



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

Διπλωματική Εργασία

**Ανάπτυξη διεργασίας εκχύλισης χαμομηλιού
(*Matricaria chamomilla*) με χρήση φυσικών
βαθέως ευτηκτικών διαλυτών**

Γιολάντα Μπότση

Επιβλέπουσα: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια ΕΜΠ



Αθήνα, Οκτώβριος 2022

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το έτος 2021-2022 στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την κ. Δέτση για την ευχάριστη συνεργασία μας και για το εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα που μου εμπιστεύτηκε. Η καθοδήγηση της και οι εύστοχες επισημάνσεις της, μου ήταν πολύτιμες για την εξέλιξη της εργαστηριακής μου πορείας.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Ανδρομάχη Τζάνη για την θερμή βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε καθ'όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Παράλληλα, ευχαριστώ πολύ την υποψήφια διδάκτορα Μαρία-Άννα Καραδένδρου που ήταν πάντα στο πλευρό μου, και που με την δοτικότητα, την στήριξη και προθυμία της, με ενθάρρυνε και βοήθησε σημαντικά στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμα, δεν θα μπορούσα να παραλείψω το εργαστήριο Οργανικής Χημείας για την άψογη συνεργασία μας. Η ευγένεια και βοήθεια της ομάδας θα μου μείνει αξέχαστη, και τους ευχαριστώ θερμά για αυτό.

Τέλος, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην οικογένεια μου και στους φίλους μου, για την διαρκή υποστήριξη και συμπαράσταση καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι η ανάπτυξη μιας φιλικής προς το περιβάλλον διεργασίας για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το χαμομήλι. Συγκεκριμένα, για την ανάπτυξη της διεργασίας χρησιμοποιήθηκαν βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (NaDES, Natural Deep Eutectic Solvents) ως εκχυλιστικά μέσα, ενώ η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με συμβατική θέρμανση σε ελαιόλουτρο.

Το χαμομήλι αποτελεί ένα θεραπευτικό βότανο, το οποίο χρησιμοποιούταν από την αρχαιότητα ως φάρμακο για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Περιέχει μια πληθώρα φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων με θεραπευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις, όπως η απιγενίνη, ένα φλαβονοειδές με αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση.

Για την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων σχεδιάστηκαν και παρασκευάστηκαν 6 φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες αποτελούν μείγματα 2 ή 3 πρωτογενών μεταβολίτων όπως αμινοξέα, σάκχαρα, αλκοόλες κ.ά. Βασικά χαρακτηριστικά των διαλυτών αυτών είναι η χαμηλή τοξικότητα τους και η ασφαλής μέθοδος παρασκευής τους, ιδιότητες που τους καθιστούν σημαντικούς υποψήφιους για την αντικατάσταση των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών σε διεργασίες εκχύλισης, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την βιωσιμότητα της διεργασίας.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα δομικά χαρακτηριστικά για των διαλυτών μέσω των φασμάτων FTIR και NMR που λήφθηκαν, καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως το pH και η πολικότητά τους. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις και επιλέχθηκε ο καταλληλότερος διαλύτης βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς και του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων. Ο διαλύτης με τα καλύτερα αποτελέσματα βρέθηκε πως ήταν το NaDES D-γλυκόζη: D, L - γαλακτικό οξύ: νερό σε αναλογία 1:5:6,2 (επισημαίνεται ότι το νερό περιέχεται στην εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία του γαλακτικού οξέος σε ποσοστό 20% w/w), ενώ η προσθήκη νερού ως συνδιαλύτη, ενίσχυσε ακόμα περισσότερο την εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων. Έτσι, ο διαλύτης επιλέχθηκε για την βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης μέσω του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν κατά την ανάπτυξη του πειραματικού σχεδιασμού είναι ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη και η κατά βάρος περιεκτικότητα του προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη. Ως μεταβλητές απόκρισης επιλέχθηκαν το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC) και σε φλαβονοειδή (TFC), ενώ για λόγους πληρότητας προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση με χρήση της δοκιμής DPPH.

Από την βελτιστοποίηση της εκχύλισης βρέθηκε ότι τόσο η αύξηση του χρόνου εκχύλισης, όσο και της ποσότητας προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη μπορούν να ενισχύσουν την εκχύλιση των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, ενώ συνιστάται η μείωση της αναλογίας μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις βελτιστοποιήσεις: η πρώτη αφορά την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων, η δεύτερη αφορά την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών και η τρίτη αποσκοπεί στην ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των δύο μεταβλητών απόκρισης. Ενδεικτικά παρατίθεται πως για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των TPC και TFC οι συνθήκες που απαιτούνται είναι οι εξής: χρόνος εκχύλισης 5,79 ώρες, περιεκτικότητα νερού ως συνδιαλύτης 33,86% w/w και αναλογία μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη 20 (mg/g). Τέλος, η εγκυρότητα του μοντέλου επιβεβαιώθηκε με την πραγματοποίηση του πειράματος επιβεβαίωσης.

Λέξεις κλειδιά:

- Χαμομήλι, εκχύλιση, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESs), φάσματα NMR και FTIR, ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών, αντιοξειδωτική δράση, πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken, βελτιστοποίηση.

Abstract

The aim of this diploma thesis is to develop an environmentally friendly process for the extraction of bioactive compounds from chamomile. In particular, for the development of the process, deep eutectic solvents of natural origin (NaDES, Natural Deep Eutectic Solvents) were used as extraction media, while the extraction was carried out by conventional heating in an oil bath.

Chamomile is a medicinal herb that has been used since ancient times as a medicine to treat various diseases. It contains a multitude of phenolic and flavonoid compounds with therapeutic and antioxidant effects, such as apigenin, a flavonoid with proven anti-cancer activity.

For the extraction of bioactive compounds, 6 natural deep eutectic solvents were designed and prepared. The synthesized solvents are mixtures of 2 or 3 primary metabolites such as amino acids, sugars, alcohols, etc. Key characteristics of these solvents are their low toxicity and safe preparation method, properties that make them important candidates for replacing traditional organic solvents in extraction processes, thus enhancing the sustainability of the process.

Initially, the structural characteristics of the solvents were studied through the obtained FTIR and NMR spectrum, as well as their physicochemical characteristics, such as their pH and polarity. Subsequently, extractions were carried out and the most suitable solvent was selected based on the results obtained from the evaluation of the antioxidant activity as well as the total phenolic compounds (TPC) and flavonoids (TFC) content of the extracts.

The solvent with the best results was found to be NaDES D-glucose: D, L - lactic acid: Water in a ratio of 1:5:6,2 (note that water is contained in the commercially available package of lactic acid at a rate of 20% w /w), while the addition of water as a co-solvent further enhanced the extraction of bioactive compounds. Thus, the solvent was selected to optimize the extraction process through Box-Behnken type experimental design. The parameters studied during the development of the experimental design are the extraction time, the mass ratio of chamomile to the mass of solvent and the content by weight of the added water as a co-solvent. The total content of phenolic compounds (TPC) and flavonoids (TFC) were selected as response variables, while for the sake of completeness, their antioxidant activity was determined using the DPPH method.

From the optimization of the extraction, it was found that both increasing the extraction time and the amount of water added as co-solvent can enhance the extraction of phenolic and flavonoid compounds, while it is recommended to reduce the ratio of mass of chamomile to mass of solvent. In total, three optimizations were carried out: the first concerns the maximization of the total content of phenolic compounds, the second concerns the maximization of the

total content of flavonoids and the third aims at the simultaneous maximization of the two response variables. Indicatively, it is stated that for the simultaneous maximization of TPC and TFC the conditions required are the following: extraction time 5,79 hours, water content as co-solvent 33,86% w/w and chamomile mass to solvent mass ratio 20 (mg/g). Finally, the validity of the model was confirmed by conducting the confirmation experiment.

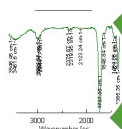
Keywords:

- Chamomile, extraction, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs), NMR and FTIR spectrum, Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, antioxidant activity, Box-Behnken experimental design, optimization.

Graphical Abstract



NaDES synthesis



NaDES structural characterization

• FTIR & NMR

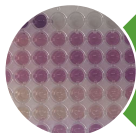


NaDES physicochemical characterization

• pH & polarity

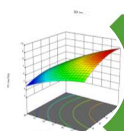


Chamomile extraction



Extracts evaluation

• TPC, TFC & DPPH



Box Behnken Design of Experiments

• Extraction optimization

Περιεχόμενα

Πρόλογος	2
Περίληψη.....	3
Abstract	5
Graphical Abstract	7
Κατάλογος Γραφημάτων	11
Κατάλογος Εικόνων	16
Κατάλογος Σχημάτων	16
Κατάλογος Πινάκων	17
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή	18
1.1 Χαμομήλι: Ιδιότητες και εφαρμογές από το παρελθόν μέχρι και σήμερα	18
1.1.1 Ιατρικές Εφαρμογές του Χαμομηλιού	19
1.1.2 Συστατικά άνθους χαμομηλιού	21
1.1.3 Φαινολικές ενώσεις.....	23
1.1.3.1 Καφεϊκό οξύ	23
1.1.3.2 Χλωρογενικό οξύ.....	24
1.1.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων.....	24
1.1.4 Φλαβονοειδή	25
1.1.4.1 Απιγενίνη.....	26
1.1.4.2 Μέθοδος προσδιορισμού φλαβονοειδών ενώσεων.....	27
1.1.5 Αντιοξειδωτική δράση	27
1.1.5.1 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών	28
1.2 Πράσινη Χημεία	29
1.2.1 Πράσινη Εκχύλιση Φυσικών Προϊόντων	34
1.2.2 Αρχές Πράσινης Εκχύλισης.....	34
1.3 Συμβατική εκχύλιση & παράμετροι επίδρασης	36
1.4 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESS)	37
1.4.1 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESS).....	38
1.4.2 Μέθοδοι παρασκευής των DESS	39
1.4.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESS.....	39
1.4.3.1 Πυκνότητα.....	40
1.4.3.2 Ιξώδες	40
1.4.3.3 Ιοντική αγωγιμότητα.....	40
1.4.3.4 Επιφανειακή τάση.....	40
1.4.3.5 Πολικότητα.....	41
1.4.3.5.1 Προσδιορισμός πολικότητας	41

1.4.3.6 pH	41
1.4.3.7 Επίδραση προσθήκης νερού στις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs.....	42
1.4.4 Εφαρμογές των DESs.....	42
1.5 Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DoE).....	44
1.5.1 Μέθοδος επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM).....	44
1.5.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken	45
1.6 Μέθοδοι Ταυτοποίησης.....	46
1.6.1 Φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	46
1.6.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	47
Κεφάλαιο 2ο: Πειραματικό Μέρος	49
2.1 Σκοπός	49
2.2 Όργανα και αντιδραστήρια	49
2.3 Σύνθεση των NaDESs	50
2.4 Χαρακτηρισμός NaDESs	54
2.4.1 Δομικός χαρακτηρισμός NaDESs.....	54
2.4.2 Προσδιορισμός πολικότητας.....	54
2.4.2 Προσδιορισμός pH	55
2.5 Εκχύλιση χαμομηλιού με NaDES και θέρμανση σε ελαιόλουτρο.....	55
2.5.1 Προετοιμασία πρώτης ύλης.....	55
2.5.2 Εκχύλιση χαμομηλιού.....	55
2.6 Πειραματικός σχεδιασμός.....	56
2.7 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων	57
2.7.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων	57
2.7.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων	58
2.7.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων.....	59
Κεφάλαιο 3ο: Αποτελέσματα	61
3.1 Χαρακτηρισμός Διαλυτών.....	61
3.1.1 Δομικός χαρακτηρισμός	61
3.1.2 Πολικότητα & pH.....	63
3.2 Ολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή.....	64
3.3 Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων	65
3.4 Πειραματικός σχεδιασμός.....	77
3.4.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC).....	78
3.4.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC)	81
3.4.3 Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης	84
3.4.3.1 Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	84
3.4.3.2 Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	86

3.4.3.2 Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC)	89
3.4.3 Επιβεβαίωση του μοντέλου	91
3.5 Αξιολόγηση Αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού.....	91
Κεφάλαιο 4° : Συμπεράσματα	94
Κεφάλαιο 5° : Προτάσεις για το μέλλον	96
Κεφάλαιο 6°: Βιβλιογραφία	97
Παράρτημα.....	102

Κατάλογος Γραφημάτων

Διάγραμμα 1: Γραφική αναπαράσταση τιμών του ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) των εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.	65
Διάγραμμα 2: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	66
Διάγραμμα 3: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	67
Διάγραμμα 4: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	67
Διάγραμμα 5: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	68
Διάγραμμα 6: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	68
Διάγραμμα 7: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	69
Διάγραμμα 8: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	69
Διάγραμμα 9: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	70
Διάγραμμα 10: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	70
Διάγραμμα 11: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	71
Διάγραμμα 12: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	71
Διάγραμμα 13: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	72
Διάγραμμα 14: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	72
Διάγραμμα 15: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	73
Διάγραμμα 16: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	73

Διάγραμμα 17: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.....	74
Διάγραμμα 18: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	74
Διάγραμμα 19: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	75
Διάγραμμα 20: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.	75
Διάγραμμα 21: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.	76
Διάγραμμα 22: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.	76
Διάγραμμα 23: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	80
Διάγραμμα 24: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	83
Διάγραμμα 25: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A.....	85
Διάγραμμα 26: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και A για τη βέλτιστη τιμή C.....	86
Διάγραμμα 27: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C.....	87
Διάγραμμα 28: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B.	88
Διάγραμμα 29: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A.....	88
Διάγραμμα 30: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τον ελάχιστο χρόνο εκχύλισης (αριστερά) και τον μέγιστο χρόνο εκχύλισης (δεξιά).....	90
Διάγραμμα 31: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τον ελάχιστο χρόνο εκχύλισης (αριστερά) και τον μέγιστο χρόνο εκχύλισης (δεξιά).....	90
Διάγραμμα 32: Γραφική αναπαράσταση αποτελεσμάτων μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.	92
Διάγραμμα 33: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.....	102
Διάγραμμα 34: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	103
Διάγραμμα 35: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	103

Διάγραμμα 70: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB50, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,016 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	121
Διάγραμμα 71: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB50, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,016 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	121
Διάγραμμα 72: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.....	122
Διάγραμμα 73: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	122
Διάγραμμα 74: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	123
Διάγραμμα 75: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.....	123
Διάγραμμα 76: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.....	124
Διάγραμμα 77: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.....	124
Διάγραμμα 78: Γράφημα της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος (mg/mL) συναρτήσει της απορρόφησης στα 755 nm.	125
Διάγραμμα 79: Γράφημα της συγκέντρωσης της κατεχίνης (mg/mL) συναρτήσει της απορρόφησης στα 500 nm.	125

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Άνθος χαμομηλιού. ⁵	18
Εικόνα 2: Βιολογικές Ιδιότητες του <i>Matricaria chamomilla</i> . ⁸	20
Εικόνα 3: Δευτερογενείς μεταβολίτες του <i>Matricaria chamomilla</i> . ¹⁰	22
Εικόνα 4: Αντίδραση γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu με αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε μπλε ¹⁶	25
Εικόνα 5: Αναπαράσταση αλλαγής χρώματος του φλαβονοειδούς κουερκετίνη κατά την συμπλοκοποίησή του με το Al(III). ²⁰	27
Εικόνα 6: Αναπαράσταση αλλαγής χρώματος κατά την δημιουργία ανηγμένης μορφής DPPH. ¹⁶	29
Εικόνα 7: Το δέντρο της Πράσινης Χημείας. ³⁰	33
Εικόνα 8: Διαφοροποίηση σημείου τήξεως ευτηκτικού μίγματος (A) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (B) δύο συστατικών σε διάγραμμα δύο φάσεων. Mp: σημείο τήξης, ΔTf: πτώση σημείου τήξης, Ec: ευτηκτική σύσταση, Ep: ευτηκτικό σημείο. ³⁶	37
Εικόνα 9: Συνήθεις δέκτες (αριστερά) και δότες (δεξιά) δεσμών υδρογόνου για την παρασκευή βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. ⁸	38
Εικόνα 10: Αναπαράσταση σχεδιασμού τύπου Box-Behnken για τρεις παραμέτρους. ⁵⁰	45
Εικόνα 11: Τρόποι μοριακών δονήσεων. ⁵⁸	47
Εικόνα 12: Περιοχές φάσματος IR για διάφορους τύπους δεσμών. ⁵⁸	47
Εικόνα 13: Φάσμα FTIR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2.....	61
Εικόνα 14: Φάσμα ¹ H NMR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2 (300 MHz, DMSO, d ₆).....	62
Εικόνα 15: Φάσμα ¹ H NMR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2 (300 MHz, DMSO, d ₆).....	63
Εικόνα 16: Φάσμα FTIR για το DES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3.	126
Εικόνα 17: Φάσμα ¹ H NMR για το DES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3 (600 MHz, DMSO, d ₆).	126
Εικόνα 18: Φάσμα FTIR για το DES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό 1:2:2,5.....	127
Εικόνα 19: Φάσμα ¹ H NMR για το DES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό 1:2:2,5 (600 MHz, DMSO,d ₆).....	127

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Χημικός τύπος καφεϊκού οξέος.....	23
Σχήμα 2: Χημικός τύπος χλωρογενικού οξέος.....	24
Σχήμα 3: Βασική δομή των φλαβονοειδών.....	25
Σχήμα 4: Χημικός τύπος απιγενίνης.....	26

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα	49
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα	50
Πίνακας 3: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:2.....	51
Πίνακας 4: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES γλυκόζη-γαλακτικό οξύ-νερό.	51
Πίνακας 5: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό.	52
Πίνακας 6: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3.....	53
Πίνακας 7: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη-νερό.	53
Πίνακας 8: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES φρουκτόζη- γλυκερόλη – νερό.....	54
Πίνακας 9: Κωδικοποίηση και συνθήκες εκχύλισης πρώτης σειράς πειραμάτων.....	56
Πίνακας 10: Κωδικοποίηση και συνθήκες πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.	57
Πίνακας 11: Τιμές λ_{max} και E_{NR} των NaDESS.....	64
Πίνακας 12: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.....	64
Πίνακας 13: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.....	77
Πίνακας 14: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού καθώς και συνθήκες εκχύλισης.....	78
Πίνακας 15: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Quadratic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	79
Πίνακας 16: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	80
Πίνακας 17: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Cubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	82
Πίνακας 18: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	82
Πίνακας 19: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών.....	84
Πίνακας 20: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών.....	86
Πίνακας 21: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών.....	89
Πίνακας 22: Πειραματικά αποτελέσματα ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων του πειράματος επιβεβαίωσης του μοντέλου.....	91
Πίνακας 23: Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού καθώς και συνθήκες εκχύλισης.....	91

