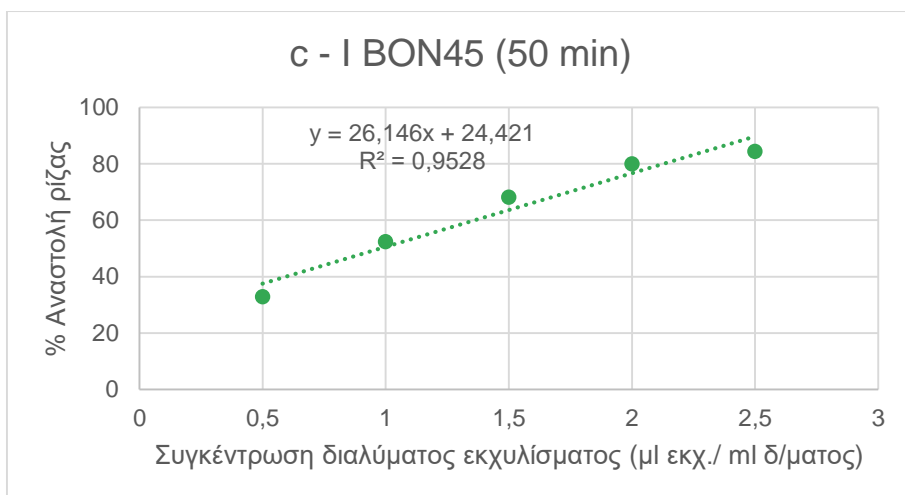
Διάγραμμα 55: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON43 για χρόνο επώασης 90 min.



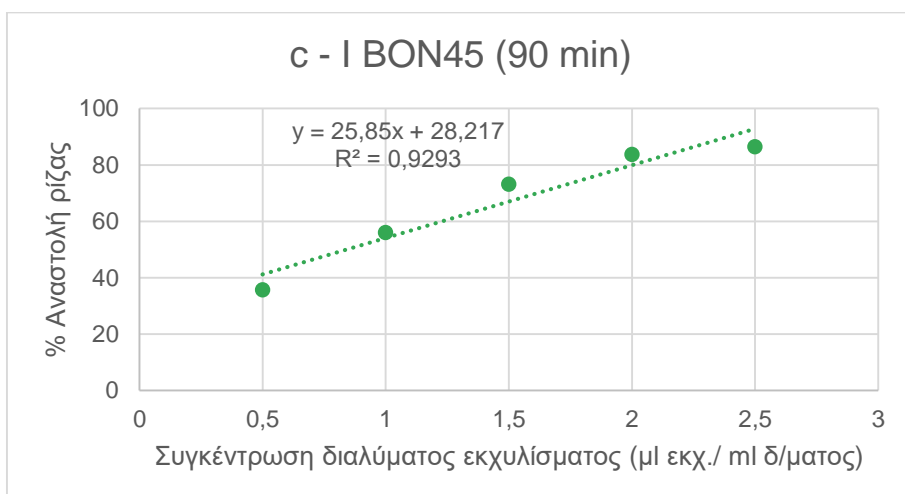
Διάγραμμα 56: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON44 για χρόνο επώασης 50 min.



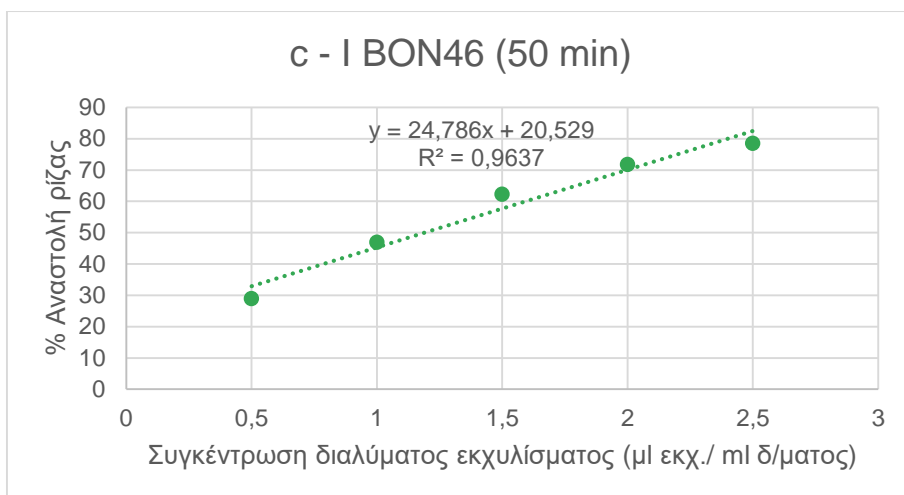
Διάγραμμα 57: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON44 για χρόνο επώασης 90 min.



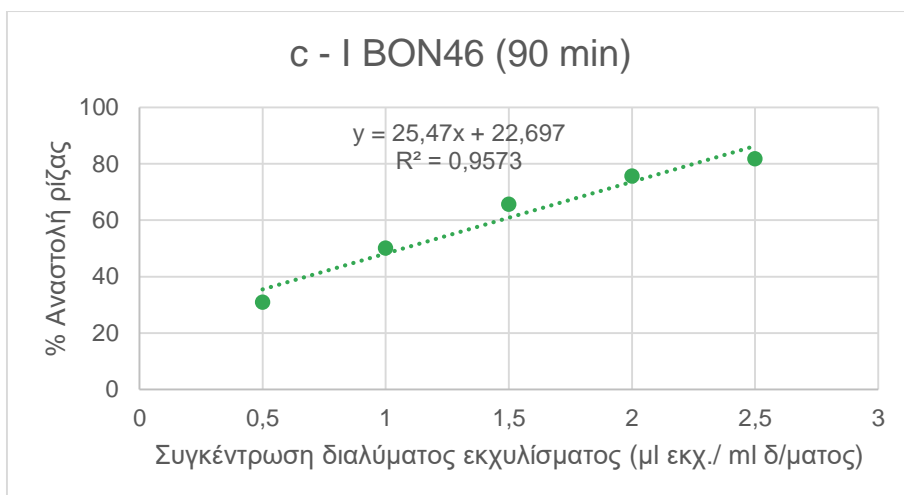
Διάγραμμα 58: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON45 για χρόνο επώασης 50 min.