Κεφάλαιο 1^ο : Εισαγωγή

1.1 Χαμομήλι: Ιδιότητες και εφαρμογές από το παρελθόν μέχρι και σήμερα

Το χαμομήλι αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο βότανο με πλούσια ιατρική ιστορία. Οι ανθοκεφαλές του μοιάζουν με αυτές της μαργαρίτας, καθώς το κέντρο τους είναι κίτρινου χρώματος, διαμέτρου 1-1,5 cm, ενώ φέρει περίπου 15-20 λευκά πέταλα περιμετρικά. Ο βλαστός του είναι όρθιος, λεπτός με πολλές διακλαδώσεις, όπου καθεμιά καταλήγει σε ένα άνθος. Το ύψος του κυμαίνεται από τα 20 έως τα 80 εκατοστά, ενώ τα φύλλα του είναι μακριά και λεπτά. Γενικά, στην βοτανολογία κυριαρχούν δύο είδη χαμομηλιού, το γερμανικό, το οποίο αναφέρεται ως *Matricaria Chamomilla*, και το ρωμαϊκό χαμομήλι, που ονομάζεται *Chamaemelum Nobile*. Τα δύο αυτά είδη ανήκουν στην οικογένεια *Asteraceae* και παρουσιάζουν ομοιότητες τόσο στην εμφάνιση, όσο και στις ιδιότητές τους.¹ Εδώ και χιλιάδες χρόνια, το χαμομήλι χρησιμοποιείται σε θεραπείες και ήταν ευρέως γνωστό στην Αρχαία Ελλάδα, Αίγυπτο και Ρώμη. Μάλιστα, η σχέση του με τον αρχαιοελληνικό πολιτισμό μαρτυρείται από το όνομά του, καθώς προέρχεται από τις λέξεις *chamos* (κάτω στο έδαφος) και *melos* (μήλο) και αποδίδονται στην μικρή τάση ανάπτυξής του και στο ζεστό άρωμα μήλου των ανθών του. Ακόμα, οι αρχαίοι Έλληνες ιατροί συνταγογραφούσαν το χαμομήλι για τους πονοκεφάλους, τις νεφροπάθειες, και τις παθήσεις του ήπατος και της ουροδόχου κύστης, ενώ αναφορές για τις θεραπευτικές του ιδιότητες γίνονται σε γραπτά του Γαληνού, του Ιπποκράτη και του Διοσκουρίδη. Το βότανο είχε ιδιαίτερη σημασία στην αρχαία Αίγυπτο, καθώς θεωρούταν ιερό φυτό, το οποίο αφιέρωναν στο Θεό Ήλιο και χρησιμοποιούταν για την αντιμετώπιση του πυρετού και της αϋπνίας.^{2,3}

Επίσης, το χαμομήλι έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες ως αντιφλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό και επουλωτικό φάρμακο. Χρησιμοποιούταν κατεξοχήν για την θεραπεία πληγών, δερματικών εξανθημάτων, εγκαυμάτων και οφθαλμολογικών παθήσεων. Με την μορφή υδατικού εκχυλίσματος το χαμομήλι μέχρι και σήμερα καταναλώνεται ως ήπιο ηρεμιστικό για την μείωση του άγχους, την αντιμετώπιση προβλημάτων στον ύπνο και τον κατευνασμό των νεύρων. Τέλος, έχει αναγνωριστεί η εφαρμογή του για την αντιμετώπιση διαφόρων δυσλειτουργιών του πεπτικού συστήματος όπως η ανορεξία, η διάρροια, η δυσπεψία και η ναυτία.⁴ Λόγω της ευρείας αποδοχής του ως αποτελεσματικός φαρμακευτικός παράγοντας, το χαμομήλι αναφέρεται ως επίσημο φάρμακο στις φαρμακοποιίες 26 χωρών, και ενδεικτικά παρατίθενται το Βέλγιο, η Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο



Εικόνα 1: Άνθος χαμομηλιού.⁵

και η Γερμανία.²

Βέβαια, πέρα από τις φαρμακευτικές του εφαρμογές, το χαμομήλι παρουσιάζει πληθώρα καλλυντικών εφαρμογών και προστίθεται με την μορφή εκχυλίσματος σε κρέμες και προϊόντα περιποίησης μαλλιών, καθώς είναι ασφαλές για το δέρμα, αφήνει μια απαλή αίσθηση και μπορεί να τονώσει την υγιή ανάπτυξη των μαλλιών.⁶

1.1.1 Ιατρικές Εφαρμογές του Χαμομηλιού

Αντιμετώπιση διαβήτη

Σύμφωνα με μελέτες, η κατανάλωση χαμομηλιού μπορεί να βελτιώσει την υπεργλυκαιμία και τις διαβητικές επιπλοκές, καθώς καταστέλλει τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, αυξάνει την αποθήκευση του γλυκογόνου στο ήπαρ και αναστέλλει την σορβιτόλη στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Η φαρμακολογική δράση του εκχυλίσματος είναι ανεξάρτητη από την έκκριση της ινσουλίνης, ενώ επίσης έχει αποδειχθεί ότι το εκχύλισμα δύναται να προστατεύει τα β παγκρεατικά κύτταρα μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες, που σχετίζεται με την υπεργλυκαιμία.⁴

Θεραπεία εκζέματος

Μελέτες αποδεικνύουν ότι η τοπική εφαρμογή εκχυλίσματος χαμομηλιού παρουσιάζει μέτρια αποτελεσματική δράση για την αντιμετώπιση του ατοπικού εκζέματος. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το εκχύλισμα διαθέτει αποτελεσματικότητα ίση με το 60% της αποτελεσματικότητας της κρέμας υδροκορτιζόνης 0,25%. Ένα φαρμακευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται για την απαλλαγή από τις ενοχλήσεις του εκζέματος, είναι η κρέμα Kamillosan®, η οποία έχει ως βάση το εκχύλισμα χαμομηλιού. Σε μελέτη που διεξήχθη για την σύγκριση της κρέμας εκχυλίσματος χαμομηλιού Kamillosan® με κρέμα υδροκορτιζόνης 0,5% σε ασθενείς που έπασχαν από ατοπικό έκζεμα μέτριου βαθμού, αποδείχθηκε μετά από θεραπείες δύο εβδομάδων ότι η κρέμα εκχυλίσματος χαμομηλιού παρουσίασε μια μικρή υπεροχή έναντι της κρέμας υδροκορτιζόνης 0,5%.⁴

Πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων

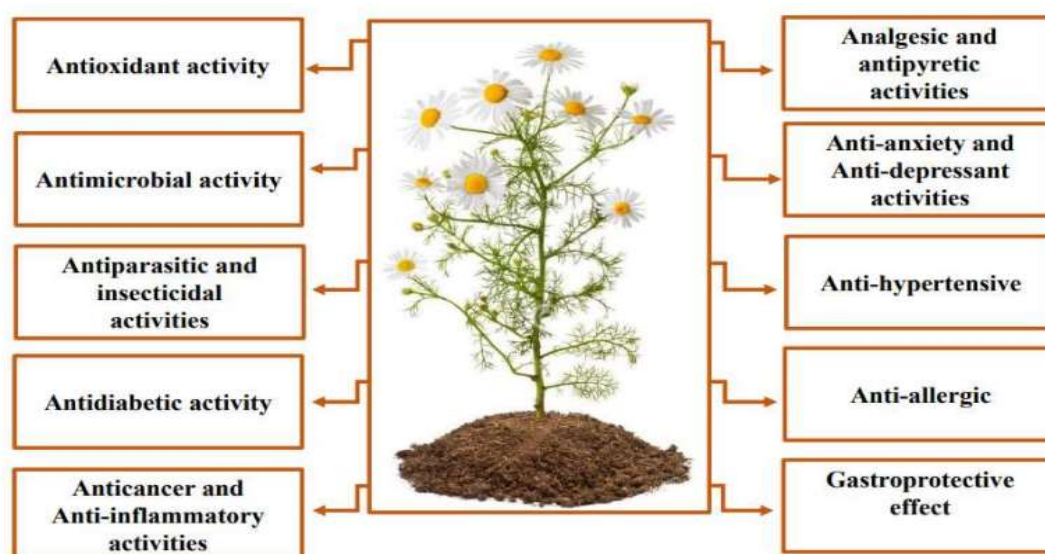
Η συχνή κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε φλαβονοειδή φαίνεται πως μπορεί να μειώσει τόσο τον κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο, όσο και την συχνότητα εμφράγματος του μυοκαρδίου σε ηλικιωμένους άνδρες. Ακόμα, σε μελέτη όπου συμμετείχαν 12 ασθενείς με καρδιακά νοσήματα, πραγματοποιήθηκαν αιμοδυναμικές μετρήσεις 30 λεπτά μετά την κατανάλωση τσαγιού χαμομηλιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια μικρή, αλλά αρκετά σημαντική μείωση της πίεσης της βραχιόνιας αρτηρίας.⁴

Αντιμετώπιση αγχώδους διαταραχής

Η μακροχρόνια κατανάλωση χαμομηλιού φαίνεται πως είναι μια αρκετά ασφαλής και ικανή μέθοδος για την μείωση των συμπτωμάτων της αγχώδους διαταραχής. Ενδεικτικά, παρατίθεται μελέτη όπου κατά την πρώτη φάση, 179 άτομα έλαβαν για 12 εβδομάδες εκχύλισμα χαμομηλιού φαρμακευτικής ποσότητας 1500 mg (3 κάψουλες των 500 mg ημερησίως). Στην δεύτερη φάση των κλινικών μελετών, ένα τυχαίο μέρος των ατόμων συνέχισε την δοκιμή με το χαμομήλι, ενώ το υπόλοιπο μέρος συνέχισε με θεραπεία placebo. Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες που είχαν συνεχίσει την θεραπεία με το χαμομήλι είχαν σημαντικά ηπιότερα συμπτώματα, σε σύγκριση με τους συμμετέχοντες που είχαν συνεχίσει την θεραπεία placebo.⁷

Αντικαρκινική δράση

Οι περισσότερες αναφορές που πραγματεύονται την αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων από το χαμομήλι, περιλαμβάνουν μελέτες σχετικές με την απιγενίνη, ένα από τα βιοδραστικά συστατικά του χαμομηλιού. Μελέτες που στηρίχθηκαν σε προκλινικά μοντέλα του καρκίνου του μαστού, του δέρματος και των ωοθηκών έδειξαν ότι το συστατικό αυτό παρουσιάζει πολλά υποσχόμενες ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη του καρκίνου. Ακόμα, μελέτη αναφέρει πως το εκχύλισμα χαμομηλιού εμφανίσε ελάχιστη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων, αλλά παρουσίασε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας διάφορων καρκινικών κυττάρων. Τέλος, δοκιμές που έγιναν με εκχύλισμα από το μείγμα επτά βοτάνων συμπεριλαμβανομένου και του χαμομηλιού, απέδειξαν τόσο in vitro όσο και in vivo σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες για την θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.⁴

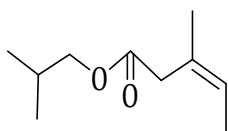


Εικόνα 2: Βιολογικές Ιδιότητες του *Matricaria chamomilla*.⁸

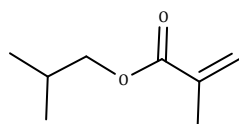
1.1.2 Συστατικά άνθους χαμομηλιού

Τα άνθη χαμομηλιού περιέχουν κυρίως φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη, η κερκετίνη, η πατουλετίνη, η λουτεολίνη μαζί με τους γλυκοζίτες τους. Ακόμα, στα άνθη εντοπίζονται κουμαρίνες και δικυκλοαιθέρες. Κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου που εξάγεται από τα άνθη χαμομηλιού είναι το τερπενοειδές α-βισαβόλη, καθώς και τα οξείδια και τα αζουλένια της, συμπεριλαμβανομένου του χαμαζουλένιου, το οποίο παρουσιάζει πλούσια αντιοξειδωτική δράση. Επισημαίνεται ότι οι φαρμακευτικές ιδιότητές του χαμομηλιού οφείλονται στις κουμαρίνες και τα φλαβονοειδή του, ενώ αποτελεί την πλουσιότερη πηγή της απιγενίνης με περιεκτικότητα 840 mg ανά 100 g χαμομηλιού.⁹

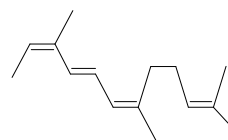
Συνολικά πάνω από 120 χημικά συστατικά έχουν ταυτοποιηθεί ως δευτερογενείς μεταβολίτες στο άνθος χαμομηλιού, συμπεριλαμβανομένων 28 τερπενοειδών, 36 φλαβονοειδών και 52 επιπλέον ενώσεων με πιθανή φαρμακολογική δράση. Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε διαφορετικές ποσότητες και αναλογίες σε διάφορα σημεία του βοτάνου, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και τον χρόνο συλλογής του. Για παράδειγμα, η ποσότητα α-βισαβόλης και των οξέων της βρέθηκε μέγιστη, όταν τα άνθη συλλέχθηκαν κατά την περίοδο πλήρης άνθησης, ενώ στη συνέχεια μειώθηκαν. Επίσης, η περιεκτικότητα σε χαμαζουλένιο ήταν μεγαλύτερη στα πλήρως ανεπτυγμένα άνθη σε σχέση με τα άνθη που ήταν ακόμα υπό ανάπτυξη. Τέλος, η αποσύνθεση του βοτάνου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη συσσώρευση αιθέριου ελαίου.¹⁰



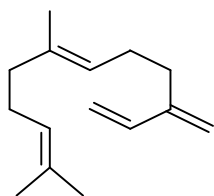
1. Isobutyl angelate



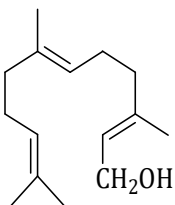
2. 2-Methylbutyl angelate



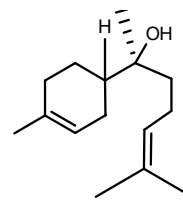
3. Farnesene



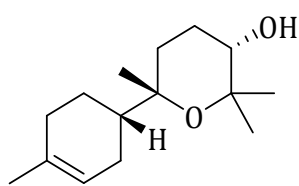
4. β -Farnesene



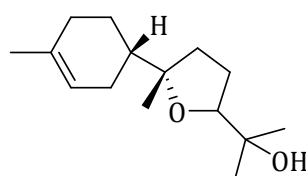
5. Farnesol



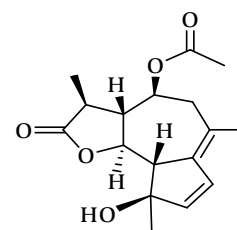
6. (-)- α -bisabolol



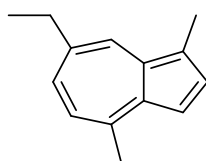
7. Bisabolol oxide A



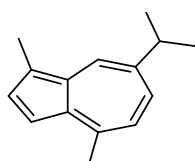
8. Bisabolol oxide B



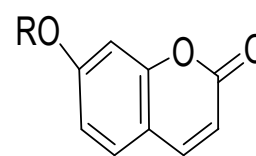
9. Matricin



10. Chamazulene

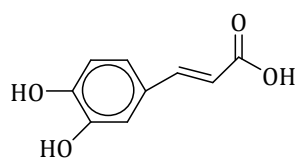


11. Guaiazulene

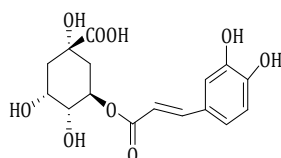


12. Umbelliferone (R=H)

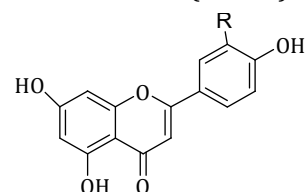
13. Herniarin (R=CH₃)



14. Caffeic Acid

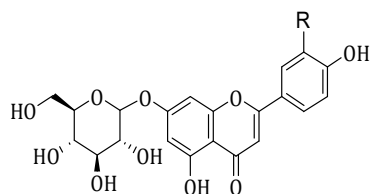


15. Chlorogenic Acid



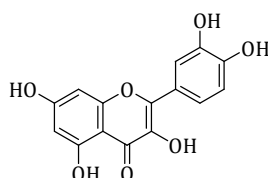
16. Apigenin (R=H)

17. Luteolin (R=OH)

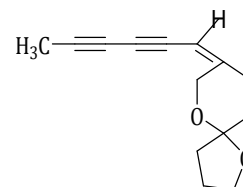


18. Apigenin-7-O Glucoside (R=H)

19. Luteolin-7-O-Glucoside (R=OH)



20. Quercetin



21. Z-Enyne dicycloether

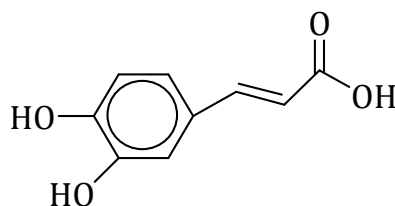
Εικόνα 3: Δευτερογενείς μεταβολίτες του *Matricaria chamomilla*.¹⁰

1.1.3 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους φυτικούς ιστούς, καθώς και στα βρώσιμα μέρη τους, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά. Όλες οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα υδροξύλιο, και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: τα φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των φαινολικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και παρουσιάζουν την μεγαλύτερη βιοδραστικότητα. Τα μη φλαβονοειδή παρουσιάζουν μικρότερη και απλούστερη δομή από τα φλαβονοειδή, αλλά υπάρχουν ορισμένα με πολύπλοκες δομές και μεγάλα μοριακά βάρη. Η σημαντικότερη ομάδα μη φλαβονοειδών που εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα φυτά είναι τα φαινολικά οξέα, τα οποία περιέχουν μια ομάδα φαινυλίου υποκατεστημένη από μια καρβοξυλική ομάδα και μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ είναι αυτά που εντοπίζονται κυρίως στο χαμομήλι.¹¹

1.1.3.1 Καφεϊκό οξύ

Το καφεϊκό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ με φαινυλοπροπανοειδής δομή. Παρουσιάζει έναν 3,4-διυδροξυλιωμένο αρωματικό δακτύλιο και είναι συνδεδεμένο με ένα μόριο καρβοξυλικού οξέος μέσω μιας αλυσίδας διαιθυλενίου. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του καφεϊκού οξέος έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Μελέτες αναφέρουν πως η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε καφεϊκό οξύ μπορεί να οδηγήσει σε προστατευτική δράση κατά της καρκινογένεσης, καθώς δύναται να αναστείλει τον σχηματισμό νιτροενώσεων, που αποτελούν τους κύριους επαγωγούς αυτής της παθολογίας. Η αντικαρκινική δράση του καφεϊκού οξέος σχετίζεται με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, που αποδίδονται στη χημική του δομή. Αρχικά, η παρουσία των ελεύθερων φαινολικών υδροξυλίων μειώνει την ενθαλπία διάστασης του δεσμού O-H και αυξάνει τον ρυθμό μεταφοράς ατόμων υδρογόνου για τις ρίζες του υπεροξυλίου. Επίσης, η παρουσία του διπλού δεσμού στην ανθρακική αλυσίδα αυξάνει της σταθερότητα της φαινολικής ρίζας. Χάρη σε αυτούς τους χημικούς παράγοντες, το καφεϊκό οξύ μπορεί να εξαλείφει τις ελεύθερες ρίζες, εμποδίζοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και την επαγωγή της οξειδωσης του DNA των καρκινικών κυττάρων που υπάρχουν σε διάφορους τύπους καρκίνου.¹²

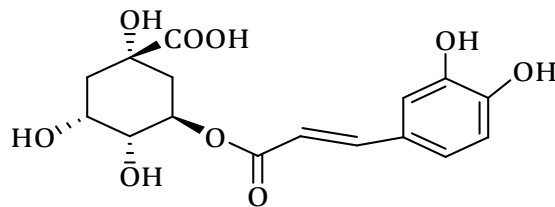


Σχήμα 1: Χημικός τύπος καφεϊκού οξέος.

1.1.3.2 Χλωρογενικό οξύ

Το χλωρογενικό οξύ είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος, συνδεδεμένος με ένα μόριο κινικού οξέος, και παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα και πληθώρα θεραπευτικών ιδιοτήτων. Μελέτες *in vivo* και *in vitro* αναφέρουν πως τα χλωρογενικά οξέα μπορούν να συμβάλουν στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, που οφείλεται στην αντιμικροβιακή, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη δράση τους.¹³

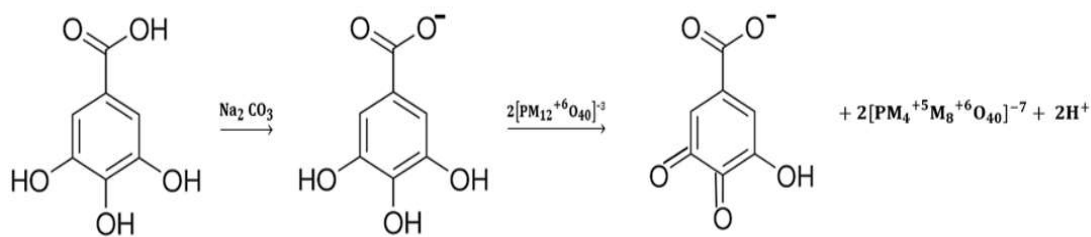
Άλλη σημαντική ιδιότητα των χλωρογενικών οξέων είναι η ικανότητα να τροποποιούν τον μεταβολισμό της γλυκόζης, επηρεάζοντας την απορρόφησή της και συνεπώς, μπορούν να ωφελήσουν την αντιμετώπιση του διαβήτη. Ακόμα, μπορούν να συμβάλουν στην θεραπεία ηπατικών νόσων, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στην προστασία των νευρώνων από τις τοξικές επιδράσεις του γλουταμικού.¹⁴



Σχήμα 2: Χημικός τύπος χλωρογενικού οξέος.

1.1.3.4 Μέθοδος προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων

Η δοκιμή Folin-Ciocalteu αποτελεί μια πολύ γνωστή μέθοδο για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC), ιδιαίτερα σε φυτικά εκχυλίσματα. Η δοκιμή αυτή, στηρίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu από φαινολικές ενώσεις. Η ακριβής χημική φύση του αντιδραστηρίου δεν είναι σαφώς καθορισμένη, ωστόσο θεωρείται ότι περιέχει ένα σύμπλοκο φωσφομολυβδικού-φωσφοβολφραμικού οξέος, που όταν ανάγεται, εμφανίζει μπλε χρώμα και απορροφάται περίπου στα 765 nm. Συγκεκριμένα, το κεντρικό ιόν μολυβδαινίου στο σύμπλοκο ανάγεται από Mo⁶⁺ σε Mo⁵⁺, καθώς λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο από τη φαινολική ένωση. Η μέθοδος απαιτεί αλκαλικές συνθήκες, οι οποίες εξασφαλίζονται με προσθήκη του Na₂CO₃. Το άλας θα συμβάλλει στην δημιουργία των φαινολικών ιόντων, τα οποία θα οδηγήσουν στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.^{15,16}



M= Mo or W

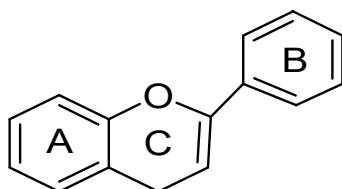
$\lambda=765 \text{ nm}$



Εικόνα 4: Αντίδραση γαλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu με αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε μπλε ¹⁶

1.1.4 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή περιέχουν δύο δακτυλίους φαινυλίου (A και B), ενωμένους μέσω ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου πυρανίου. Ανάλογα με τις διαφορές που μπορούν να εντοπιστούν στο δακτύλιο, τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε έξι κατηγορίες: τις ανθοκυανίνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβαν-3-όλες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβόνες και τις φλαβονόλες.



Σχήμα 3: Βασική δομή των φλαβονοειδών.

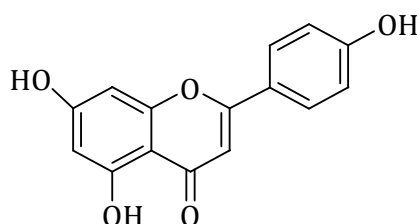
Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πολλές ιδιότητες, αλλά αυτή που σχετίζεται με την ικανότητα δέσμευσης ριζών θεωρείται η πιο σημαντική. Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών μπορεί να προβλέπουν: α) την άμεση δέσμευση των δραστικών μορφών οξυγόνου, β) την αναστολή του σχηματισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της χηλίωσης ιχνοστοιχείων, γ) την αναστολή του σχηματισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της αναστολής των ενζύμων που συμμετέχουν στην δημιουργία των ελεύθερων ριζών. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών έχουν σημαντική επίδραση για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των

καρκινικών κυττάρων, είτε μέσω της καταστολής των ενζύμων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων, είτε με την δέσμευση των ελεύθερων ριζών. Παράλληλα, έχουν την δυνατότητα να αδρανοποιούν τα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας την απόπτωσή τους και αναστέλλοντας την αγγειογένεση.¹⁷

Τέλος, αξιοσημείωτη ιδιότητα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητα ανάπτυξης μηχανισμών δράσης κατά των βακτηρίων. Ειδικότερα, μπορούν να επηρεάσουν τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες, προκαλώντας διαταραχές στη βακτηριακή μεμβράνη και αναστέλλουν διάφορες διαδικασίες, όπως η σύνθεση του DNA, η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση ATP.¹⁷

1.1.4.1 Απιγενίνη

Η απιγενίνη, χημικά γνωστή ως 4',5,7 τριυδροξυφλαβίνη, είναι το κυρίαρχο φλαβονοειδές του χαμομηλιού, καθώς η περιεκτικότητά της μπορεί να φτάσει το 68% των συνολικών φλαβονοειδών του. Ανήκει στην υποομάδα των φλαβόνων, και όπως όλες οι φλαβόνες, παρουσιάζει ποικίλες αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαλλεργικές, αντιμικροβιακές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Οπτικά διακρίνεται για την κρυσταλλική μορφή της και το κίτρινο χρώμα της.¹⁸

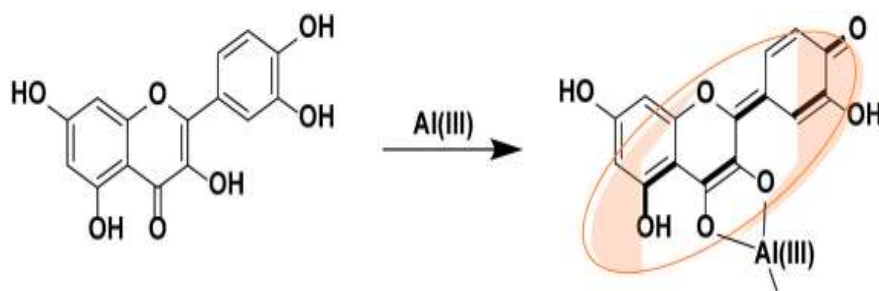


Σχήμα 4: Χημικός τύπος απιγενίνης.

Η απιγενίνη έχει συσχετιστεί έντονα με την αντικαρκινική δράση ενάντια διάφορων τύπων καρκίνου, καθώς διεγείρει την απόπτωση, την αυτοφαγία και την διακοπή του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα τονώνει την ανοσολογική απόκριση. Ειδικότερα, η απιγενίνη μπορεί να αναστείλει την δραστηριότητα των κινάσων IKKα και IKKβ, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη. Ακόμα, η απιγενίνη θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο εργαλείο για την καθυστέρηση ανάπτυξης της νόσου Αλτσχάιμερ, όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες. Συγκεκριμένα, σε μελέτη όπου χορηγήθηκε καθημερινώς απιγενίνη σε διάρκεια 3 μηνών σε διαγονιδιακά ποντίκια, παρατηρήθηκε βελτίωση στην διατήρηση της μνήμης, ενώ όταν χορηγήθηκε για οκτώ ημέρες σε ποντίκια με αμνησία, που είχε προκληθεί από τον παράγοντα Aβ25-35, σημειώθηκε ενίσχυση των λειτουργιών μάθησης και μνήμης.¹⁹

1.1.4.2 Μέθοδος προσδιορισμού φλαβονοειδών ενώσεων

Μια ευρέως ακολουθούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή είναι η μέθοδος του τριχλωριούχου αργιλίου (AlCl_3), όπου το Al(III) χρησιμοποιείται ως συμπλοκομοταποιητής. Τα φλαβονοειδή λόγω των καρβονυλίων και των υδροξυλομάδων τους, παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα έλξης μεταλλικών ιόντων όπως το τρισθενές αργίλιο, κυρίως σε αναλογία 1:1, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες.²⁰ Ειδικότερα, όταν τα φλαβονοειδή αναμιγνύονται με ένα σύστημα $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$, υπάρχει μια χρωματική αντίδραση της οποίας η ένταση ελέγχεται φασματοσκοπικά, καθώς σχηματίζονται χηλικές ενώσεις ερυθρού χρώματος, όπως φαίνεται από την εικόνα παρακάτω.²¹



Εικόνα 5: Αναπαράσταση αλλαγής χρώματος του φλαβονοειδούς κουερκετίνη κατά την συμπλοκοποίησή του με το Al(III) .²⁰

1.1.5 Αντιοξειδωτική δράση

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες είναι ενώσεις που αποτρέπουν την οξείδωση άλλων χημικών ουσιών. Προστατεύουν βασικά συστατικά του κυττάρου, εξουδετερώνοντας τις ζημιόγόνες επιδράσεις των ελεύθερων ριζών, που αποτελούν φυσικά υποπροϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από δραστικές μορφές οξυγόνου και μπορεί να περιγραφεί ως η δυναμική ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται στο σώμα και τα επίπεδα αντιοξειδωτικών που θα το προστατέψουν από τις επιβλαβείς επιδράσεις. Σε ένα υγιές κύτταρο υπάρχει ισόποση αναλογία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, ενώ στην περίπτωση της υπερβολικής συγκέντρωσης δραστικών μορφών οξυγόνου, προκαλείται οξειδωτικό στρες ικανό να ξεκινήσει διαμοριακές οξειδώσεις, που θα τραυματίσουν και θα θανατώσουν τα κύτταρα, αλλά και θα οδηγήσουν σε μια πληθώρα ασθενειών και διαταραχών, όπως η κίρρωση του ήπατος, ο καταρράκτης και η γήρανση. Επίσης, το οξειδωτικό στρες είναι ιδιαίτερα βλαβερό για τα βιοπολυμερή, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των υδατανθράκων.²²

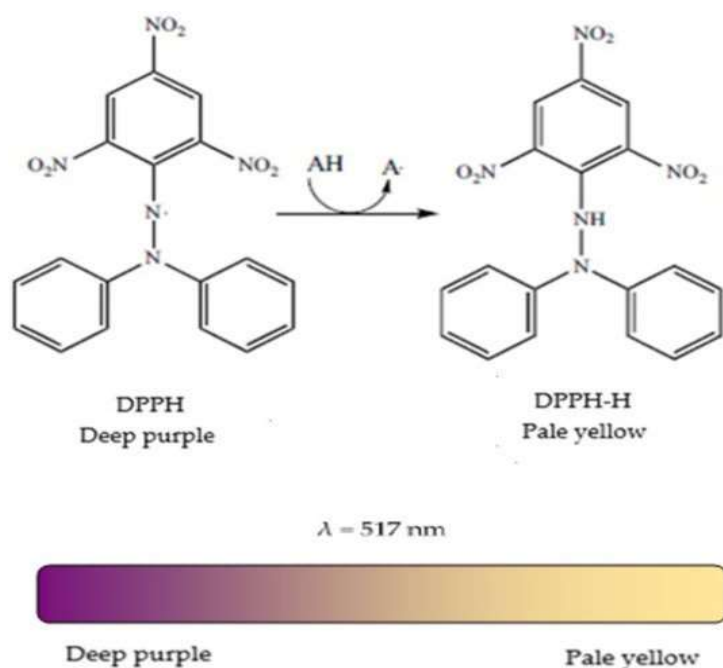
Ειδικότερα, οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν το οξυγόνο μεταβολίζεται, με αποτέλεσμα να εμφανίσει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό κέλυφος του μορίου. Οι ρίζες αυτές επιτίθενται σε πλησιέστερα μόρια προκειμένου να κλέψουν το ηλεκτρόνιό τους. Έτσι, τα μόρια χάνουν ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπονται τα ίδια σε ρίζες, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μια σειρά διαδοχικών αντιδράσεων. Επισημαίνεται ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να προέρχονται και από άλλα μόρια πέρα του οξυγόνου, όπως το άζωτο, και σε αυτή την περίπτωση γίνεται αναφορά στα δραστικά μόρια του αζώτου.²²

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορεί να είναι είτε συνθετικές είτε φυσικές. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά προέρχονται αποκλειστικά από φυσικές πηγές και χρησιμοποιούνται ευρέως σε καλλυντικά, τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα. Στον αντίποδα, τα συνθετικά αντιοξειδωτικά προέρχονται από χημικές διεργασίες.²³

Τόσο το εκχύλισμα όσο και το αιθέριο έλαιο χαμομηλιού είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά. Ειδικότερα, έχουν καταγραφεί τιμές του IC₅₀ για το έλαιο και το εκχύλισμα χαμομηλιού από μεθανόλη ίσες με 4.18 και 1.83 μg/mL αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την ισχυρή αντιοξειδωτική ιδιότητα του χαμομηλιού. Βέβαια, σημαντικό ρόλο στην διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ισχύος παίζουν οι συνθήκες εκχύλισης (διαλύτης, θερμοκρασία, μέθοδος), καθώς και η μέθοδος προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών.⁸

1.1.5.1 Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών

Ιδιαίτερα δημοφιλής μέθοδος προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών βασίζεται στη χρήση ελεύθερων ριζών DPPH. Οι ρίζες αυτές είναι ιδιαίτερες σταθερές, ενώ παρουσιάζουν έντονο μωβ χρώμα. Είναι ιδιαίτερα διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, αλλά όχι στο νερό, και για αυτό τον λόγο διαλύονται συνήθως σε αιθανόλη. Κατά την ανάμειξη διαλύματος DPPH με ουσία που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, προκύπτει η ανηγμένη μορφή DPPH-H, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH και την αλλαγή χρώματος του διαλύματος, όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 6: Αναπαράσταση αλλαγής χρώματος κατά την δημιουργία ανηγμένης μορφής DPPH.¹⁶

Ο αποχρωματισμός αυτός δρα ως δείκτης της αντιοξειδωτικής δράσης και η αλλαγή χρώματος μετράται στα 517 nm. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, η εγκυρότητα, η απλή μεθοδολογία και η συντομία της.^{16, 24}

1.2 Πράσινη Χημεία

Η έννοια της πράσινης χημείας εισήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και κεντρικός της στόχος ήταν η επίτευξη της βιωσιμότητας σε μοριακό επίπεδο. Λόγω αυτού του στόχου, δεν αποτέλεσε έκπληξη το γεγονός ότι μέχρι σήμερα, η πράσινη χημεία κατάφερε να εφαρμοστεί σε όλους τους κλάδους της βιομηχανίας. Από την αεροδιαστημική, την αυτοκίνηση, τα καλλυντικά, την ενέργεια, τα φαρμακευτικά και οικιακά προϊόντα μέχρι την γεωργία, υπάρχουν εκατοντάδες παραδείγματα βραβευμένων εφαρμογών της.²⁵

Ειδικότερα, ως πράσινη χημεία ορίζεται ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διεργασιών, που θα συμβάλλουν στην μείωση ή εξάλειψη της χρήσης και παραγωγής επικίνδυνων ουσιών, και στηρίζεται στις εξής 12 αρχές²⁶:

1^η Αρχή: Πρόληψη δημιουργίας αποβλήτων

Είναι προτιμότερο να προληφθεί η δημιουργία αποβλήτων, από το να καθαριστούν εκ των υστέρων. Η δημιουργία οποιουδήποτε υλικού που δεν έχει αξία ή η απώλεια ενέργειας που δεν αξιοποιείται, μπορεί να θεωρηθεί ως απόβλητο. Γενικά, τα απόβλητα μπορούν να λάβουν διάφορες μορφές και να

επηρεάσουν το περιβάλλον με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με τη φύση τους, την τοξικότητά τους, την ποσότητά τους ή τον τρόπο με τον οποίο απελευθερώνονται. Όταν η παραγωγή παραπροϊόντων είναι αναπόφευκτη, θα πρέπει να εξετάζονται νέες λύσεις, και μια καινοτόμα ιδέα θα μπορούσε να περιλαμβάνει την αξιοποίηση των αποβλήτων ως τροφοδοσία υψηλής αξίας σε μια άλλη διεργασία. Η ιδέα αυτή, πρόκειται για μια προσέγγιση βιομηχανικής οικολογίας, η οποία εφαρμόζεται στην βιομηχανία βιοκαυσίμων.²⁵

2^η Αρχή: Οικονομία ατόμου

Ο όρος ατομική οικονομία ή ατομική αποδοτικότητα αναφέρεται στην μεγιστοποίηση της χρήσης των πρώτων υλών, έτσι ώστε το τελικό προϊόν να περιέχει τον μέγιστο αριθμό ατόμων από τα αντιδρώντα. Σε μια ιδανική αντίδραση, το προϊόν θα περιλάμβανε όλα τα άτομα των αντιδρώντων και επομένως, ο δείκτης οικονομίας ατόμου, που ορίζεται ως ο λόγος του μοριακού βάρους του επιθυμητού προϊόντος προς το μοριακών βαρών όλων των αντιδρώντων, θα έχει τιμή 100%. Σε περίπτωση όπου δεν μπορεί να επιτευχθεί η μέγιστη ενσωμάτωση, θα πρέπει ιδανικά, οι ποσότητες των παραπροϊόντων να είναι ελάχιστες και περιβαλλοντικά αβλαβείς.^{25,27}

3^η Αρχή: Λιγότερο επικίνδυνη χημική σύνθεση

Όπου είναι εφικτό, οι μέθοδοι σύνθεσης θα πρέπει να σχεδιάζονται, έτσι ώστε να χρησιμοποιούν και να παράγουν ουσίες με μικρή ή καμία τοξικότητα, τόσο για την ανθρώπινη υγεία, όσο και για το περιβάλλον. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση επιβλαβών χημικών ουσιών με ένζυμα, μια ιδέα που βοήθησε πολλές βιομηχανικές διεργασίες να γίνουν καθαρότερες και οικονομικότερες.^{25,28}