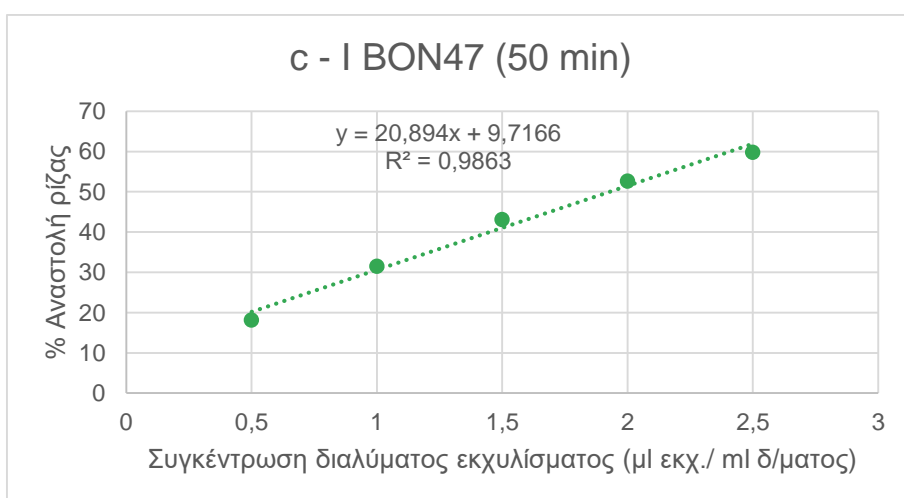
Διάγραμμα 59: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON45 για χρόνο επώασης 90 min.



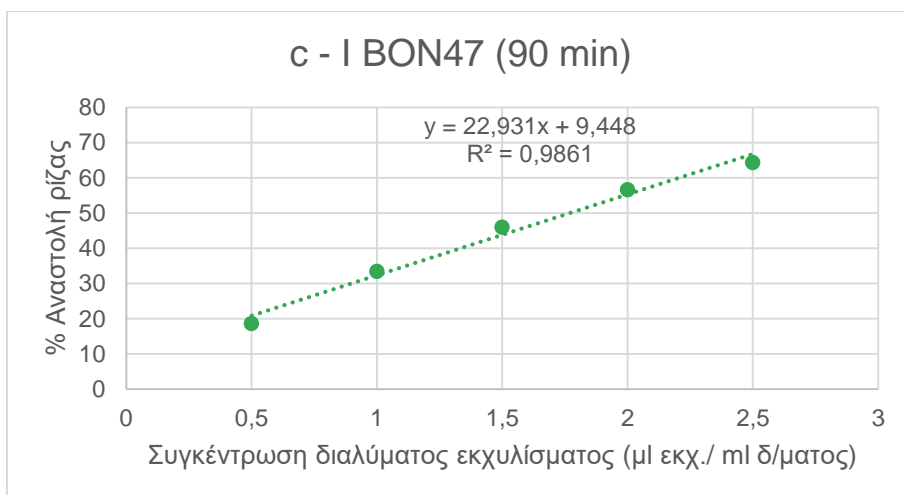
Διάγραμμα 60: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON46 για χρόνο επώασης 50 min.



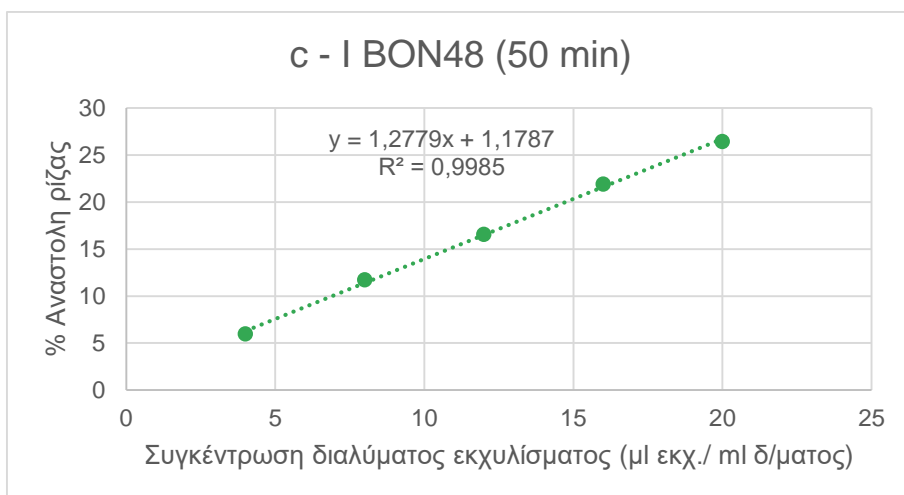
Διάγραμμα 61: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON46 για χρόνο επώασης 90 min.



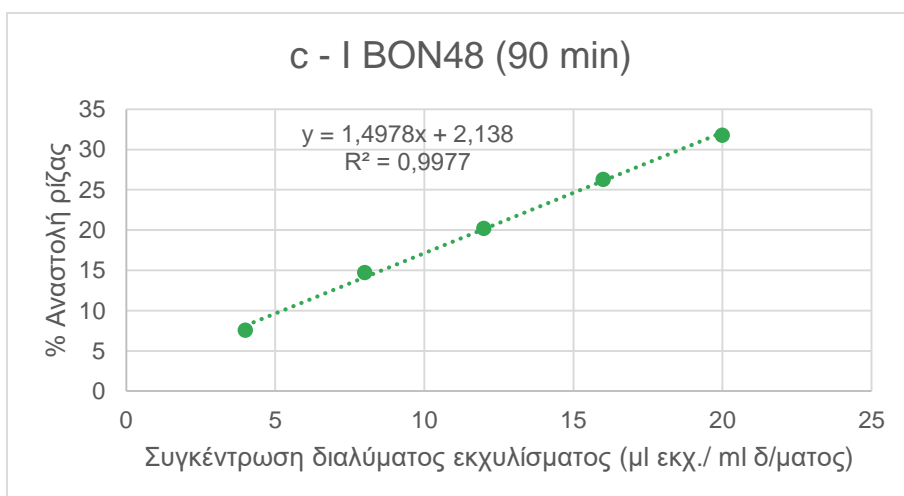
Διάγραμμα 62: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON47 για χρόνο επώασης 50 min.



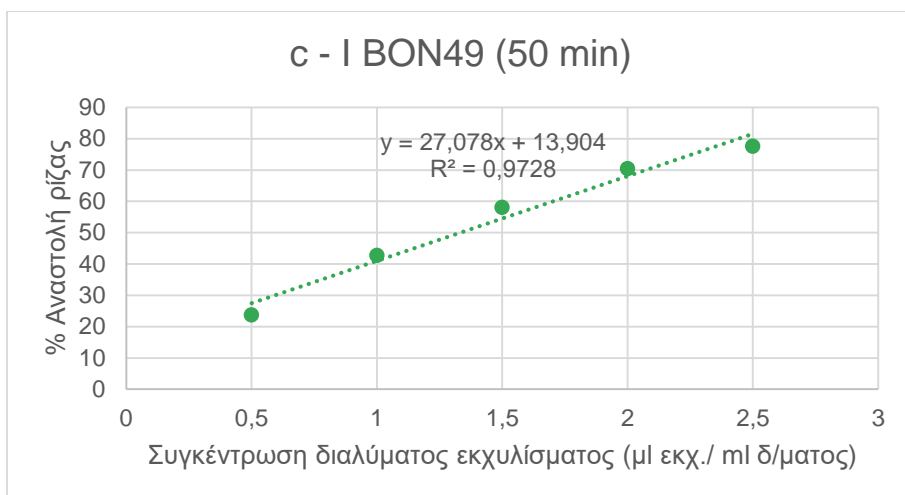
Διάγραμμα 63: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON47 για χρόνο επώασης 90 min.