4^η Αρχή: Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων

Τα χημικά προϊόντα θα πρέπει να σχεδιάζονται ώστε να είναι λειτουργικά, αλλά παράλληλα να έχουν μειωμένη τοξικότητα. Ο συνδυασμός αυτών των δύο χαρακτηριστικών μπορεί να θεωρηθεί ένα από τα δυσκολότερα μέρη του σχεδιασμού ασφαλέστερων προϊόντων και διεργασιών, και η επίτευξη αυτού του στόχου απαιτεί πέρα από την κατανόηση της χημείας, την κατανόηση της τοξικολογίας και της περιβαλλοντικής επιστήμης.²⁸

5^η Αρχή: Χρήση ασφαλέστερων διαλυτών

Η χρήση ασφαλέστερων διαλυτών αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις που έχει να αντιμετωπίσει η πράσινη χημεία, καθώς αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία της μάζας που σπαταλάται στις συνθέσεις και τις

διεργασίες. Επιπλέον, πολλοί συμβατικοί διαλύτες είναι εύφλεκτοι, τοξικοί και διαβρωτικοί. Η πτητικότητα και διαλυτότητά τους έχουν συμβάλλει στην ατμοσφαιρική, υδατική και εδαφική ρύπανση και έχουν οδηγήσει σε σοβαρά ατυχήματα. Παράλληλα, η διεργασία ανάκτησης του διαλύτη για μελλοντική επαναχρησιμοποίησή του μπορεί να αποβεί ενεργοβόρα. Ιοντικά υγρά, υπερκρίσιμα υγρά και συστήματα χωρίς διαλύτες είναι ορισμένες από τις «πράσινες» λύσεις που έχουν εξεταστεί για την αντικατάσταση συμβατικών διαλυτών.²⁵

6^η Αρχή: Μείωση ενεργειακών απαιτήσεων διεργασιών

Δεδομένων των συνεχώς αυξανόμενων ανησυχιών για την εξάντληση του πετρελαίου και την αύξηση της ενεργειακής κατανάλωσης, είναι ιδιαίτερα επιθυμητός ο σχεδιασμός χημικών αντιδράσεων ή διεργασιών που δεν θα απαιτούν εντατική χρήση ενέργειας. Η μείωση του ενεργειακού φραγμού μιας χημικής αντίδρασης ή η επιλογή κατάλληλων αντιδρώντων, ώστε η διεργασία να μπορέσει να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, είναι ενδεικτικά παραδείγματα των λύσεων που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν, ώστε να μειωθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις.²⁵

7^η Αρχή: Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών

Έχει εκτιμηθεί ότι η συντριπτική πλειονότητα των παραγόμενων προϊόντων προέρχονται από πρώτες ύλες πετρελαίου ή φυσικού αερίου. Η εξάντληση αυτών των πόρων θα επιφέρει σημαντικές αλλαγές τόσο στην καταναλωτική ζωή των ανθρώπων, όσο και στην οικονομία. Έτσι, η στροφή προς τις ανανεώσιμες πρώτες ύλες κρίνεται αναγκαία. Η σημαντικότερη ανανεώσιμη πρώτη ύλη παγκοσμίως είναι η βιομάζα, η οποία εντοπίζεται στα γεωργικά υπολείμματα, στα τρόφιμα, στις καλλιέργειες και στα ξύλα.²⁵

8^η Αρχή: Αποφυγή άσκοπης παραγωγοποίησης

Η περιττή παραγωγοποίηση θα πρέπει να μειώνεται ή να αποφεύγεται όπου είναι δυνατό, καθώς περιλαμβάνει βήματα που απαιτούν επιπλέον αντιδραστήρια, και επομένως οδηγούν στο σχηματισμό αποβλήτων.²⁹

9^η Αρχή: Εφαρμογή κατάλυσης

Σε πολλές περιπτώσεις, ο σχηματισμός αποβλήτων συνδέεται με την παραδοσιακή χρήση στοιχειομετρικής ποσότητας αντιδραστηρίων. Η μετάβαση από στοιχειομετρικές μεθοδολογίες σε καταλυτικές διαδικασίες θεωρείται ως ένας σημαντικός τρόπος για τη βελτίωση της αποδοτικότητας των αντιδράσεων

σύνθεσης. Συγκεκριμένα, η κατάλυση μπορεί να βελτιώσει την αποδοτικότητα μιας αντίδρασης, μειώνοντας την απαιτούμενη εισροή ενέργειας και αποφεύγοντας τη χρήση στοιχειομετρικής ποσότητας αντιδραστηρίων. Αυτό συνεπάγεται λιγότερες απαιτήσεις σε ενέργεια και πρώτη ύλη και σε λιγότερα απόβλητα. Επιπλέον, ανοίγει τον δρόμο σε καινοτόμες χημικές αντιδράσεις και φέρνει μη συμβατικές λύσεις σε παραδοσιακές χημικές προκλήσεις.²⁵

10^η Αρχή: Δυνατότητα βιοαποικοδόμησης τελικού προϊόντος

Τα χημικά προϊόντα θα πρέπει μετά το πέρας της λειτουργίας τους να βιοαποικοδομούνται σε αβλαβή προϊόντα, που δεν θα επιβαρύνουν το περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο, θα αποτραπεί η συσσώρευση αποβλήτων που μπορούν να αποβούν τοξικά.²⁵

11^η Αρχή: Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο για την πρόληψη μολύνσεων

Στόχος της πράσινης αναλυτικής χημείας είναι η μέτρηση χημικών ουσιών χωρίς την παραγωγή αποβλήτων. Τα περιβαλλοντικά προβλήματα της αναλυτικής χημείας συνήθως σχετίζονται με την ίδια την αναλυτική μέθοδο που εφαρμόζεται, καθώς πολλές μεθοδολογίες απαιτούν την προεπεξεργασία του δείγματος, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει διεργασίες, όπως η εκχύλιση, ο διαχωρισμός ή η χημική τροποποίηση του δείγματος και να χρειαστούν τεράστιες ποσότητες διαλύτη. Επιπλέον, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη πράσινων αναλυτικών μεθόδων που θα επιτρέπουν την άμεση ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, ώστε σε περίπτωση μετασχηματισμού της χημικής ουσίας να είναι εφικτή η άμεση δράση για την πρόληψη μολύνσεων. Ακόμα, τόσο οι χημικοί όσο και οι μηχανικοί που κατασκευάζουν νέα μηχανήματα ανάλυσης θα πρέπει να γνωρίζουν τα πιθανά περιβαλλοντικά προβλήματα που σχετίζονται με τα υλικά που χειρίζονται.²⁵

12^η Αρχή: Αποφυγή ατυχημάτων

Πολλές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα, θα πρέπει να αντικατασταθούν από ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις, καθώς παρουσιάζουν σοβαρούς κινδύνους. Η πρόληψη ατυχημάτων προβλέπει τον εντοπισμό και την αξιολόγηση όλων των πιθανών κινδύνων. Όλοι οι τύποι κινδύνων, είτε πρόκειται για τοξικότητα, είτε για φυσικούς κινδύνους, όπως η εκρηκτικότητα ή η ευφλεκτότητα, καθώς και οι παγκόσμιοι κίνδυνοι θα πρέπει να εξαλειφθούν με τον κατάλληλο σχεδιασμό χημικών ουσιών και διαδικασιών προκειμένου να αποφευχθούν ατυχήματα.²⁵

1.2.1 Πράσινη Εκχύλιση Φυσικών Προϊόντων

Ως πράσινη εκχύλιση μπορεί να οριστεί η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός μιας διεργασίας εκχύλισης, που θα μειώνει την ενεργειακή κατανάλωση, θα επιτρέπει την χρήση εναλλακτικών διαλυτών και ανανεώσιμων πρώτων υλών, ενώ παράλληλα θα διασφαλίζει την ασφάλεια και την υψηλή ποιότητα του εκχυλίσματος. Συνολικά, έχουν εντοπιστεί τρεις πιθανές λύσεις που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν την εφαρμογή της πράσινης εκχύλισης τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα, και είναι οι εξής: 1) η βελτίωση και βελτιστοποίηση των υφιστάμενων διαδικασιών, 2) η χρήση μη αποκλειστικού για την διεργασία εξοπλισμού, 3) η ανακάλυψη εναλλακτικών και καινοτόμων διαλυτών.

1.2.2 Αρχές Πράσινης Εκχύλισης

Οι αρχές της πράσινης εκχύλισης οφείλουν να αποτελούν κατευθυντήριους άξονες για τους επιστήμονες και την βιομηχανία που στοχεύουν στην δημιουργία καινοτομιών με πράσινη σήμανση. Οι έξι αυτές αρχές παρουσιάζονται κάτωθι:

- *Επιλογή ανανεώσιμων φυτικών πόρων:* η αυξανόμενη ζήτηση φυσικών προϊόντων και εκχυλισμάτων μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκμετάλλευση των διαθέσιμων φυτικών πόρων, και κατά συνέπεια να εξαφανιστούν. Η διασφάλιση της βιοποικιλότητας είναι υποχρεωτική για τις μελλοντικές γενεές και στηρίζεται στην αποκλειστική χρήση φυτών που έχουν καλλιεργηθεί για συγκεκριμένους σκοπούς και δεν προέρχονται από το φυσικό τους περιβάλλον.
- *Χρήση εναλλακτικών διαλυτών:* πλέον οι ισχύοντες κανονισμοί έχουν ως στόχο την μείωση της κατανάλωσης πετροχημικών διαλυτών και πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs). Οι περισσότεροι οργανικοί διαλύτες είναι πτητικοί, εύφλεκτοι, και συχνά τοξικοί, ενώ ευθύνονται για τη περιβαλλοντική ρύπανση και το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Συνεπώς, ζητήματα οικονομίας, περιβάλλοντος και ασφάλειας καθιστούν αναγκαία την στροφή της βιομηχανίας σε πιο οικολογικούς διαλύτες.
- *Μείωση κατανάλωσης ενέργειας εκχύλισης μέσω καινοτόμων τεχνολογιών:* ποικίλοι περιβαλλοντικοί και οικονομικοί παράγοντες επηρεάζουν τις παραμέτρους της εκχύλισης και απαιτούν την μείωση της κατανάλωσης ενέργειας και των παραγόμενων αποβλήτων. Η υποβοήθηση της εκχύλισης με άλλες μεθόδους, όπως τα μικροκύματα ή οι υπέρηχοι, η βελτιστοποίηση

των παραμέτρων εκχύλισης και η ανάκτηση της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την εκχύλιση, αποτελούν ορισμένους από τους τρόπους που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην εξοικονόμηση ενέργειας.

- *Αξιοποίηση απορριμμάτων εκχύλισης για την παραγωγή προϊόντων:* κατά την εκχύλιση πέρα από το επιθυμητό εκχύλισμα μπορεί να προκύψουν και άλλα υλικά, όπως απορρίμματα και παραπροϊόντα, και να αξιοποιηθούν για την παραγωγή άλλων προϊόντων. Ειδικότερα, τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για την παραγωγή πράσινων καυσίμων, οικοδομικών υλικών και συσκευασιών και άλλων προϊόντων. Για παράδειγμα, το δεντρολίβανο αποτελεί ένα βότανο με πλούσια αντιοξειδωτική δράση, λόγω της πλούσιας περιεκτικότητας του σε πολυφαινολικές ενώσεις. Μετά την παραλαβή του αιθέριου ελαίου, το υπόλειμμα δύναται να υποστεί νέα επεξεργασία προκειμένου να εξαχθούν αντιοξειδωτικά και τελικά να αξιοποιηθεί σε καλλυντικές εφαρμογές.
- *Ανάπτυξη τεχνολογικών καινοτομιών για την μείωση των λειτουργικών μονάδων:* οι βιομηχανίες που βασίζονται στην εκχύλιση προϊόντων (αρώματα, καλλυντικά, τρόφιμα και φάρμακα) πρέπει να συνδυάσουν την εντατικοποίηση της διεργασίας με τα ασφαλέστερα και καθαρότερα πρωτόκολλα εκχύλισης. Οι προκλήσεις της ανάπτυξης εντατικοποιημένων διεργασιών είναι πολλαπλές: περισσότερες συμπαγείς μονάδες παραγωγής και λιγότερες μεμονωμένες μονάδες, μείωση κατανάλωσης ενέργειας, αποβλήτων, οικολογικού αποτυπώματος και παράλληλος έλεγχος ασφάλειας. Ειδικότερα, η εκχύλιση ενός προϊόντος δεν είναι αποτέλεσμα μιας μεμονωμένης λειτουργικής μονάδας, αλλά μιας αλυσίδας διεργασιών. Για παράδειγμα, για την εξαγωγή του β-καροτένιου από τα καρότα προβλέπεται η ξήρανση της πρώτης ύλης, η άλεσή της, η αλληλεπίδρασή της με τον διαλύτη κατά την εκχύλιση, η εξάτμιση και ανάκτηση του διαλύτη. Η μείωση των βημάτων μιας αλυσιδωτής διεργασίας μπορεί να εξοικονομήσει χρόνο, κόστος και ενέργεια και για αυτό μάλιστα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μέθοδοι εκχύλισης, ικανοί να μειώσουν τον αριθμό των σταδίων.
- *Εφαρμογή ανάλυσης κύκλου ζωής:* η ανάλυση του κύκλου ζωής αποτελεί ένα εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των επιπτώσεων στο περιβάλλον που μπορεί να επιφέρει η εκχύλιση, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις δραστηριότητες που εμπλέκονται στην παραγωγή του εκχυλίσματος, από την παραλαβή της πρώτης ύλης μέχρι και την επεξεργασία κατά την απόρριψη της (αποτέφρωση, ανακύκλωση, κλπ). Έτσι, η μέθοδος συμβάλλει στην ταυτοποίηση των διεργασιών που καταναλώνουν ενέργεια, φυσικούς πόρους και αυξάνουν τις περιβαλλοντικές εκπομπές. Παράλληλα, οι ροές της ύλης που εισέρχονται εξέρχονται σε κάθε βήμα του κύκλου ζωής, καταγράφονται στην απογραφή του κύκλου ζωής, όπου συνοψίζει τις

ποσότητες των ρύπων που εκπέμπονται και τους πόρους που εξάγονται κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής. Τα αποτελέσματα αυτά συγκεντρώνονται και υπολογίζεται η συνεισφορά κάθε ροής στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που μελετήθηκαν. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα ώστε να προσδιοριστεί ποσοτικά η βιωσιμότητα ενός «πράσινου» εκχυλίσματος.³¹

1.3 Συμβατική εκχύλιση & παράμετροι επίδρασης

Η εκχύλιση είναι το πρώτο βήμα για τον διαχωρισμό επιθυμητών φυσικών προϊόντων από τις πρώτες ύλες. Η εκχύλιση με χρήση διαλύτη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και προβλέπει τα ακόλουθα βήματα:

- 1) ο διαλύτης διεισδύει στο στερεό
- 2) η επιθυμητή ουσία διαλύεται στο διαλύτη,
- 3) η επιθυμητή ουσία διαχέεται έξω από το στερεό και
- 4) συλλέγονται οι εκχυλισμένες ουσίες.

Οποιοσδήποτε παράγοντας που μπορεί να ενισχύσει την ικανότητα διάχυσης και την διαλυτότητα για τα παραπάνω βήματα, θα διευκολύνει την εκχύλιση. Ειδικότερα, οι ιδιότητες του διαλύτη, το μέγεθος των σωματιδίων της πρώτης ύλης, η αναλογία διαλύτη προς στερεό, η θερμοκρασία και η διάρκεια της εκχύλισης μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της εκχύλισης.³²

Κατά την επιλογή του διαλύτη πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες, όπως η εκλεκτικότητα, η διαλυτότητα, το κόστος και η ασφάλεια. Η πολικότητα είναι επίσης μια καθοριστική ιδιότητα, καθώς διαλύτες με τιμή πολικότητας κοντά στην πολικότητα της διαλυμένης ουσίας παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης. Σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων, ισχύει ότι το μικρό μέγεθος των σωματιδίων διευκολύνει την διάλυση και την διάχυση των διαλυμένων ουσιών, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, αξίζει να επισημανθεί ότι πολύ μικρό μέγεθος σωματιδίων θα οδηγήσει σε υπερβολική απορρόφηση της διαλυμένης ουσίας στο στερεό και δυσκολία στην επακόλουθη διήθηση. Επιπλέον, οι υψηλές θερμοκρασίες εκχύλισης θα ενισχύσουν την απόδοση, αλλά μπορεί να προκαλέσουν αποσύνθεση θερμοευαίσθητων συστατικών.³² Αναφορικά με την αναλογία διαλύτη προς στερεό, ισχύει πως η αύξηση αυτού του λόγου επιφέρει αύξηση της απόδοσης εκχύλισης, λόγω της διαφοράς συγκέντρωσης μεταξύ της στερεάς μήτρας και του διαλύτη και συνεπώς, η εκχύλιση επιτυγχάνεται με μεγαλύτερο ρυθμό. Τέλος, η αύξηση της διάρκειας εκχύλισης αυξάνει την αποδοτικότητα της εκχύλισης, όταν πραγματοποιείται εντός ενός συγκεκριμένου χρονικού εύρους, καθώς δεν έχει καμία επίδραση η αύξηση του χρόνου εκχύλισης, όταν έχει επέλθει ισορροπία της διαλυμένης ουσίας εντός και εκτός του στερεού υλικού.³³

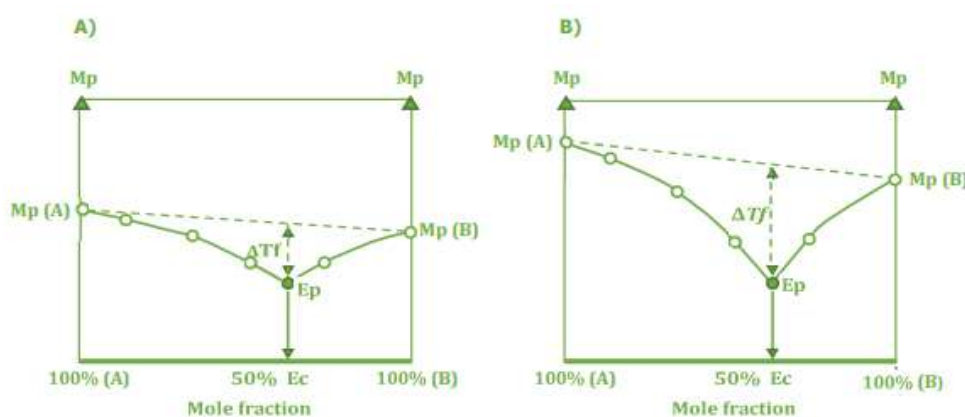
Στις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης συμπεριλαμβάνονται μέθοδοι, όπως η εκχύλιση με διαβροχή, η εκχύλιση Soxhlet και η υδροαπόσταξη. Βασικό μειονέκτημά τους είναι η απαίτηση μεγάλων όγκων διαλύτη και η μεγάλη διάρκεια εκχύλισης. Ορισμένες πιο σύγχρονες μέθοδοι, όπως η εκχύλιση υγρού υπό πίεση, η εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά και η υποβοηθούμενη εκχύλιση από υπερήχους, αποτελούν πράσινες εναλλακτικές λύσεις, που εμφανίζουν υψηλότερη εκλεκτικότητα, ενώ απαιτούν λιγότερη κατανάλωση διαλύτη και ενέργειας.³²

1.4 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESs)

Οι αυξανόμενες περιβαλλοντικές ανησυχίες, η ανάπτυξη της περιβαλλοντικής χημείας και η ανάγκη για την παραγωγή ασφαλών προϊόντων έθεσαν μια νέα κατεύθυνση στην παραγωγή εκχυλισμάτων. Ένας από τους βασικούς στόχους που έχουν τεθεί είναι η αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών από πράσινους διαλύτες, διατηρώντας παράλληλα ίδιες ή υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης.³⁴

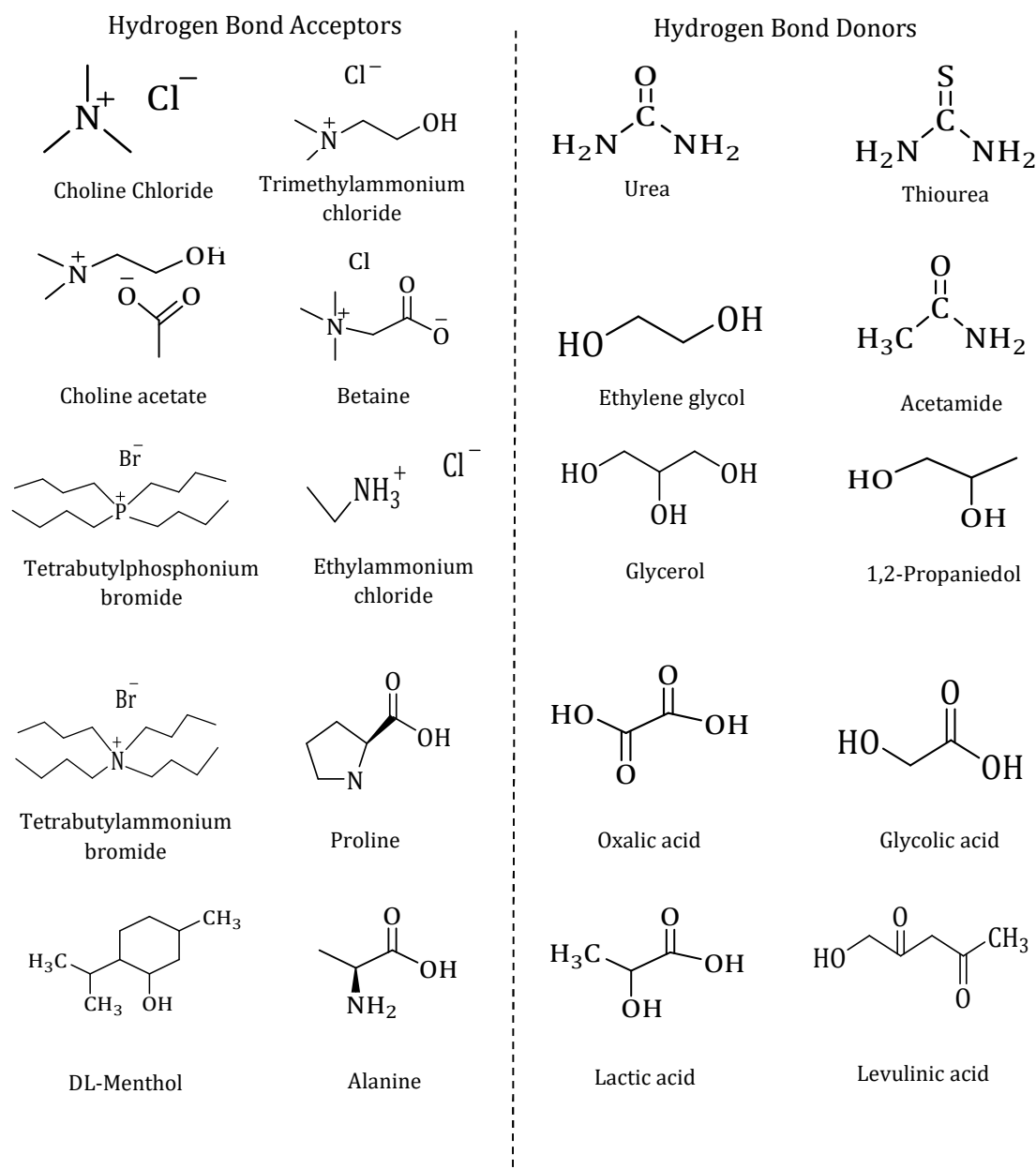
Οι πράσινοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το νερό, τα υπερκρίσιμα υγρά, τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Οι τελευταίοι μάλιστα γνώρισαν ευρεία εφαρμογή σε διεργασίες διαχωρισμού και καθαρισμού, λόγω της χαμηλής τοξικότητας, του χαμηλού κόστους και της ικανότητας να διαλύουν αποτελεσματικά οργανικές ενώσεις.³⁵

Ο όρος βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Deep Eutectic Solvent, DES) έχει ελληνική ρίζα, καθώς προέρχεται από την λέξη «εύτηκτος», λόγω της ικανότητας να λιώνει εύκολα, ενώ ο όρος «βαθέως» τονίζει την μεγάλη μείωση του σημείου τήξης των DESs από τα συστατικά του ($\Delta T_f = 100\text{-}200^\circ\text{C}$) σε σχέση με τα απλά ευτηκτικά μίγματα, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.³⁶



Εικόνα 8: Διαφοροποίηση σημείου τήξεως ευτηκτικού μίγματος (A) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (B) δύο συστατικών σε διάγραμμα δύο φάσεων. Mp: σημείο τήξης, ΔT_f : πτώση σημείου τήξης, Ec: ευτηκτική σύσταση, Ep: ευτηκτικό σημείο.³⁶

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούνται συνήθως από δύο μη τοξικά συστατικά, εκ των οποίων το ένα δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Acceptors, HBA) και το άλλο δρα ως δότης δεσμού υδρογόνου (Hydrogen Bond Donors, HBD). Στο σύστημα που προκύπτει, δημιουργούνται νέοι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου, καθώς και αλληλεπιδράσεις van der Waals, στους οποίους οφείλεται η ικανότητα του DES να τήκεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες των επιμέρους συστατικών του.³⁷ Ορισμένοι από τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 9: Συνήθεις δέκτες (αριστερά) και δότες (δεξιά) δεσμών υδρογόνου για την παρασκευή βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.⁸

1.4.1 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESs)

Στην περίπτωση παρασκευής DESs όπου χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα, πολυόλες και παράγωγα χολίνης, οι διαλύτες αναφέρονται ως φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES).³⁹ Βέβαια, πέρα από αυτά τα συστατικά και το νερό θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος των φυσικών συστατικών.³⁸

Στην πραγματικότητα τα NaDESs μπορούν να εντοπιστούν οπουδήποτε στην φύση. Για παράδειγμα, το σιρόπι σφενδάμου είναι ένα υγρό μείγμα, που αποτελείται από σακχαρόζη, μηλικό οξύ και κάποια άλλα σάκχαρα, παρόλο που τα επιμέρους συστατικά είναι σε στερεή μορφή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι ενώσεις που μπορούν να συμβάλλουν στο σχηματισμό των NaDESs είναι άφθονα διαθέσιμες με την μορφή μεταβολιτών και κυτταρικών συστατικών όλων των κυτταρικών τύπων και οργανισμών, ενώ οι πιθανοί συνδυασμοί όλων αυτών των συστατικών μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό πάνω από 100 διαφορετικών NaDESs. Επίσης, πολλά βιολογικά φαινόμενα μπορούν να εξηγηθούν, όταν λαμβάνονται υπόψη τα NaDESs. Ειδικότερα, τα φυτά μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες καιρικές συνθήκες, καθώς πολλά ωφέλιμα συστατικά, όπως μεταβολίτες, μακρομόρια, ένζυμα και νερό μπορούν να διατηρηθούν σταθερά σε ένα κυτταρικό πλέγμα πλούσιο σε NaDES. Έτσι, σε συνθήκες υπερβολικού κρύου, το νερό συντηρείται και δεν καταψύχεται, λόγω του πολύ χαμηλού σημείου τήξης των NaDESs. Με αυτόν τον τρόπο, αποφεύγεται η ρήξη των κυττάρων του φυτού, λόγω της παρουσίας των κρυστάλλων πάγου.³⁹

1.4.2 Μέθοδοι παρασκευής των DESs

Στην βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί ποικίλες μέθοδοι για την παρασκευή των DESs. Μια από τις πιο κοινές μεθόδους είναι η μέθοδος της θέρμανσης, η οποία προβλέπει την ανάμειξη των συστατικών, την συνεχή θέρμανση και ανάμειξή τους, μέχρις ότου να σχηματιστεί ένα ομοιογενές υγρό. Η θερμοκρασία συνήθως κυμαίνεται στο εύρος 50-100°C, ωστόσο μια αρκετά υψηλή θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση του διαλύτη.³⁸ Σύμφωνα με την μέθοδο της εξάτμισης υπό κενό, τα συστατικά διαλύονται στο νερό και εξατμίζεται στους 50°C μέσω του περιστροφικού εξατμιστή. Το υγρό που λαμβάνεται, αφήνεται για ξήρανση μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος του.⁴⁰ Επιπλέον, μια μέθοδος σύνθεσης με την βοήθεια υπερήχων εισήχθη πρόσφατα, ενώ δεδομένων των αναγκών για εξοικονόμηση χρόνου ενέργειας, σε πρόσφατη έρευνα προτάθηκε μια πράσινη μέθοδος παρασκευής των NaDES μέσω της χρήσης μικροκυμάτων, η οποία μπορεί να ολοκληρωθεί εντός ολίγων δευτερολέπτων.³⁸

1.4.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα DESs δικαιολογούν το αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών για την μελέτη αυτών των διαλυτών. Πέρα από την χαμηλή πτητικότητα, την χημική και φυσική σταθερότητα τους, η δυνατότητα σχεδιασμού DES για συγκεκριμένες εφαρμογές, σε συνδυασμό με την ευρεία ποικιλία δυνητικών συστατικών τους, αποτελούν αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά τους.³⁸ Παρακάτω, αναλύονται βασικές ιδιότητες των DESs, όπως η πυκνότητα, το ιξώδες, η ιοντική αγωγιμότητα, η πολικότητα και η επιφανειακή τάση.

1.4.3.1 Πυκνότητα

Γενικά, οι πυκνότητες των DESs είναι μεγαλύτερες από την πυκνότητα του νερού, με τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 1,0 με 1,3 g·cm⁻³ στους 25°C για τους πιο διαδεδομένους. Χαμηλότερες πυκνότητες από του νερού καταγράφονται σε υδρόφοβα DESs, ενώ DESs που έχουν ως βάση τα μεταλλικά άλατα, παρουσιάζουν τιμές πυκνότητας 1,3-1,6 g·cm⁻³. Η πυκνότητα των DES φαίνεται να παρουσιάζει εξάρτηση από την θερμοκρασία και συγκεκριμένα, παρατηρείται πως μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί την γραμμική αύξηση της πυκνότητας. Τέλος, πέρα από την θερμοκρασία, η πυκνότητα εξαρτάται τόσο από την επιλογή του δότη δεσμού υδρογόνου όσο και από την μοριακή αναλογία των συστατικών.³⁸

1.4.3.2 Ιξώδες

Το ιξώδες είναι μια ευρέως μελετημένη ιδιότητα των DESs και ιδιαίτερα σημαντική. Συνήθως, σε θερμοκρασία δωματίου τα DESs είναι αρκετά ιξώδη, με τιμές ιξώδους που ξεπερνούν τα 100 mPa·s, και αποδίδονται κυρίως στο εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που έχει σχηματιστεί.³⁸ Γενικά, είναι επιθυμητό οι τιμές του ιξώδους να είναι χαμηλές, καθώς διευκολύνεται ο χειρισμός του διαλύτη και μειώνεται η ενεργειακή κατανάλωση.³⁷ Το ιξώδες επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η φύση των συστατικών του διαλύτη, η περιεκτικότητα σε νερό και η μοριακή αναλογία.³⁸

1.4.3.3 Ιοντική αγωγιμότητα

Δεδομένου ότι η ιοντική αγωγιμότητα επηρεάζεται από το ιξώδες, τα DESs παρουσιάζουν αρκετά χαμηλές ιοντικές αγωγιμότητες, με τιμές κατώτερες των 2 mS·cm⁻¹ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση του ιξώδους, και συνεπώς αύξηση της ιοντικής αγωγιμότητας. Επίσης, πέρα από το ιξώδες, την ιδιότητα αυτή επηρεάζει η φύση του δότη και του δέκτη δεσμού υδρογόνου, η μοριακή τους αναλογία καθώς και η προσθήκη νερού.

1.4.3.4 Επιφανειακή τάση

Η επιφανειακή τάση είναι μια ιδιοτητα η οποία δεν έχει μελετηθεί όσο άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs. Εξαρτάται άμεσα από την ένταση και τον βαθμό δημιουργίας των διαμοριακών δυνάμεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του δότη και του δέκτη δεσμού υδρογόνου. Στα πολύ παχύρρευστα DESs παρουσιάζονται υψηλές τιμές επιφανειακής τάσης, και συνηθως κυμαίνονται στο εύρος 35 με 75 mN m⁻¹ στους 25°C. Αρκετά υψηλές τιμές επιφανειακής τάσης παρουσιάζουν τα DESs που περιέχουν σάκχαρα, όπως το DES με χλωριούχο χολίνη και D-γλυκόζη. Τέλος, η επιφανειακή τάση μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας.³⁸

1.4.3.5 Πολικότητα

Η πολικότητα είναι πολύ σημαντική ιδιότητα των διαλύτων, καθώς καθορίζουν την διαλυτοποιητική τους ισχύ. Πειραματικά ευρήματα αναφέρουν ότι τα DESs που περιέχουν οξέα είναι πιο πολικά, ενώ ακολουθούν αυτά που περιέχουν αμινοξέα. Τα λιγότερο πολικά DESs είναι αυτά που περιέχουν σάκχαρα και πολυόλες. Τέλος, η πολικότητα μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη νερού.³⁹

1.4.3.5.1 Προσδιορισμός πολικότητας

Ένας δείκτης που έχει γνωρίσει ευρεία εφαρμογή για τον προσδιορισμό της πολικότητας των NaDESs, είναι ο δείκτης ερυθρού του Νείλου (Nile red). Σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες του δείκτη, όπως η φωτοχημική σταθερότητα, η υψηλή διαλυτότητα σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος διαλυτών και η χαμηλή βασικότητα το καθιστούν κατάλληλο για την μέτρηση της πολικότητας. Σύμφωνα με την μέθοδο, αρχικά ετοιμάζεται διάλυμα Nile red σε αιθανόλη συγκέντρωσης 1 mM. Ποσότητα από το NaDES τοποθετείται σε κυψελίδα προκειμένου να πραγματοποιηθεί φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού στην περιοχή 400-700 nm, η μέτρηση που λαμβάνεται αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα. Στην συνέχεια, στον διαλύτη προστίθεται ποσότητα από το διάλυμα του δείκτη, αναδεύεται, ώστε να υπάρχει ομοιογένεια και επαναλαμβάνεται μέτρηση στην περιοχή 400-700 nm. Τέλος, λαμβάνεται η τιμή που αντιστοιχεί στην μέγιστη απορρόφηση και υπολογίζεται η ενέργεια μοριακής μετάβασης σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$E_{NR} = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$$

Επισημαίνεται ότι οι υψηλές τιμές του E_{NR} αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές πολικότητας, ενώ οι χαμηλές τιμές του E_{NR} αντιστοιχούν σε υψηλές τιμές πολικότητας.³⁵

1.4.3.6 pH

Το pH είναι μια ιδιότητα ιδιαίτερης σημασίας για πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, καθώς θα πρέπει να διασφαλίζεται η τιμή που θα προκαλέσει την ελάχιστη δυνατή διάβρωση. Στα DESs παρατηρείται μείωση του pH σε περίπτωση όπου ένα από τα συστατικά είναι όξινο, ενώ μείωση παρατηρείται και με την αύξηση της θερμοκρασίας.⁴¹

1.4.3.7 Επίδραση προσθήκης νερού στις φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs

Σε πολλές μελέτες των DESs έχει σκόπιμα δοκιμαστεί η προσθήκη νερού για την ρύθμιση των ιδιοτήτων τους, ώστε να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις ορισμένων εφαρμογών. Μάλιστα, το νερό μπορεί να επιτρέψει σε ορισμένες περιπτώσεις, την αύξηση της απόδοσης των DESs, αλλά παράλληλα να επηρεάσει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, καθιστώντας αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του νερού στα ευτηκτικά συστήματα.

Ιδιότητες όπως η αγωγιμότητα και το ιξώδες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην παρουσία του νερού. Όπως προέκυψε από μελέτη, DES με χλωριούχο χολίνη και ουρία αραιώθηκε με τελική περιεκτικότητα σε νερό 10% w/w και το ιξώδες μειώθηκε κατά 80%, ενώ η αγωγιμότητα τριπλασιάστηκε. Η μείωση της πυκνότητας δεν φαίνεται να είναι τόσο έντονη με την παρουσία νερού, ωστόσο παρατηρείται γραμμική μείωση. Επιπλέον, το νερό είναι ένα συστατικό με υψηλή πολικότητα, και όπως ήταν αναμενόμενο η προσθήκη του στο DES επέφερε αύξηση της πολικότητας.