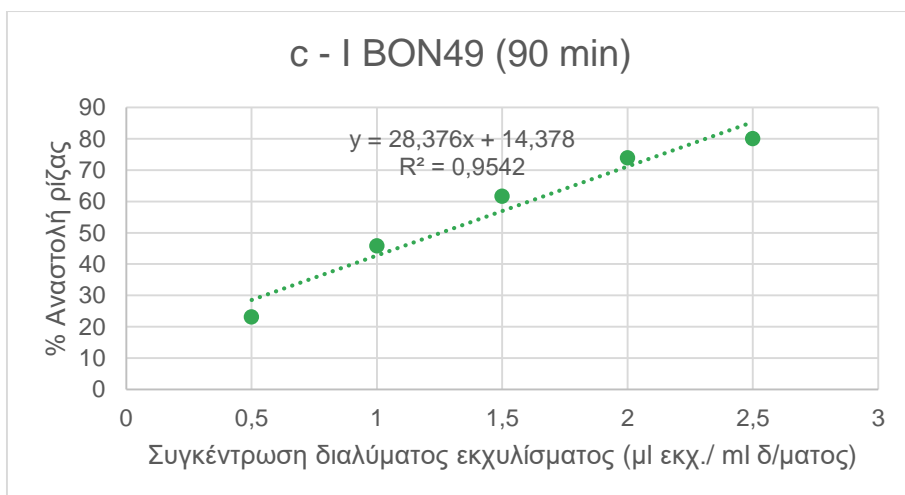
Διάγραμμα 64: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON48 για χρόνο επώασης 50 min.



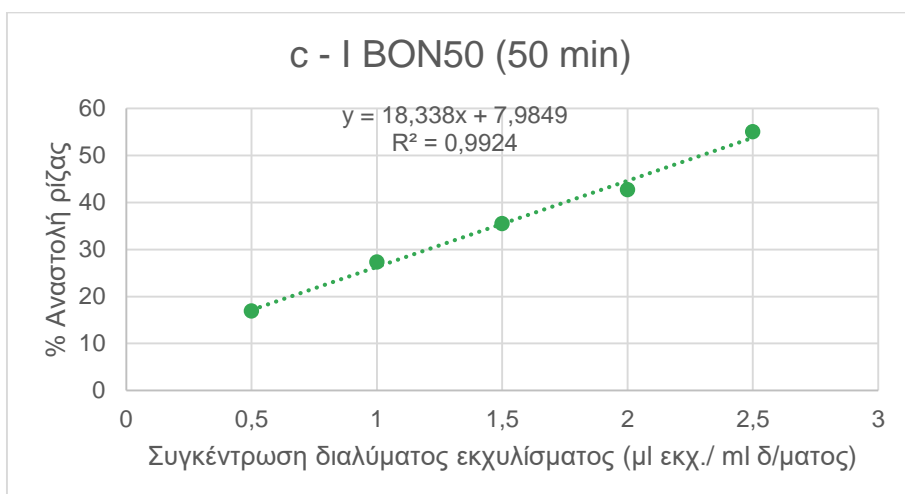
Διάγραμμα 65: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON48 για χρόνο επώασης 90 min.



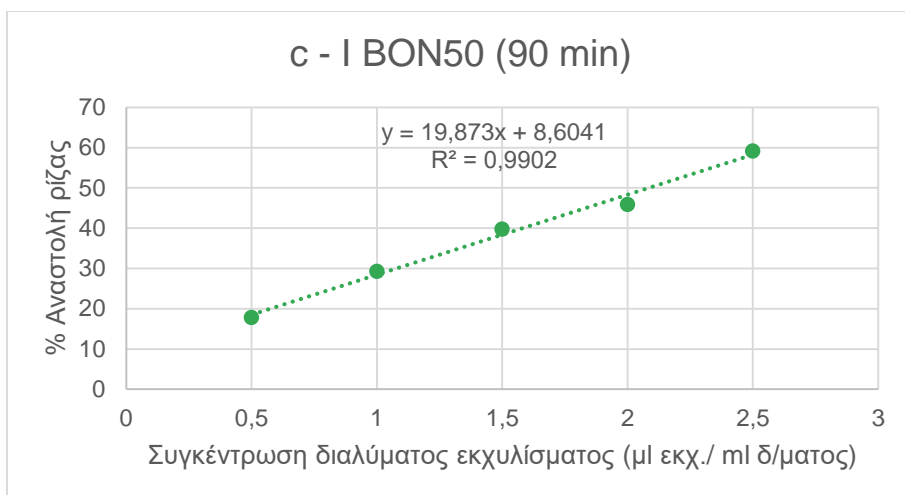
Διάγραμμα 66: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON49 για χρόνο επώασης 50 min.



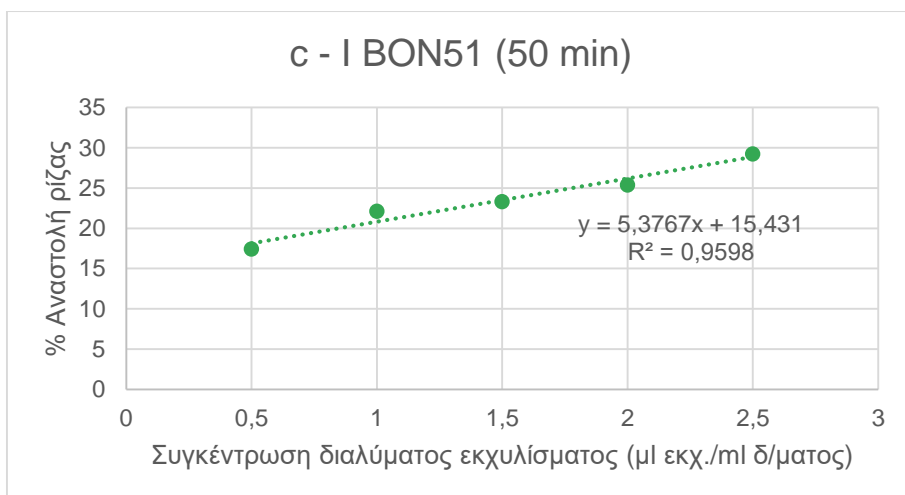
Διάγραμμα 67: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON49 για χρόνο επώασης 90 min.