Αξίζει να επισημανθεί ότι προσθήκη νερού στα DES μπορεί να λειτουργήσει θετικά και να συνεισφέρει στην παράκαμψη ορισμένων αδυναμιών τους, όπως είναι το υψηλό ιξώδες, διατηρώντας παράλληλα τις ελκυστικές τους ιδιότητες. Το νερό μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πρόσθετος δότης δεσμών υδρογόνου, που θα ενισχύσει το πλέγμα δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται, ωστόσο περαιτέρω αραιώση μπορεί να οδηγήσει στην αποδυνάμωση αυτών των αλληλεπιδράσεων λόγω της τάσης του νερού να αλληλεπιδρά με τα συστατικά του διαλύτη. Η ποσότητα νερού που πρέπει να προστεθεί, ώστε να πραγματοποιηθεί αυτή η μετάβαση δεν είναι η ίδια για κάθε DES και ακόμα βρίσκεται υπό διερεύνηση.³⁸

1.4.4 Εφαρμογές των DESs

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν γίνει ευρέως γνωστοί, κυρίως στον τομέα της εκχύλισης φυσικών προϊόντων από φυτά, τρόφιμα και άλλες φυσικές μήτρες. Ειδικότερα, τα NaDESs έχουν τη δυνατότητα διάλυσης τόσο μη πολικών όσο και πολικών ενώσεων, καθώς με την προσθήκη νερού είναι εφικτός ο έλεγχος της ικανότητας διαλυτοποίησης. Συγκεκριμένα, για την εκχύλιση πολικών ενώσεων συνίσταται η προσθήκη νερού στο NaDES, ενώ οι μη πολικές ενώσεις είναι πιο διαλυτές σε αμιγές NaDES. Ακόμα, οι διαλύτες αυτοί έχουν αποδείξει ότι μπορούν να επιτύχουν υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης σε

σύγκριση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες και σε συνδυασμό με την υψηλή σταθερότητα τους, καθίστανται εξαιρετικοί υποψήφιοι για την αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών. Κατά την εκχύλιση, τα NaDESs παρουσιάζουν δύο βασικούς μηχανισμούς δράσης: 1) την άμεση δράση όπου ο διαλύτης αλληλεπιδρά με τις ενώσεις-στόχους, συνήθως με δεσμούς υδρογόνου και 2) την έμμεση δράση όπου ο διαλύτης δρα ως διαλύτης προεπεξεργασίας και συμβάλλει στην καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος, απελευθερώνοντας την ένωση-στόχο από τη φυτική μήτρα.^{40, 42, 43, 44}

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα των NaDES να λειτουργούν ως μέσα σε ενζυματικές αντιδράσεις. Ενδεικτικά, παρατηρήθηκε πως κατά την προεπεξεργασία βιομάζας με NaDES με χλωριούχο χολίνη-γαλακτικό οξύ (1:5), ευνοήθηκε η απομάκρυνση της λιγνίνης κατά 60% w/w, ενώ η επακόλουθη ενζυματική υδρόλυση της βιομάζας παρουσίασε ικανοποιητική αποτελεσματικότητα. Ακόμα, τα NaDESs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συνδιαλύτες και να αυξήσουν την απόδοση βιοκαταλύσεων, όπως παρατηρήθηκε χαρακτηριστικά κατά την μετατροπή της ισοευγενόλης σε βανιλίνη από τον *Lysinibacillus fusiformis*. Η βανιλίνη αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα αρώματα παγκοσμίως και η ζήτησή της είναι αδύνατο να καλυφθεί από διεργασίες εκχύλισης από φυσικές πηγές καθώς και από τη χημική της σύνθεση. Μια πιθανή προσέγγιση για την επίλυση αυτού του προβλήματος είναι η αξιοποίηση ενός ολόκληρου κυττάρου ως βιοκαταλύτη, όπως ο μικροοργανισμός *L. fusiformis*, στον βιομετασχηματισμό της βανιλίνης από την ισοευγενόλη. Με την χρήση NaDES ως συνδιαλύτη, η απόδοση παραγωγής βανιλίνης αυξήθηκε κατά 142%. Οι συγγραφείς απέδωσαν την βελτίωση της απόδοσης στην αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών που προκλήθηκε από το NaDES.⁴⁵

Μια άλλη αξιοποίηση των NaDESs αφορά την εφαρμογή τους ως χρωματογραφικά μέσα. Δεδομένου ότι τα NaDESs έχουν την ικανότητα να εκχυλίζουν επιλεκτικά φυσικά προϊόντα σε υψηλές αποδόσεις, μπορούν να παρουσιάσουν και χρωματογραφική εκλεκτικότητα για τον διαχωρισμό των προϊόντων αυτών. Επιπλέον, αναμένεται να αυξηθεί με την πάροδο του χρόνου η ποικιλομορφία των NaDESs ως εκλουστικών μέσων, λόγω της ανάπτυξης υδρόφοβων NaDESs, ενώ έχει ήδη δοκιμαστεί η εφαρμογή τους σε διφασικό σύστημα διαλύτη για τον διαχωρισμό μείγματος φυσικών προϊόντων, που πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.⁴⁶

Το γεγονός ότι τα NaDESs είναι μη τοξικά, ασφαλή και σταθερά, επιτρέπουν την αξιοποίησή τους σε πολλές φαρμακευτικές εφαρμογές, καθώς μπορούν να συμμορφωθούν με τις αυστηρές προϋποθέσεις που απαιτούνται στον φαρμακευτικό κλάδο. Ειδικότερα, μελέτη επιβεβαιώνει την αύξηση της διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας της ρουτίνης και της βερβερίνης, όταν ενσωματώθηκαν σε NaDES, ενώ επίσης αυξήθηκαν τα επίπεδα και η σταθερότητα τους στο πλάσμα, επιτυγχάνοντας το ίδιο φαρμακολογικό αποτέλεσμα με χαμηλότερη δόση, ως αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης του διαλύτη με τις φαρμακευτικές ουσίες.⁴⁷ Τέλος, πολλά υποσχόμενη είναι η

ιδέα ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων, που θα έχουν NaDEs ως έκδοχα και θα ενισχύουν την διαλυτότητα, καθώς έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν ουσίες που δεν διαλύονται εύκολα στο νερό. ⁴²

1.5 Πειραματικός σχεδιασμός (Design of Experiments, DoE)

Ο πειραματικός σχεδιασμός είναι μια ασφαλής μέθοδος για την λήψη έγκυρων και αντικειμενικών συμπερασμάτων βάσει των δεδομένων που έχουν συλλεχθεί κατά την πειραματική διαδικασία. Συμβάλλει στον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν μια διεργασία, αφού πρώτα έχουν οριστεί ο στόχος του πειράματος και οι παράγοντες που θα μελετηθούν, ενώ επίσης εντοπίζει τις συνθήκες που επιφέρουν την βέλτιστη απόκριση. Βασικά οφέλη του πειραματικού σχεδιασμού αποτελούν τα εξής ⁴⁸:

α) Ο πειραματικός σχεδιασμός προσφέρει την δυνατότητα χειρισμού της ανεξάρτητης μεταβλητής για την παρατήρηση της επίδρασής της στην εξαρτημένη μεταβλητή. Έτσι, καθιστάται εφικτός ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ αιτίας και αποτελέσματος.

β) Πέρα από τον χειρισμό των ανεξάρτητων μεταβλητών, δίνεται η επιλογή εξάλειψης των ανεπιθύμητων μεταβλητών.

γ) Μεγαλύτερος έλεγχος των εξωγενών μεταβλητών σε σύγκριση με άλλες μεθόδους.

δ) Προσφέρεται η δυνατότητα στον πειραματιστή να επαναρυθμίσει το πείραμα και να επαναλάβει ή να ελέγξει τα αποτελέσματά του.

1.5.1 Μέθοδος επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)

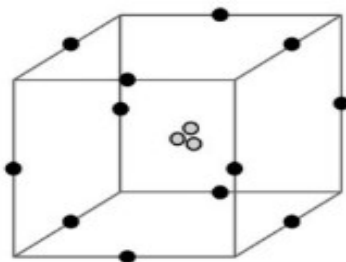
Η μέθοδος της επιφάνειας απόκρισης μπορεί να περιγραφεί ως μια τεχνική που περιλαμβάνει σύνθετες υπολογιστικές μεθόδους για την βελτιστοποίηση μιας διεργασίας. Αναπτύσσει έναν κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό που λαμβάνει υπόψη όλες τις ανεξάρτητες μεταβλητές καθώς και τα δεδομένα εισόδου του πειράματος, και το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα σύνολο εξισώσεων καθώς και τιμές εξόδου, που προκύπτουν από μια σχεδιασμένη ανάλυση παλινδρόμησης. Η μέθοδος βασίζεται στην τοποθέτηση μιας επιφάνειας και ως εκ τούτου, αποσκοπεί στην κατανόηση της τοπογραφίας της επιφάνειας απόκρισης, συμπεριλαμβανομένων του τοπικού μέγιστου, του τοπικού ελάχιστου και των γραμμών κορυφογραμμής για την εύρεση της περιοχής που αντιστοιχεί στην κατάλληλη απόκριση. ^{49, 50}

Η μέθοδος εφαρμόζεται πολύ συχνά σε βιομηχανικές, βιολογικές, κλινικές, κοινωνικές και μηχανικές επιστήμες. Ο πρώτος στόχος της είναι ο

προσδιορισμός της βέλτιστης απόκρισης. Σε περίπτωση που υπάρχουν παραπάνω από μια βέλτιστες αποκρίσεις προσδιορίζεται μια συμβιβαστική βέλτιστη απόκριση, τηρώντας πάντα τους περιορισμούς στα δεδομένα του σχεδιασμού. Δεύτερος στόχος αποτελεί η επεξήγηση του τρόπου που μεταβάλλεται μια απόκριση προς μια κατεύθυνση μέσα από την προσαρμογή των μεταβλητών σχεδιασμού. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα εκτίμησης των παραμέτρων που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το μοντέλο, βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο τον χειριστή να επικεντρωθεί αποκλειστικά στις σημαντικότερες μεταβλητές.⁵¹

1.5.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken

Ο σχεδιασμός Box-Behnken αποτελεί ένα από τα εργαλεία της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης, που χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές για την βελτιστοποίηση των πειραματικών δοκιμών.⁵² Ο σχεδιασμός αυτός, βασίζεται σε έναν παραγοντικό σχεδιασμό τριών επιπέδων, τα οποία είναι κωδικοποιημένα ως -1, 0, +1. Συνολικά ο αριθμός των παραμέτρων που μπορούν να βελτιστοποιηθούν κυμαίνονται μεταξύ 3 και 21.⁵³ Για την βελτιστοποίηση τριών παραμέτρων, η αναπαράσταση του σχεδιασμού παρουσιάζεται στην εικόνα X. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στην περίπτωση που εξετάζονται τρεις πειραματικές παράμετροι A, B και C, απαιτούνται δώδεκα σημεία δεδομένων στην μέση κάθε δύο συνδυασμένων παραμέτρων και τρία σημεία επαναλήψεων, που τοποθετούνται στο κέντρο του κύβου, δηλαδή 15 μετρήσεις συνολικά.⁵⁴



Εικόνα 10: Αναπαράσταση σχεδιασμού τύπου Box-Behnken για τρεις παραμέτρους.⁵⁰

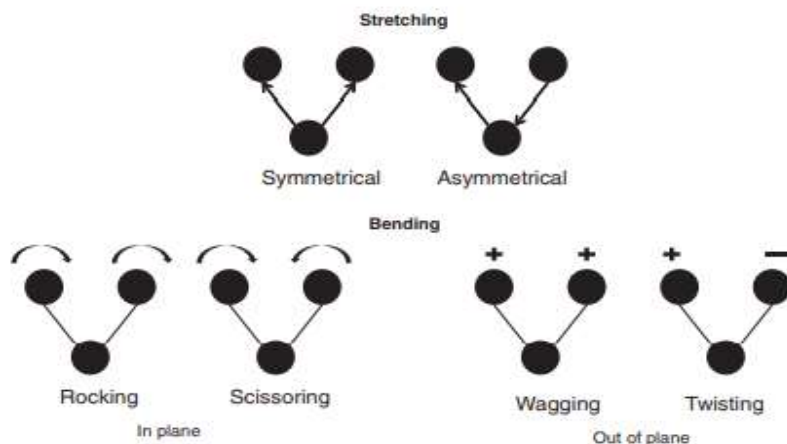
Ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται για την ανάπτυξη του σχεδιασμού Box-Behnken ορίζεται από την μαθηματική σχέση: $N = 2k \cdot (k - 1) + C_0$, όπου ως k ορίζεται ο αριθμός των παραμέτρων και ως C_0 ορίζεται ο αριθμός των κεντρικών σημείων.⁵⁵ Επισημαίνεται ότι ο σχεδιασμός Box-Behnken μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε αριθμητικές όσο και σε κατηγορικές παραμέτρους, ωστόσο οι κατηγορικές παράμετροι τείνουν να αυξήσουν τον αριθμό των πειραμάτων.⁵³ Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken είναι πλεονεκτικός έναντι άλλων μεθόδων βελτιστοποίησης, καθώς δεν περιλαμβάνει συνδυασμούς όπου όλοι οι παράγοντες βρίσκονται ταυτόχρονα στα υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα τους, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την εκτέλεση

πειραμάτων υπό ακραίες συνθήκες, που ενδεχομένως να είναι απαγορευτικά ακριβοί, να μην δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ή να μην μπορούν να πραγματοποιηθούν λόγω φυσικών περιορισμών.⁵⁵ Επιπλέον, απαιτεί μικρότερο αριθμό πειραμάτων σε σχέση με άλλες μεθόδους. Τέλος, παρουσιάζει πληθώρα εφαρμογών στις βιομηχανίες φαρμακευτικών ειδών και τροφίμων καθώς και για την βελτιστοποίηση της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων.⁵⁶

1.6 Μέθοδοι Ταυτοποίησης

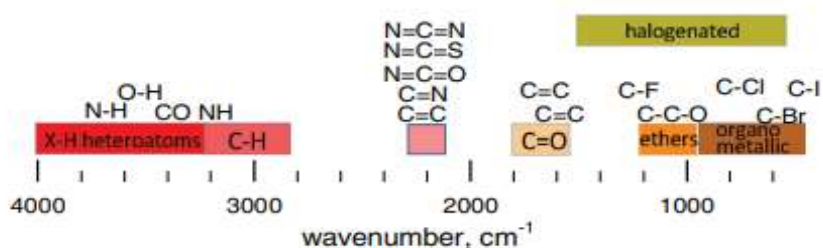
1.6.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές μεθόδους για την ταυτοποίηση και δομική ανάλυση χημικών ενώσεων. Η τεχνική στηρίζεται στην επιλεκτική απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από ενώσεις που παρουσιάζουν διπολική ροπή, λόγω των χαρακτηριστικών τους ομάδων, όπως το υδροξύλιο, το νιτρίλιο, το αμίδιο κλπ. Καθώς τα μόρια απορροφούν ενέργεια, δονούνται ακόμα περισσότερο, και αναλόγως την γεωμετρία του μορίου οι δονήσεις μπορεί να είναι είτε δονήσεις κάμψης, είτε δονήσεις τάσης. Συγκεκριμένα, οι δονήσεις τάσης περιλαμβάνουν την κίνηση ενός ατόμου εντός του άξονα του δεσμού, χωρίς να αλλάζει η γωνία δεσμού. Στην περίπτωση της συμμετρικής δόνησης τάσης, τα άτομα κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση, μακριά από ή προς το κεντρικό άτομο του μορίου, ενώ στην ασύμμετρη δόνηση τάσης, ισχύει ότι καθώς το ένα άτομο πλησιάζει το κεντρικό άτομο, το άλλο άτομο απομακρύνεται. Σχετικά με την δόνηση κάμψης, η κίνηση περιλαμβάνει την αλλαγή του άξονα και γωνίας δεσμού του ατόμου που συνδέεται με το κεντρικό άτομο. Οι δονήσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την επιλεκτική απορρόφηση ή/και μετάδοση ενέργειας και το μοτίβο του φάσματος απορρόφησης του μορίου αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμά» του. Ειδικότερα, το φασματογράφημα IR απεικονίζει την απορρόφηση σε σχέση με τα μήκη κύματος που κυμαίνονται μεταξύ 2,5-15 μm , και ισοδυναμούν σε 4000 με 650 cm^{-1} αν εκφραστούν ως προς τον κυματαριθμό.⁵⁷



Εικόνα 11: Τρόποι μοριακών δονήσεων.⁵⁸

Τυπικά, αναγνωρίζονται τέσσερις περιοχές των τύπων δεσμών που μπορούν να αναλυθούν από τα φάσματα IR. Όπως παρατηρείται από την εικόνα 12, ο απλός δεσμός (C-H, O-H, N-H) είναι ανιχνεύσιμος σε υψηλότερους κυματαριθμούς, δηλαδή στο εύρος 2500-4000 cm^{-1} . Ο διπλός και ο τριπλός δεσμός ανιχνεύονται στα 1500-2000 cm^{-1} και 2000-2500 cm^{-1} αντίστοιχα. Τέλος, η δόνηση του μορίου στο σύνολό του προκαλεί ένα πολύπλοκο μοτίβο δονήσεων στην περιοχή των χαμηλών τιμών του κυματαριθμού 650-1500 cm^{-1} , που είναι χαρακτηριστικό για κάθε μόριο και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή του.⁵⁸



Εικόνα 12: Περιοχές φάσματος IR για διάφορους τύπους δεσμών.⁵⁸

1.6.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance, NMR) είναι μια τεχνική που εκμεταλλεύεται τις μαγνητικές ιδιότητες ορισμένων ατομικών πυρήνων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των ατόμων ή των μορίων στα οποία περιέχονται. Η τεχνική δύναται προσφέρει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή, τη δυναμική, την κατάσταση αντίδρασης και το χημικό περιβάλλον των μορίων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με αυτοστροφορμή (spin), δηλαδή αυτών που διαθέτουν περιττό ατομικό ή μαζικό αριθμό, όπως τα $^1\text{H}_1$, $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_7$, $^{27}\text{Al}_{13}$, ενώ οι πυρήνες με ζυγό ατομικό ή μαζικό αριθμό, όπως τα $^{12}\text{C}_6$, $^{16}\text{O}_8$ και $^{56}\text{Fe}_{28}$ είναι αδύνατο να ανιχνευθούν με την μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, λόγω

έλλειψης αυτοστροφορμής. Για την λήψη του φάσματος απαραίτητη είναι η εφαρμογή μαγνητικού πεδίου, και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η ισχύς του μαγνητικού πεδίου τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η διακριτικότητα των φασμάτων. Πριν την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου σε ένα δείγμα, οι πυρήνες του διαθέτουν όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς, ενώ με την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου B_0 , οι πυρήνες προσανατολίζονται είτε προς την ίδια κατεύθυνση με την ένταση B_0 ($I_z=+1/2$, χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) είτε προς την αντίθετη ($I_z=-1/2$, υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση). Είθισται οι πυρήνες να τείνουν να προσανατολιστούν έτσι, ώστε αριθμητικά να υπερτερούν αυτοί που βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Σε αυτήν την περίσσεια των πρωτονίων χαμηλότερης ενέργειας οφείλεται η επιτυχία των μετρήσεων NMR, και για την δημιουργία της είναι απαραίτητο να επέλθει ο συντονισμός μεταξύ των πυρήνων και της πηγής ακτινοβολίας, καθώς μεταβάσεις δύο καταστάσεων συμβαίνουν μόνο όταν εκπέμπεται ή απορροφάται κβαντική ενέργεια ισοδύναμη με την ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων. Ο συντονισμός περιλαμβάνει την εκπομπής παλμών υψηλής συχνότητας, ώστε να διεγερθούν όλοι οι πυρήνες και να γίνει λήψη της κυματομορφής αποδιέγερσης. Κατά την αποδιέγερση των πυρήνων, επάγεται ένα ρεύμα, το οποίο αφού δειγματοληφθεί και ψηφιοποιηθεί, υπόκειται σε μετασχηματισμό κατά Fourier. Η μαθηματική επεξεργασία οδηγεί στην λήψη ενός φάσματος εντός ενός πεδίου συχνοτήτων. Τέλος, πραγματοποιούνται κάποιες διορθώσεις του φάσματος και ολοκληρώνονται οι σχηματισμένες κορυφές, καθώς οι τιμές της ολοκλήρωσης δίνουν πληροφορίες για τον αριθμό των πρωτονίων του εξεταζόμενου δείγματος.^{59,60}

Κεφάλαιο 2^ο: Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το χαμομήλι, χρησιμοποιώντας φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES).

Ειδικότερα, το χαμομήλι παρουσιάζει πληθώρα θεραπευτικών και καλλυντικών ιδιοτήτων και επιλέχθηκε, καθώς δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στην διεθνή βιβλιογραφία η εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών του με χρήση NaDESs. Συνολικά σχεδιάστηκαν έξι διαφορετικά NaDESs, μελετήθηκαν φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως το pH και η πολικότητα, ενώ επίσης πραγματοποιήθηκε δομικός χαρακτηρισμός μέσω της λήψης φασμάτων NMR και FTIR για τρεις διαλύτες (βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3, βεταΐνη- D,L γαλακτικό οξύ-νερό 1:2:2,5, D γλυκόζη-D, L γαλακτικό οξύ-νερό 1:5:6,2). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν σε καθορισμένες συνθήκες εκχυλίσεις χαμομηλιού, όπου προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), καθώς και η περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά. Ακόμα, εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν και με συμβατικούς διαλύτες, και συγκεκριμένα με νερό καθώς και με αιθανόλη-νερό (70:30).

Από την μελέτη προέκυψε πως ο διαλύτης εκχύλισης που απέδωσε την υψηλότερη τιμή TPC και TFC ήταν το NaDES D-γλυκόζη: D,L-γαλακτικό οξύ αναμειγμένο με νερό σε κατά βάρος αναλογία 75:25, και επομένως ο διαλύτης αυτός επιλέχθηκε για την βελτιστοποίηση της διεργασίας. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, και οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν το κατά βάρος ποσοστό προστιθέμενου νερού στο NaDES, η διάρκεια εκχύλισης και η αναλογία της μάζας χαμομηλιού προς τη μάζα του διαλύτη. Τέλος, μεταβλητές απόκρισης ορίστηκαν το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή καθώς και η αντιοξειδωτική δράση.

2.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα όργανα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των DESs, την εκχύλιση του χαμομηλιού και τον προσδιορισμό των βιοδραστικών συστατικών.

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα.

Όργανο/ Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (έως 110 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (έως 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας	Witeg	MSH-20A

με θερμαινόμενο μάτι		
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Αναδευτήρας Vortex	Lbx Instruments	V05 series
Απαγωγός κάθετης νηματικής ροής	Bioair	-
Συσκευή NMR	Varian Gemini	300
Συσκευή IR	JASCO FT/IR	4200

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα.

Αντιδραστήριο	Μοριακός Τύπος	Προμηθευτής
Απιονισμένο νερό	H ₂ O	-
D-Γλυκόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma Aldrich
Γαλακτικό Οξύ (διάλυμα 80-85 v/v%)	C ₃ H ₆ O ₃	Alfa Aesar
Γλυκερόλη	C ₃ H ₈ O ₃	Kalo Chem
Κονιοποιημένο χαμομήλι	-	
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Aldrich
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	Sigma Aldrich
Ανθρακικό Νάτριο	Na ₂ CO ₃	Penta
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	-	Merck Millipore
Νιτρώδες νάτριο	NaNO ₂	Sigma Aldrich
Χλωριούχος αργίλιος	AlCl ₃	Sigma Aldrich
Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma Aldrich
Γαλλικό Οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	Merck Millipore
Άνυδρη Βεταΐνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Alfa Aesar
D-Φρουκτόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆	labkem

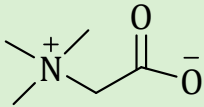
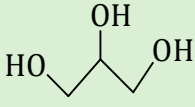
2.3 Σύνθεση των NaDESs

Για την παρασκευή των NaDESs αρχικά ζυγίζονται οι απαραίτητες ποσότητες από κάθε συστατικό, όπως προκύπτουν από τις επιθυμητές μοριακές αναλογίες τους. Στην συνέχεια, τα συστατικά τοποθετούνται εντός σφαιρικής φιάλης και το σύστημα αφήνεται να αναδευθεί υπό θέρμανση μεχρις ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές, άχρωμο και ομοιογενές. Όταν ολοκληρωθεί η παρασκευή του διαλύτη, αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στην συνέχεια, αποθηκεύεται σε γυάλινο φιαλίδιο vial. Η διάρκεια ανάδευσης και η απαιτούμενη θερμοκρασία διαφοροποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των συστατικών του διαλύτη. Παρακάτω παρουσιάζονται οι απαιτούμενες ποσότητες των συστατικών, οι μοριακές αναλογίες τους, η απαιτούμενη διάρκεια και θερμοκρασία για την σύνθεση των διαλυτών.

- Βεταΐνη- Γλυκερόλη (Bet-Gly) (1:2)

Ζυγίζονται 6 g στερεής άνυδρης βεταΐνης (51 mmol) σε ζυγό ακρίβειας και προστίθενται 9,4 g γλυκερόλης (102 mmol). Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 70°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι ίση με 5 ώρες.

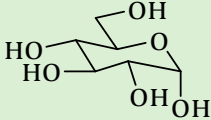
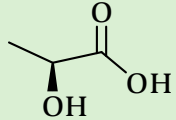
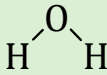
Πίνακας 3: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:2.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου(HBD)	Μοριακή αναλογία
Βεταΐνη-Γλυκερόλη (Bet-Gly)	 Βεταΐνη (MW=117,15)	 Γλυκερόλη (MW=92,09)	1:2

- D-Γλυκόζη-D, L Γαλακτικό οξύ-Νερό (Glu- LA-W) (1:5:6,2)

Ζυγίζονται 3 g D-γλυκόζης (17 mmol) καθώς και 7,5 g D, L-γαλακτικού οξέος (83 mmol, 7,8 mL, 80-85 % v/v). Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 70°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι 1 ώρα. Επισημαίνεται ότι η μοριακή αναλογία του νερού οφείλεται στο υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του NaDES.

Πίνακας 4: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES γλυκόζη-γαλακτικό οξύ-νερό.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου(HBD)	Νερό	Μοριακή αναλογία
D-Γλυκόζη-D, L Γαλακτικό οξύ-Νερό (Glu-LA-W)	 D-Γλυκόζη (MW=180,2 g/mol)	 D, L Γαλακτικό οξύ (MW=90,08 g/mol)	 Νερό (MW=18,02 g/mol)	1:5:6,2

Αποτίμηση φάσματος FTIR

IR ν_{\max} 3461 (O-H stretching), 2994 (C-H stretching), 1737 (C=O stretching), 1365 (C-H bending), 1218 (C-O stretching), 1130 (C-O stretching) cm^{-1} .

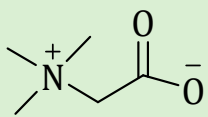
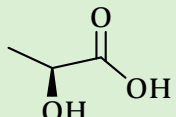
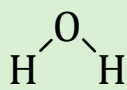
Αποτίμηση φάσματος NMR

^1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 4,950-4,880 (m, 2H), 4,321-4,237 (m, 2H), 4,210-4,093 (m, 2H), 4,033 (q, $J = 6.9$ MHz, 5H, 5x -CH-, D,L-Lactic acid), 3,802-3,298 (m, 4H), 3,136-3,016 (m, 3H), 2,926-2,855 (m, 1H), 1400-1,263 (m, 1H), 1,223 (s, $J=6.9$ MHz, 15H, 5x -CH₃, D,L-Lactic acid).

- Βεταΐνη- D,L Γαλακτικό οξύ- Νερό (Bet-LA-W) (1:2:2,5)

Ζυγίζονται 2 g στερεής άνυδρης βεταΐνης (17 mmol) και 3,1 g D, L-γαλακτικού οξέος (34 mmol, 3.2 mL, 80-85 % v/v) σε ζυγό ακριβείας. Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 60°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι μισή ώρα. Επισημαίνεται ότι η μοριακή αναλογία του νερού οφείλεται στο υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του NaDES.

Πίνακας 5: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου (HBD)	Νερό	Μοριακή αναλογία
Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό (Bet-LA-W)	 Βεταΐνη (MW=117,15 g/mol)	 D, L Γαλακτικό οξύ (MW=90,08 g/mol)	 Νερό (MW=18,02 g/mol)	1:2:2,5

Αποτίμηση φάσματος FTIR

IR ν_{\max} 3369 (O-H stretching), 2879 (C-H stretching), 1729 (C=O stretching), 1631 (C=O stretching), 1396 (C-H bending), 1228 (C-O stretching, C-N stretching) 1128 (C-O stretching, C-N stretching), 1045 (C-O stretching, C-N stretching) cm^{-1} .

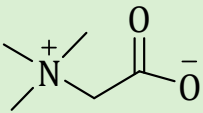
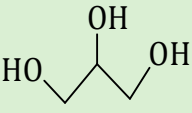
Αποτίμηση φάσματος NMR

^1H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm) 6,086 (s, 9H, -OH), 4,049 (q, $J = 6.6$ MHz, 2H, 2x -CH-, D,L-Lactic acid), 3,790 (s, 2H, N-CH₂-, Betaine), 3,140 (s, 9H, 3x -CH₃, Betaine), 1,189 (d, $J = 7,2$ MHz, 6H, 2x -CH₃, D,L-Lactic acid).

- Βεταΐνη-Γλυκερόλη (Bet-Gly) (1:3)

Ζυγίζονται 2 g στερεής άνυδρης βεταΐνης (17 mmol) σε ζυγό ακριβείας και προστίθενται 4,7 g γλυκερόλης (51 mmol). Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 70°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι ίση με 5 ώρες.

Πίνακας 6: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου(HBD)	Μοριακή αναλογία
Βεταΐνη-Γλυκερόλη (Bet-Gly)	 <p>Βεταΐνη (MW=117,15)</p>	 <p>Γλυκερόλη (MW=92,09)</p>	1:3

Αποτίμηση φάσματος IR

IR ν_{\max} 3357 (O-H stretching), 2879 (C-H stretching), 1631 (C=O stretching), 1396 (C-H bending), 1338 (C-H bending), 1216 (C-O stretching, C-N stretching), 1043 (C-O stretching, C-N stretching) cm^{-1} .

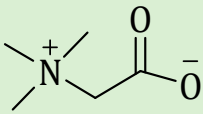
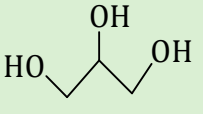
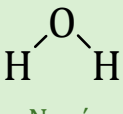
Αποτίμηση φάσματος NMR

^1H NMR (600 MHz, DMSO, d_6) δ (ppm), 4,510-4,486 (m, 2H), 4,434-4,401 (m, 5H), 3,545 (d, $J=5.4$, 2H), 3,444-3,399 (m, 2H), 3,377-3,333 (m, 9H), 3,300-3,264 (m, 6H), 3,131 (s, 9H, 3x -CH₃, Betaine).

- Βεταΐνη- Γλυκερόλη- Νερό (Bet-Gly-W) (1:2:1)

Αρχικά ζυγίζονται 2 g στερεής άνυδρης βεταΐνης (17 mmol), καθώς και 3,1 g γλυκερόλης (34 mmol) μαζί με 0,3 g απιονισμένου νερού (17 mmol). Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 70°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι ίση με 5 ώρες.

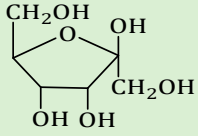
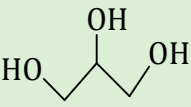
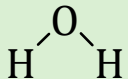
Πίνακας 7: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES βεταΐνη-γλυκερόλη-νερό.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου(HBD)	Νερό	Μοριακή αναλογία
Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό (Bet-Gly-W)	 <p>Βεταΐνη (MW=117,15 g/mol)</p>	 <p>Γλυκερόλη (MW=92,09 g/mol)</p>	 <p>Νερό (MW=18,02 g/mol)</p>	1:2:1

- Φρουκτόζη- Γλυκερόλη- Νερό (Fru-Gly-W) (1:1:5)

Αρχικά ζυγίζονται 2,5 g φρουκτόζης (14 mmol), καθώς και 1,3 g γλυκερόλης (14 mmol) μαζί με 1,2 g απιονισμένου νερού (70 mmol). Η θερμοκρασία που απαιτείται για την παρασκευή του διαλύτη είναι 60°C, ενώ η διάρκεια σύνθεσης είναι ίση με 2 ώρες.

Πίνακας 8: Συντακτικοί τύποι, μοριακά βάρη και μοριακή αναλογία των συστατικών του NaDES φρουκτόζη- γλυκερόλη – νερό.

Όνομα NaDES	Δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμού υδρογόνου(HBD)	Νερό	Μοριακή αναλογία
Φρουκτόζη-Γλυκερόλη-Νερό (Fru-Gly-W)	 <p>Φρουκτόζη (MW=180,16 g/mol)</p>	 <p>Γλυκερόλη (MW=92,09 g/mol)</p>	 <p>Νερό (MW=18,02 g/mol)</p>	1:1:5

2.4 Χαρακτηρισμός NaDESs

2.4.1 Δομικός χαρακτηρισμός NaDESs

Τα φάσματα υπεράθρου FTIR καταγράφηκαν με χρήση του φασματομέτρου JASCO FT/IR-4200 (Easton, MD, USA) σε εύρος 4000–400 cm⁻¹.

Ο χαρακτηρισμός των συντιθέμενων μορίων και ο έλεγχος της καθαρότητάς τους πραγματοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ¹H NMR. Τα φάσματα ¹H (πρωτονίου) καταγράφηκαν με τα όργανα Varian Gemini 300 MHz και 600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, d₆). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ οι τιμές των σταθερών συζεύξεων (J) σε Hz. Οι πολλαπλότητες των σημάτων στα φάσματα ¹H NMR περιγράφονται ως εξής:

- **s** (singlet, απλό)
- **d** (doublet, διπλό)
- **t** (triplet, τριπλό)
- **q** (quartet, τετραπλό)
- **m** (multiplet, πολλαπλό)
- **dd** (doublet of doublets, διπλό διπλών)
- **brs** (broad singlet, ευρύ απλό)

2.4.2 Προσδιορισμός πολικότητας

Η πολικότητα των NaDESs θα μετρηθεί μέσω του δείκτη Ερυθρό του Νείλου (Nile red). Αρχικά, για την παρασκευή διαλύματος Nile red λαμβάνονται 31 μL από τον δείκτη, τα οποία αραιώνονται με 969 μL αιθανόλης. Έπειτα, εντός κυψελίδας 1 mm προστίθεται ποσότητα NaDES όγκου 2 mL και πραγματοποιείται φωτομέτρηση μέσω του φασματοφωτόμετρου UV-Vis στην περιοχή 400-700 nm. Η μέτρηση αυτή αντιστοιχεί στην μέτρηση του τυφλού δείγματος και στην συνέχεια, προστίθεται εντός της κυψελίδας με τον διαλύτη, ποσότητα διαλύματος Nile-red όγκου 30 μL. Το σύστημα αναμειγνύεται, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του διαλύματος δείκτη στο διαλύτη

και ακολουθεί φωτομέτρηση στο εύρος 400-700 nm. Τέλος, προσδιορίζεται το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην μέγιστη απορρόφηση του δείγματος (λ_{\max}) και υπολογίζεται η ενέργεια μοριακής μετάβασης σύμφωνα με τον τύπο:

$$E_{\text{NR}} = \frac{28591}{\lambda_{\max}} \quad (\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$$

2.4.2 Προσδιορισμός pH

Για τη μέτρηση του pH των NaDESs, αρχικά βαθμονομήθηκε το πεχάμετρο χρησιμοποιώντας δύο πρότυπα διαλύματα (buffers) με pH=4 και pH=7. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του ηλεκτροδίου με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια αυτό τοποθετήθηκε στο δοχείο που περιείχε το NaDES, μέχρι να σταθεροποιηθεί η ένδειξη του οργάνου.

2.5 Εκχύλιση χαμομηλιού με NaDES και θέρμανση σε ελαιόλουτρο

2.5.1 Προετοιμασία πρώτης ύλης

Το χαμομήλι που χρησιμοποιήθηκε για τις εκχυλίσεις αποτελεί εμπορικό προϊόν, και επομένως δεν χρειάστηκε κάποια προκατεργασία ξήρανσης. Για την προετοιμασία της εκχύλισης, το χαμομήλι πρώτα τρίφτηκε σε γουδι, προκειμένου να έχει μειωμένη κοκκομετρία και αποθηκεύτηκε σε δοχείο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.5.2 Εκχύλιση χαμομηλιού

Για την εκχύλιση του χαμομηλιού, λουτρό τοποθετείται σε θερμαινόμενη πλάκα και προθερμαίνεται στους 40°C. Παράλληλα, ζυγίζονται με χρήση ζυγού ακριβείας 4 g NaDES και 0.1 g χαμομηλιού, τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο vial μαζί με μαγνήτη ανάδευσης. Το δοχείο τοποθετείται εντός του λουτρού με θερμομέτρο, προκειμένου να ελέγχεται η θερμοκρασία και αφήνεται για 1 ώρα. Αφού ολοκληρωθεί η εκχύλιση, το εκχύλισμα διαχωρίζεται από το στερεό μέσω διήθησης υπό κενό και στην συνέχεια, αποθηκεύεται σε γυάλινο φιαλίδιο vial. Τέλος, το εκχύλισμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος υπό ψύξη.

Για λόγους σύγκρισης, η εκχύλιση πραγματοποιείται με χρήση συμβατικών διαλυτών. Ειδικότερα, επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία με την διαφορά ότι αντί για NaDES χρησιμοποιούνται ως διαλύτης το νερό καθώς και το σύστημα αιθανόλη-νερό (70:30). Στην συνέχεια, προκειμένου να απομονωθεί το εκχύλισμα πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και εξάτμιση με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα.

Πίνακας 9: Κωδικοποίηση και συνθήκες εκχύλισης πρώτης σειράς πειραμάτων.

Κωδικός Πειράματος	Διαλύτης & Μοριακή αναλογία	Διάρκεια εκχύλισης (h)	Θερμοκρασία εκχύλισης	Αναλογία mg χαμομηλιού/ g διαλύτη
GB7	Bet-Gly (1:2)	1	40°C	25
GB9	Bet-LA-W (1:2:2,5)	1	40°C	25
GB10	Bet-Gly (1:3)	1	40°C	25
GB13	Bet-Gly-W (1:2:1)	1	40°C	25
GB16	Glu-LA-W:W (75:25)	1	40°C	25
GB21	Glu-LA-W (1:5:6,2)	1	40°C	25
GB29	Fru-Gly-W (1:1:5)	1	40°C	25
GB33	EtOH-W (70:30)	1	40°C	25
GB39	W	1	40°C	25

2.6 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός του διαλύτη με την υψηλότερη απόδοση εκχυλίσματος των βιοδραστικών ενώσεων. Ειδικότερα, για τα 7 εκχυλίσματα που προκύπτουν από την πρώτη σειρά εκχυλίσεων, προσδιορίζεται το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις, καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται αντίστοιχα σε κάθε περίπτωση, είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu, η μέθοδος χλωριούχου αργιλίου και η ικανότητα δέσμευσης ρίζας DPPH. Από την συγκριτική μελέτη, επιλέγεται ο κατάλληλος διαλύτης και καθορίζονται οι παράμετροι εκχύλισης της δεύτερης σειράς εκχυλίσεων, ώστε να βελτιστοποιηθεί η διεργασία εκχύλισης μέσω του πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken.