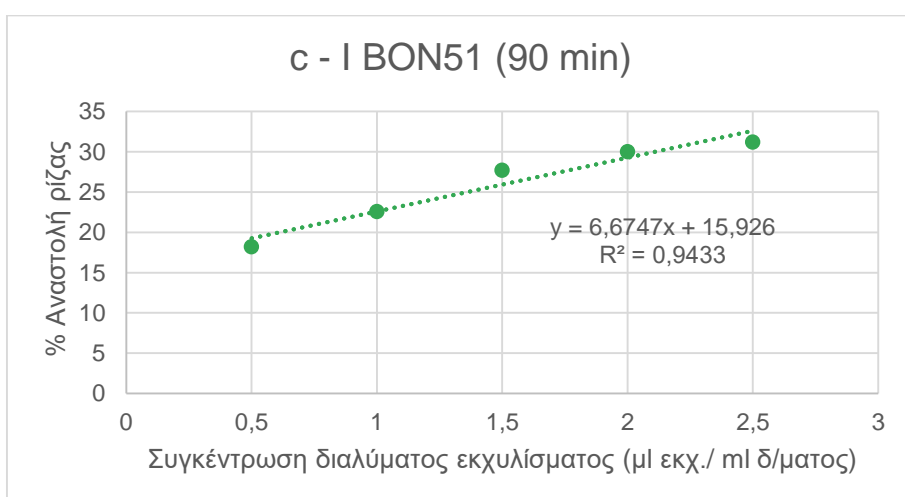
Διάγραμμα 68: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON50 για χρόνο επώασης 50 min.



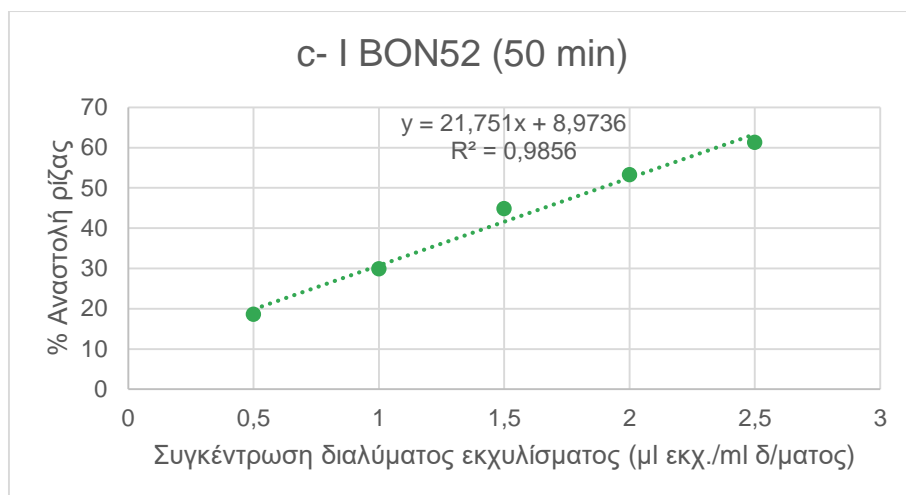
Διάγραμμα 69: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON50 για χρόνο επώασης 90 min.



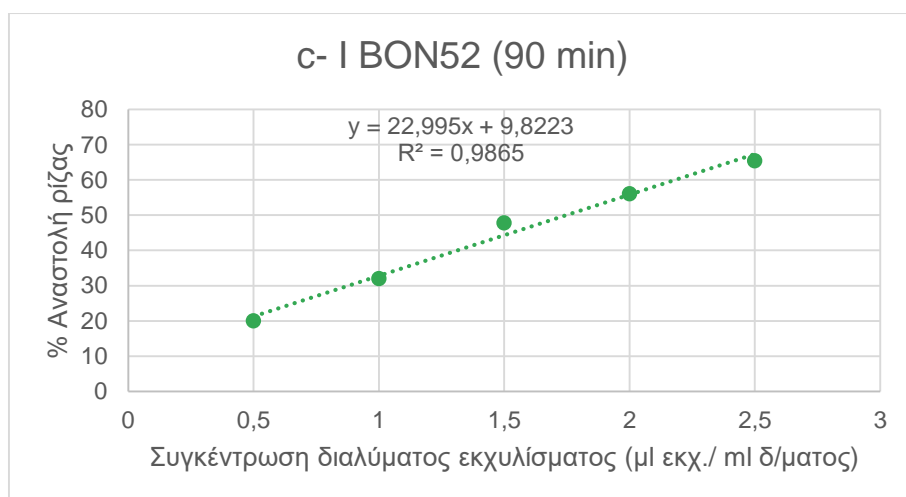
Διάγραμμα 70: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON51 για χρόνο επώασης 50 min.



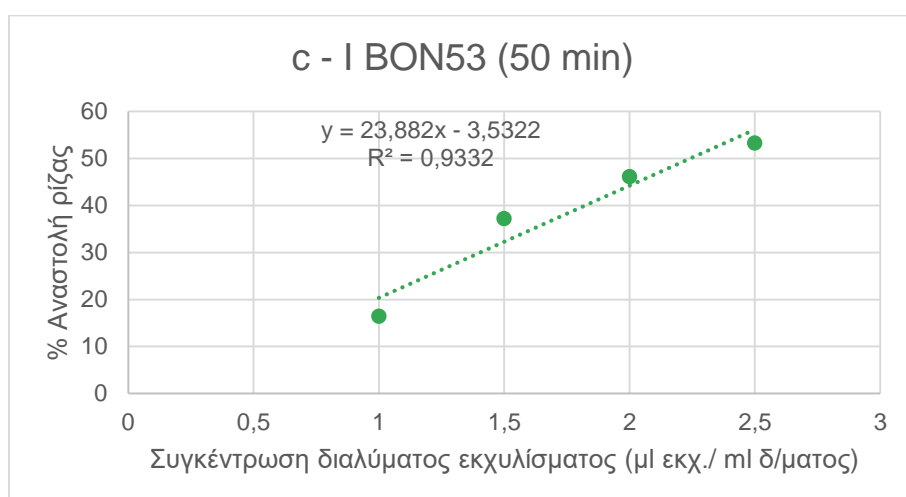
Διάγραμμα 71: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON51 για χρόνο επώασης 90 min.



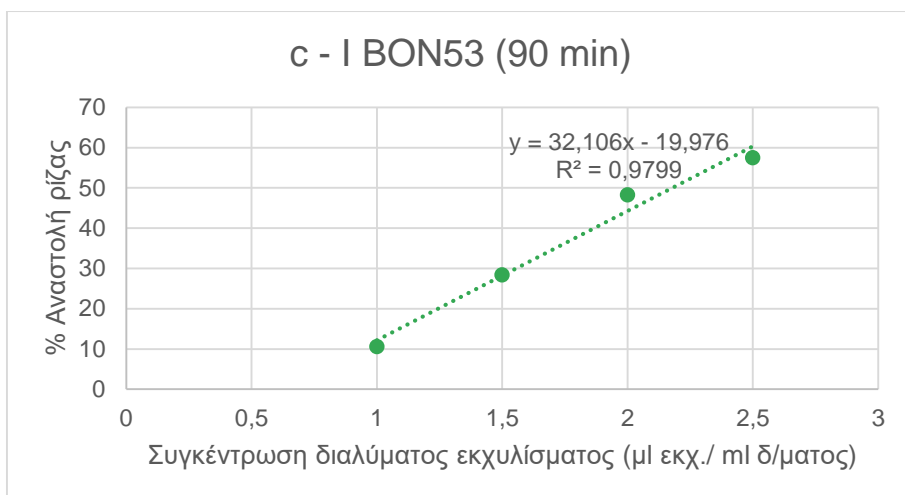
Διάγραμμα 72: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON52 για χρόνο επώασης 50 min.



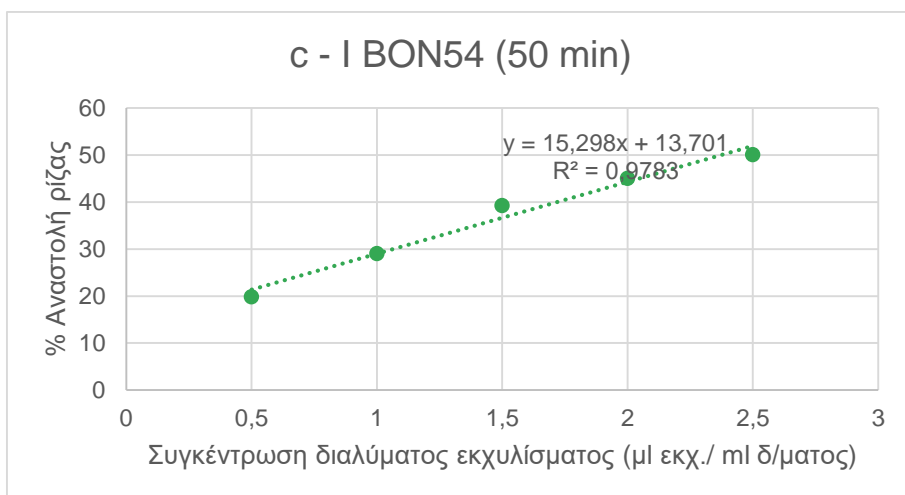
Διάγραμμα 73: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON52 για χρόνο επώασης 90 min.



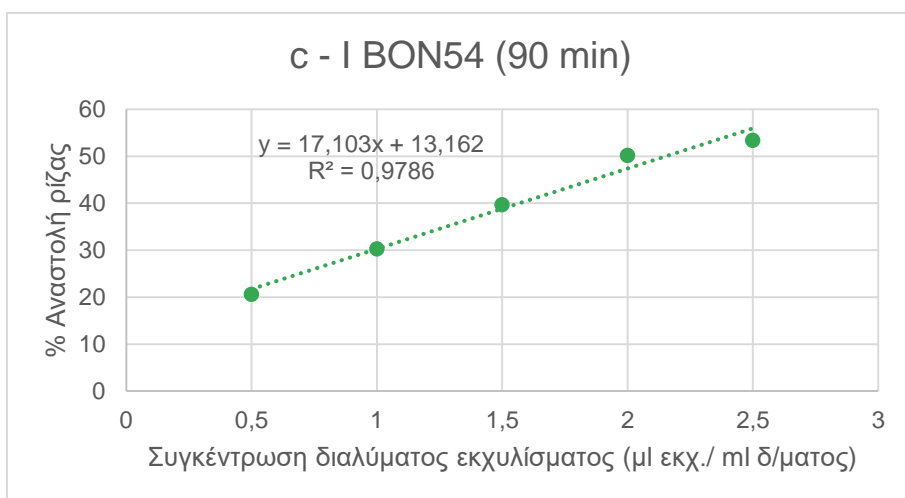
Διάγραμμα 74: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON53 για χρόνο επώασης 50 min.



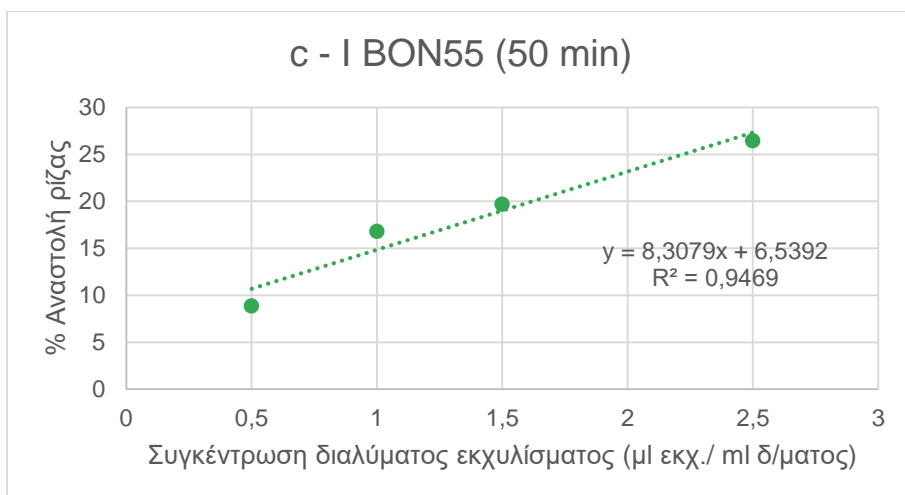
Διάγραμμα 75: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON53 για χρόνο επώασης 90 min.



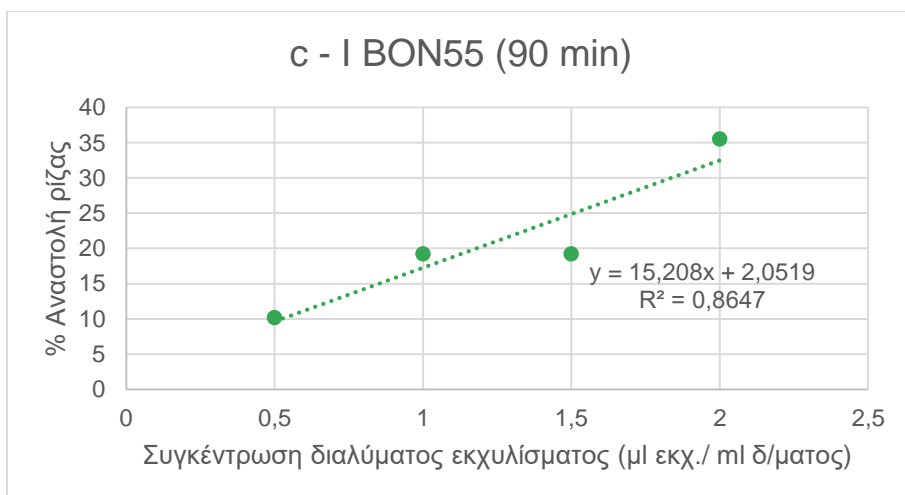
Διάγραμμα 76: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON54 για χρόνο επώασης 50 min.



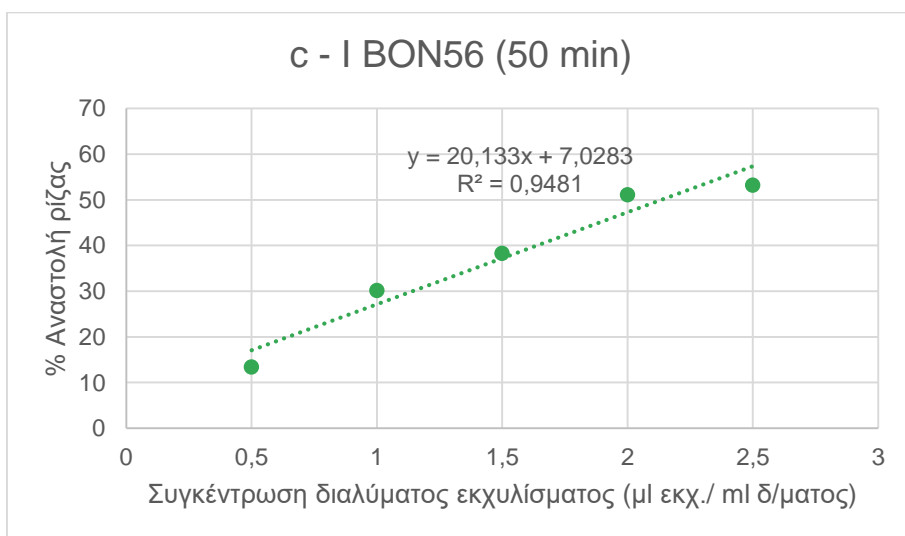
Διάγραμμα 77: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON54 για χρόνο επώασης 90 min.



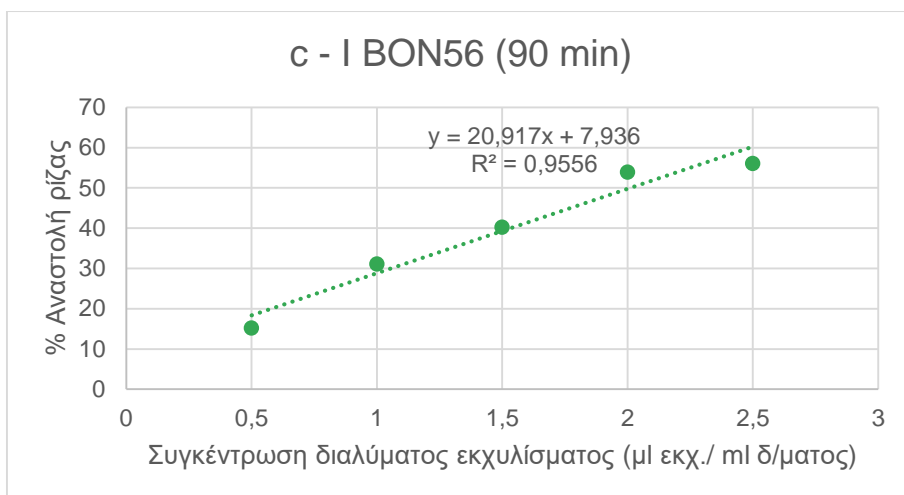
Διάγραμμα 78: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON55 για χρόνο επώασης 50 min.



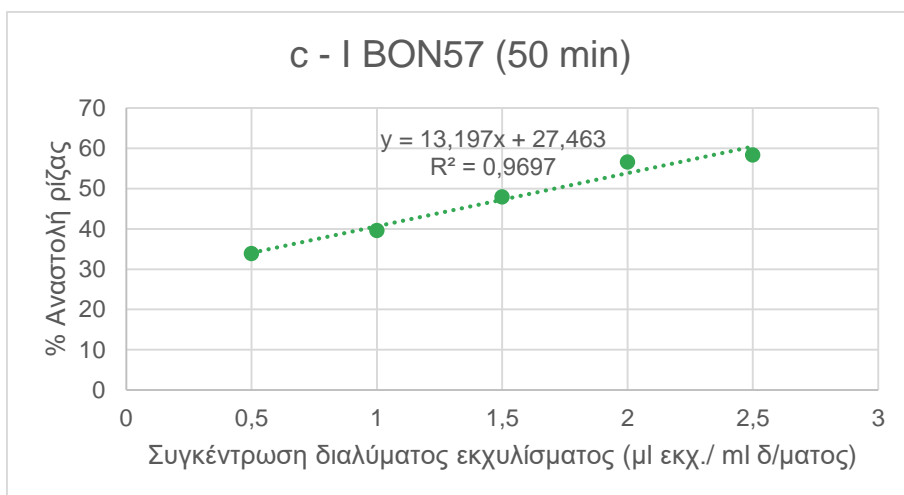
Διάγραμμα 79: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON55 για χρόνο επώασης 90 min.



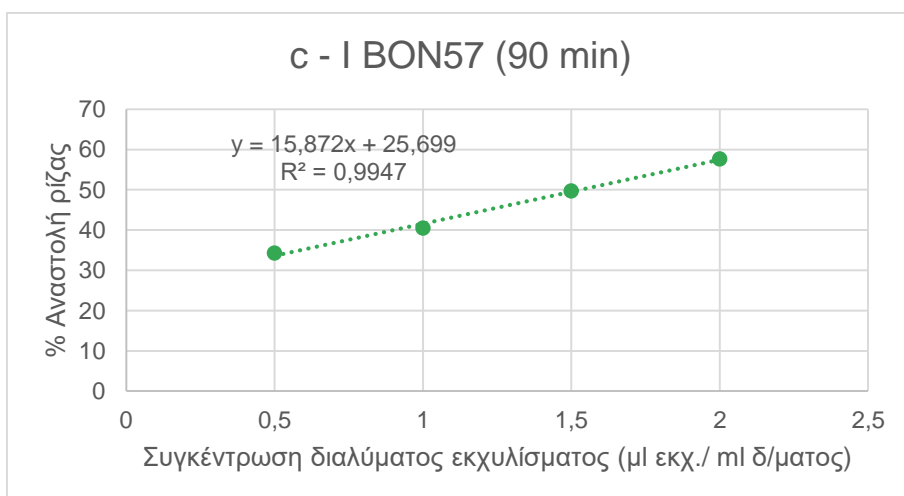
Διάγραμμα 80: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON56 για χρόνο επώασης 50 min.



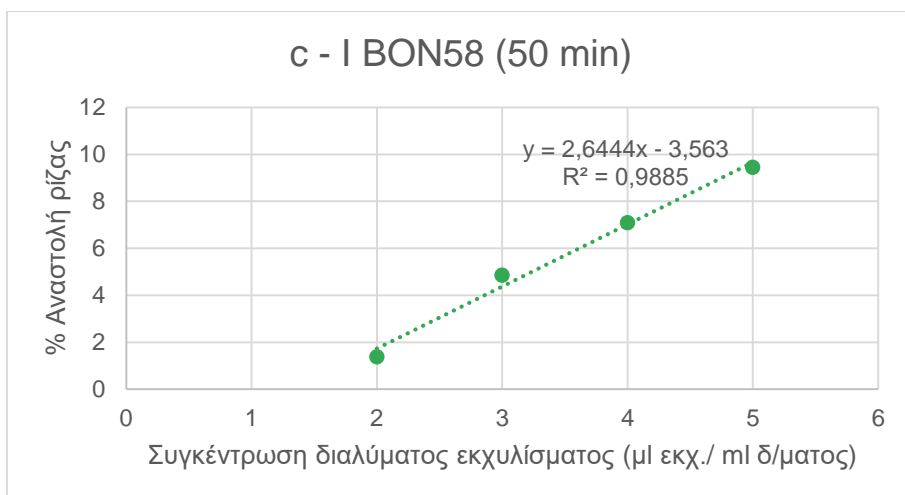
Διάγραμμα 81: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON56 για χρόνο επώασης 90 min.



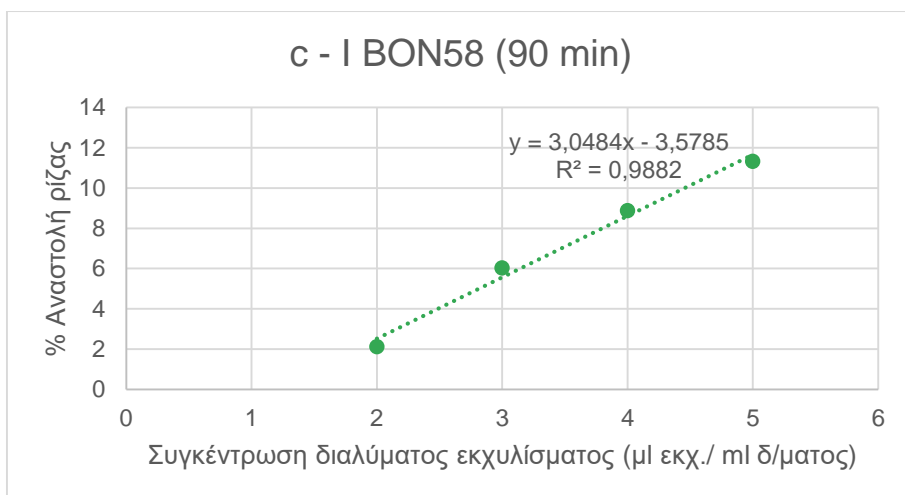
Διάγραμμα 82: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON57 για χρόνο επώασης 50 min.



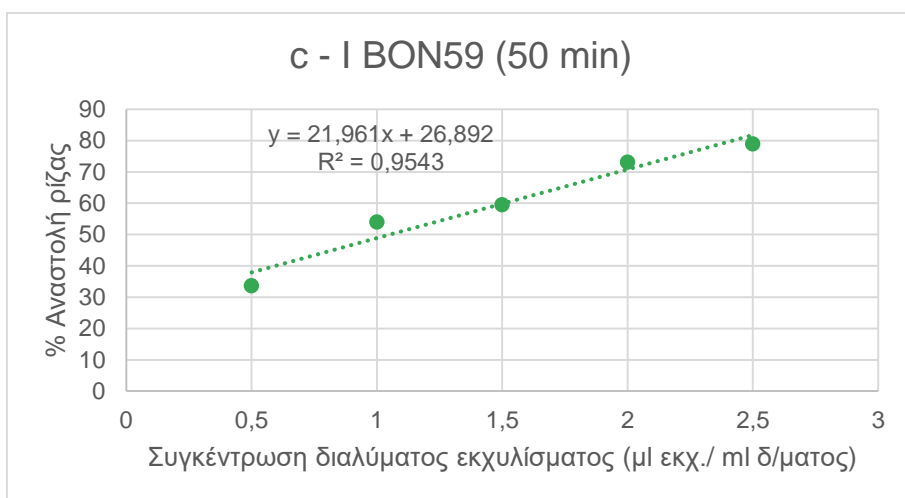
Διάγραμμα 83: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON57 για χρόνο επώασης 90 min.



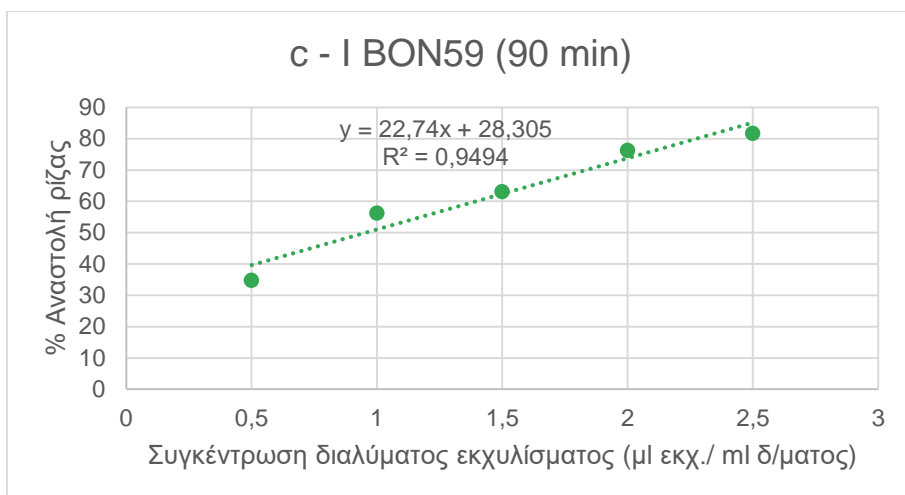
Διάγραμμα 84: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON58 για χρόνο επώασης 50 min.



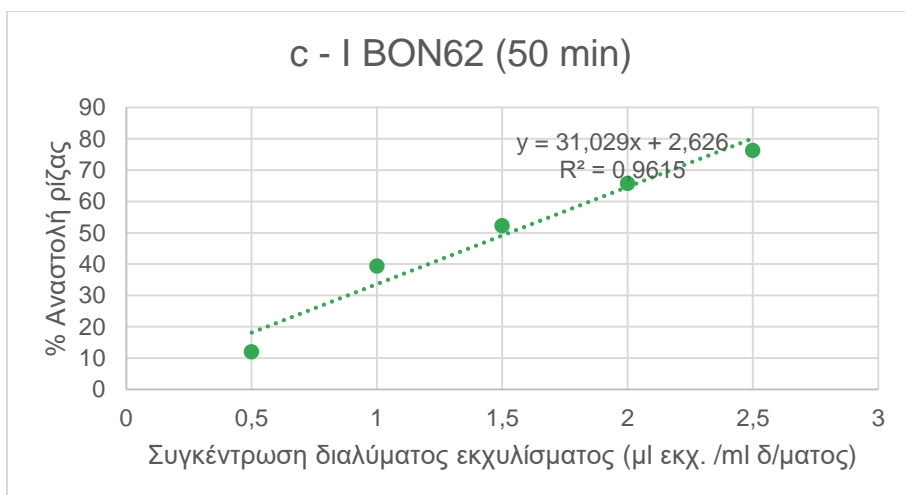
Διάγραμμα 85: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON58 για χρόνο επώασης 90 min.



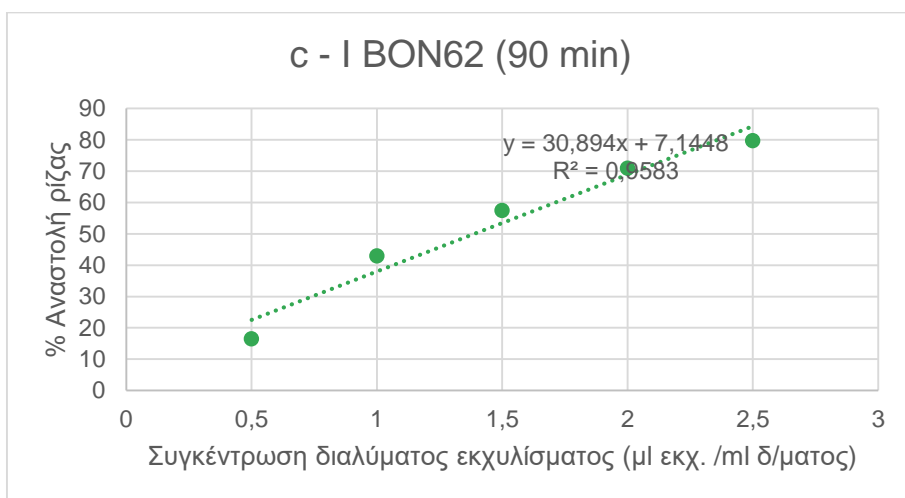
Διάγραμμα 86: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON59 για χρόνο επώασης 50 min.



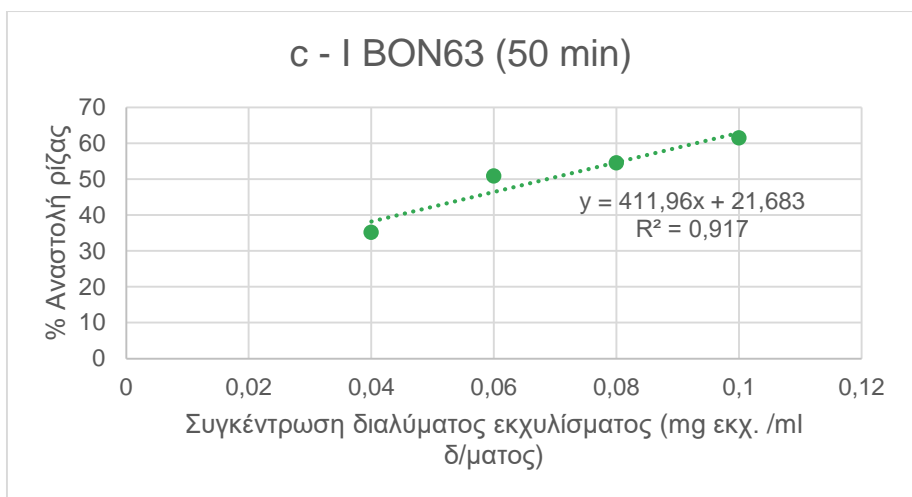
Διάγραμμα 87: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON59 για χρόνο επώασης 90 min.



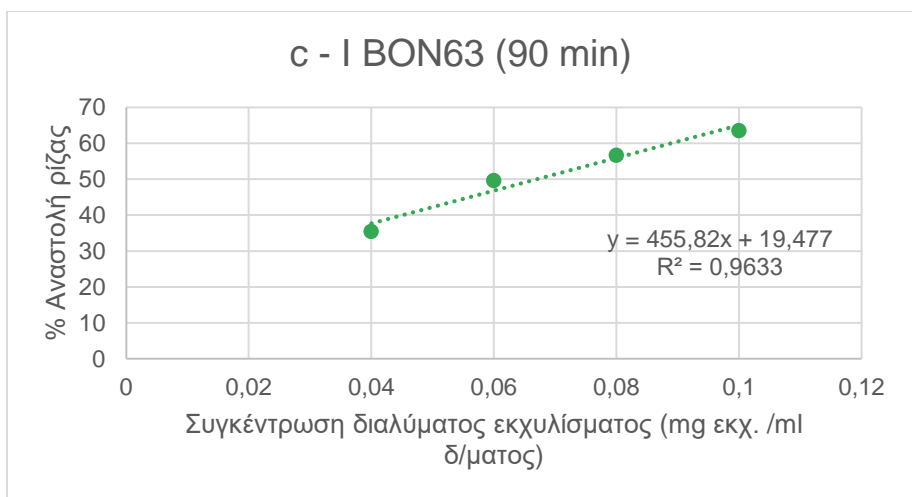
Διάγραμμα 88: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON62 για χρόνο επώασης 50 min.



Διάγραμμα 89: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON62 για χρόνο επώασης 90 min.



Διάγραμμα 90: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON63 για χρόνο επώασης 50 min.



Διάγραμμα 91: Διάγραμμα της % Αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος του εκχυλίσματος BON63 για χρόνο επώασης 90 min.