Ειδικότερα, οι παράμετροι που εξετάζονται είναι οι εξής:

- Ο χρόνος εκχύλισης (x_1)
- Η αναλογία mg χαμομηλιού/ g NaDES (x_2)
- Το κατά βάρος ποσοστό νερού στο διαλύτη (x_3)

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

- Συγκεκριμένα, για την παράμετρο x_1 :
 - - → 2 (h)
 - 0 → 4 (h)
 - + → 6 (h)
- Για την παράμετρο x_2 :
 - - → 20 (mg/g)
 - 0 → 50 (mg/g)
 - + → 80 (mg/g)

- Για την παράμετρο x_3 :
 - $- \rightarrow 0$ (% w/w)
 - $0 \rightarrow 25$ (% w/w)
 - $+ \rightarrow 50$ (% w/w)

Επισημαίνεται ότι οι παράμετροι αυτές επιλέχθηκαν, καθώς είναι εύκολα διαχειρίσιμες, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την απόδοση της εκχύλισης, ενώ επίσης, έχουν μελετηθεί εκτενώς στην διεθνή βιβλιογραφία.

Για την διεξαγωγή του πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκαν συνολικά 14 πειράματα, των οποίων οι συνθήκες και ο συμβολισμός κατά Box-Behnken παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10: Κωδικοποίηση και συνθήκες πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

Κωδικός Πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (x_1)	Λόγος mg Χαμομηλιού/g διαλύτη (x_2)	% w/w Νερού ως συνδιαλύτης (x_3)
GB37	--0	2	20	25
GB36	-0+	2	50	50
GB38	-0-	2	50	0
GB42	++0	2	80	25
GB47	000	4	50	25
GB49	000	4	50	25
GB52	000	4	50	25
GB41	0+-	4	80	0
GB40	0--	4	20	0
GB44	0++	4	80	50
GB43	0-+	4	20	50
GB51	+0-	6	50	0
GB45	+-0	6	20	25
GB50	++0	6	80	25
GB46	+0+	6	50	50

2.7 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

2.7.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων

Για την μέτρηση του συνολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις ακολουθήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ και επομένως, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις εκφράστηκε σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, σε εppendorf τοποθετούνται 20 μ L εκχυλίσματος μαζί με 1 mL απιονισμένου νερού και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Στην συνέχεια, προστίθενται 100 μ L αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, ακολουθεί ανάδευση σε

vortex και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 5 λεπτά, λόγω φωτοευαισθησίας του αντιδραστήριου. Έπειτα, προστίθενται 300 mL Na₂CO₃ μαζί με 580 mL απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και αποθήκευση σε σκοτεινό χώρο για 1 ώρα. Τέλος, με χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis μετράται η απορρόφηση του διαλύματος στα 755 nm.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τυφλό δείγμα καθώς και για δείγματα γαλλικού οξέος διαφόρων συγκεντρώσεων. Ειδικότερα, προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς και να προσδιοριστεί η εξίσωση της καμπύλης, μετρούνται για 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις υδατικού διαλύματος γαλλικού οξέος οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 755 nm.

Συνεπώς, η πραγματική απορρόφηση των εκχυλισμάτων (A) είναι ίση με:

$$A_{\text{extract}} = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$$

Όπου A_{sample} η απορρόφηση του δείγματος με το εκχύλισμα και A_{blank} η απορρόφηση του τυφλού δείγματος

Στην συνέχεια, υπολογίζονται τα ισοδύναμα γαλλικού οξέος $C_{\text{Gallic acid}}$, από την εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη αναφοράς:

$$C_{\text{Gallic Acid}} = 0,893 \cdot A_{\text{extract}} - 0,0008 \quad \text{με} \quad R^2 = 0,9699$$

Τέλος, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (TPC) υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\text{TPC} \left(\frac{\text{mg galic acid}}{\text{g chamomile}} \right) = \frac{C_{\text{Gallic acid}} \left(\frac{\text{mg gallic acid}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extract}}(\text{L}) \cdot D}{m_{\text{chamomile}}(\text{g})}$$

Όπου $C_{\text{Gallic acid}}$: η συγκέντρωση σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

V_{extract} : ο όγκος του εκχυλίσματος

D: ο παράγοντας αραίωσης

$m_{\text{chamomile}}$: η μάζα του χαμομηλιού που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση

Επισημαίνεται ότι για λόγους ακρίβειας οι μετρήσεις για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται εις τριπλούν.

2.7.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων

Για την μέτρηση του συνολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή ακολουθήθηκε η μέθοδος του τριχλωριούχου αργιλίου. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η κατεχίνη και επομένως, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή εκφράστηκε σε ισοδύναμα κατεχίνης. Συγκεκριμένα, σε erpendorf τοποθετούνται 50 mL εκχυλίσματος μαζί με 30 mL NaNO₂ 5%, ακολουθεί

ανάδευση με vortex και το διάλυμα αφήνεται να επωαστεί για 6 λεπτά. Στην συνέχεια, προστίθενται 60 μL AlCl_3 , ακολουθεί ανάδευση σε vortex και επώαση για 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 300 μL NaOH συγκέντρωσης 1M και 560 μL απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και αφήνεται για επώαση για 15 λεπτά. Τέλος, με χρήση του φασματοφωτόμετρου UV-Vis μετράται η απορρόφηση του διαλύματος στα 500 nm.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τυφλό δείγμα καθώς και για δείγματα κατεχίνης διαφόρων συγκεντρώσεων. Ειδικότερα, προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς και να προσδιοριστεί η εξίσωση της καμπύλης, μετρούνται για 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις υδατικού διαλύματος κατεχίνης οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 500 nm.

Συνεπώς, η πραγματική απορρόφηση των εκχυλισμάτων (A) είναι ίση με:

$$A_{\text{extract}} = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$$

Όπου A_{sample} η απορρόφηση του δείγματος με το εκχύλισμα και A_{blank} η απορρόφηση του τυφλού δείγματος

Στην συνέχεια, υπολογίζονται τα ισοδύναμα κατεχίνης C_{catechin} , από την εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη αναφοράς:

$$C_{\text{catechin}} = 0,8712 \cdot A_{\text{extract}} - 0,0209 \quad \text{με} \quad R^2 = 0,9977$$

Τέλος, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (TFC) υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\text{TFC} \left(\frac{\text{mg catechin}}{\text{g chamomile}} \right) = \frac{C_{\text{catechin}} \left(\frac{\text{mg catechin}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{extract}} (\text{L}) \cdot D}{m_{\text{chamomile}} (\text{g})}$$

Όπου C_{catechin} : η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κατεχίνης

V_{extract} : ο όγκος του εκχυλίσματος

D : ο παράγοντας αραίωσης

$m_{\text{chamomile}}$: η μάζα του χαμομηλιού που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση

Επισημαίνεται ότι για λόγους ακρίβειας οι μετρήσεις για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται εις τριπλούν.

2.7.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, οι ρίζες DPPH όταν βρεθούν μαζί με αντιοξειδωτικές ουσίες ανάγονται, με αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από μωβ σε κίτρινο.

Για την δημιουργία του διαλύματος DPPH, ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg DPPH και διαλύονται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 50 ml. Το διάλυμα αναμειγνύεται και διατηρείται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 4°C, ενώ η αποθήκευση του διαλύματος δεν διαρκεί παραπάνω από 48 ώρες, καθώς θα πρέπει να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή των ριζών. Έπειτα, για την παρασκευή του δείγματος (stock) αραιώνονται 50 μL εκχυλίσματος σε 950 μL αιθανόλης ώστε να προκύψει εκχύλισμα συγκέντρωσης 5% v/v. (αρχική συγκέντρωση C). Σε microplate 96 θέσεων προστίθενται 100 μL διαλύματος DPPH, καθώς και ποσότητα από το stock, το οποίο αραιώνεται με αιθανόλη σε τελικό όγκο 100 μL, ώστε οι τελικές του συγκεντρώσεις κατά μήκος μιας σειράς του plate να είναι ίσες με C, 0.8C, 0.6 C, 0.4 C και 0.2C. Τα διαλύματα επωάζονται για 15, 30 και 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό χώρο και με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (UV-Vis) μετρούνται οι αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων στα 515 nm.

Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται και για τα τυφλά δείγματα, τα οποία παρασκευάζονται με ανάμειξη 100 μL DPPH με 100 μL αιθανόλης. Για λόγους ακρίβειας, λαμβάνονται τρεις επαναληπτικές μετρήσεις τόσο στα τυφλά δείγματα, όσο και στα δείγματα του εκχυλίσματος και υπολογίζεται η μέση τιμή των μετρήσεων.

Έπειτα, αφού ληφθούν τα αποτελέσματα των απορροφήσεων, κατασκευάζεται το διάγραμμα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων (μL εκχυλίσματος/mL δείγματος). Το ποσοστό αναστολής της ρίζας υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$(\%) \text{ Αναστολή ρίζας} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Όπου ως A_{blank} ορίζεται η απορρόφηση του τυφλού δείγματος και ως A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν το εκχύλισμα.

Από την εξίσωση της ευθείας του διαγράμματος υπολογίζεται η συγκέντρωση IC_{50} , όπου ορίζεται ως η τιμή της συγκέντρωσης της ουσίας που μπορεί να δεσμεύσει το 50% των ελεύθερων ριζών DPPH. Συγκεκριμένα, η τιμή IC_{50} υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$IC_{50} = \frac{50-b}{a} \quad (\mu\text{L εκχυλίσματος/ mL δείγματος})$$

Όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση της ευθείας

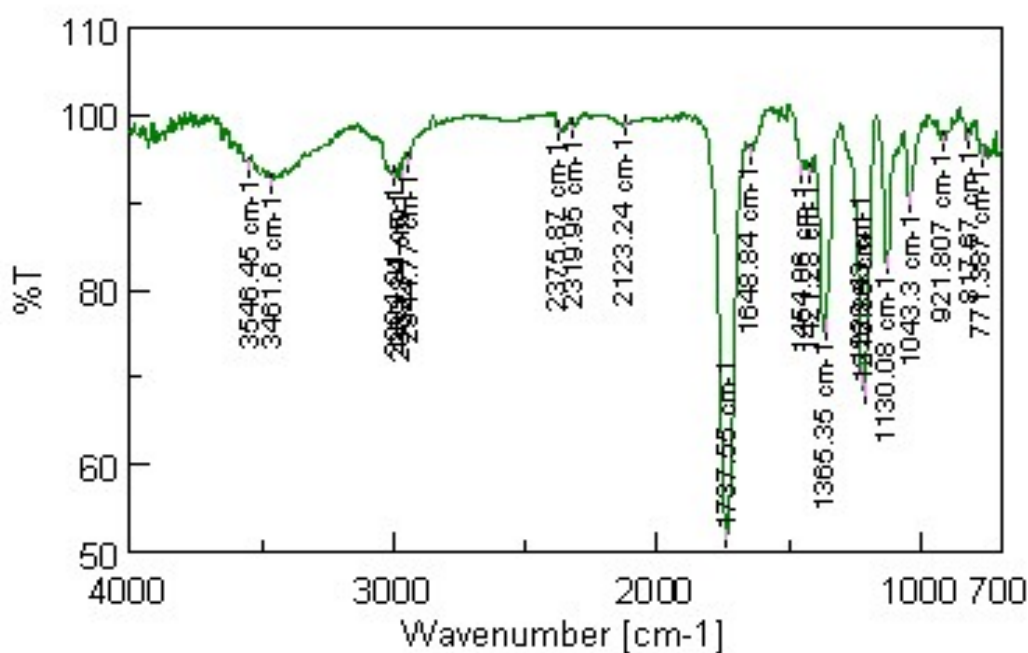
Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηρισμός Διαλυτών

Παρακάτω αναλύονται τα φάσματα FTIR και ¹H NMR για το DES D, γλυκόζη- D,L γαλακτικό οξύ-νερό 1:5:6,2, καθώς όπως προκύπτει και από τα πειραματικά αποτελέσματα παρακάτω, ο διαλύτης αυτός επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος για την ανάπτυξη του πειραματικού σχεδιασμού. Τα αντίστοιχα φάσματα λήφθηκαν για τα DESs βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3 και βεταΐνη- D,L γαλακτικό οξύ- νερό 1:2:2,5, τα οποία παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

3.1.1 Δομικός χαρακτηρισμός

- Φάσμα FTIR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2

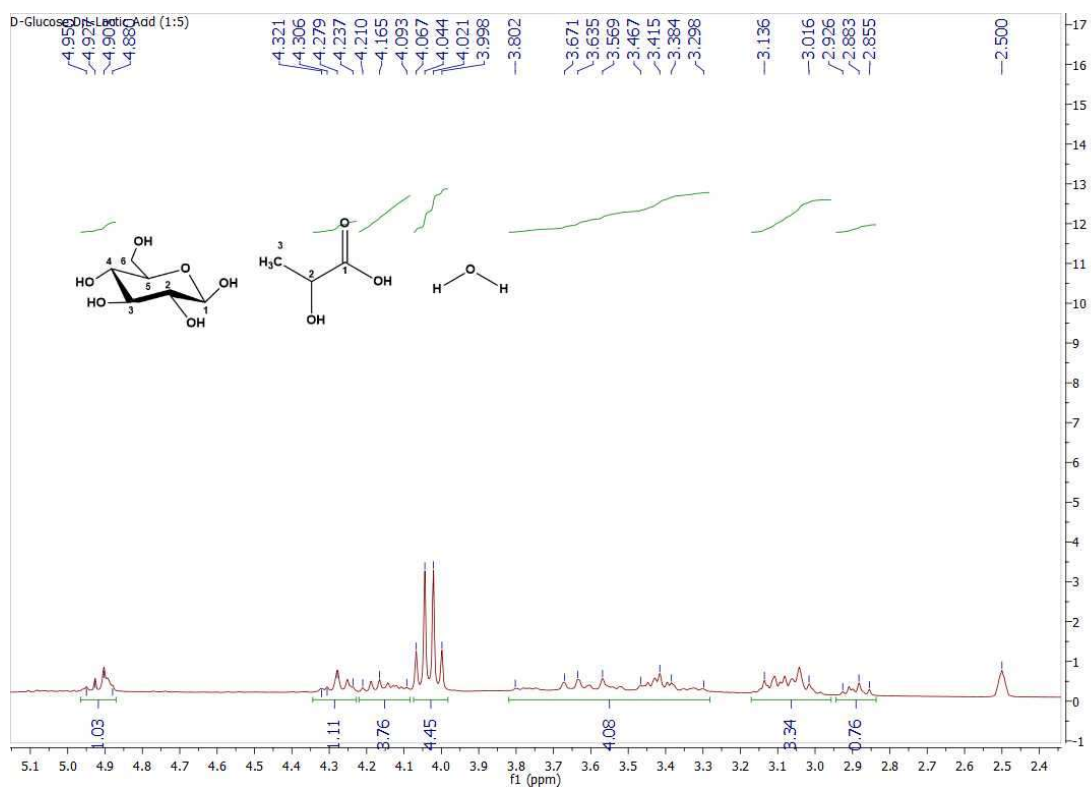


Εικόνα 13: Φάσμα FTIR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2.

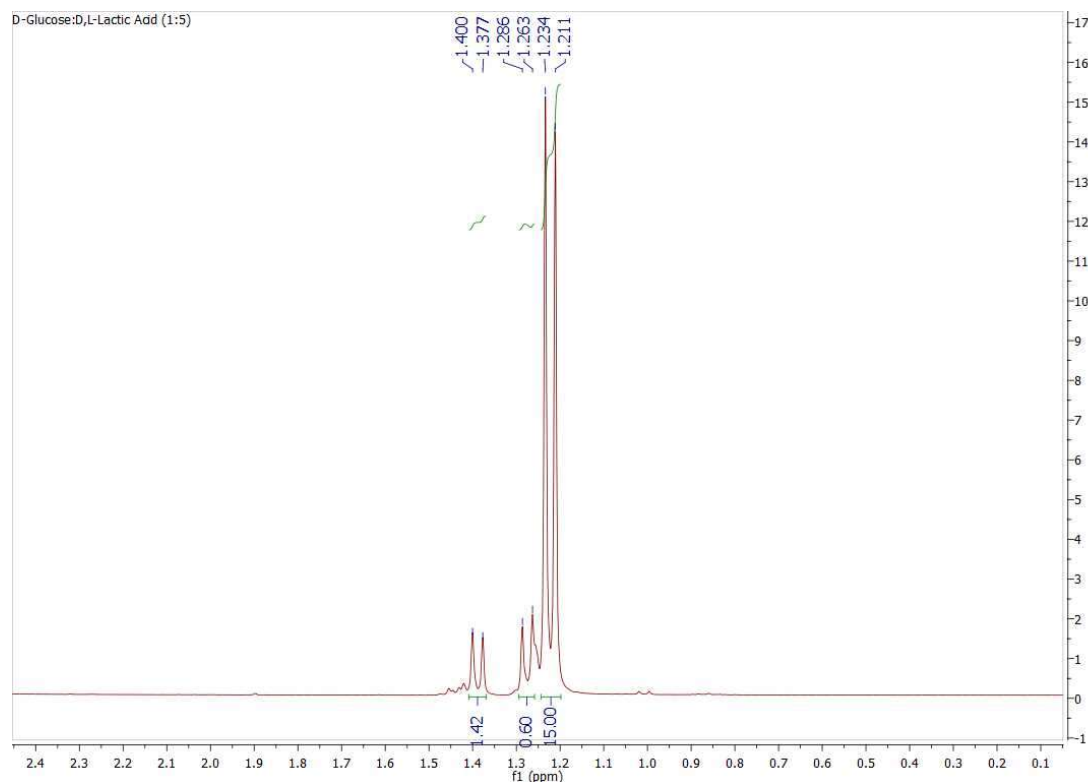
Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος και τα είδη των δονήσεων στα οποία αυτές αποδίδονται:

- **3461 cm⁻¹**→ Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της χαρακτηριστικής ομάδας -OH του γαλακτικού οξέος, της γλυκόζης και του νερού.
- **2994 cm⁻¹**→ Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των αλειφατικών δεσμών C-H του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης.
- **1737 cm⁻¹**→ Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του καρβονυλίου C=O της καρβοξυλομάδας του γαλακτικού οξέος.

- **1365 cm^{-1}** → Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης.
- **1218 cm^{-1}** → Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης.
- **1130 cm^{-1}** → Η κορυφή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O του γαλακτικού οξέος και της γλυκόζης.
- **Φάσμα ^1H NMR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2**



Εικόνα 14: Φάσμα ^1H NMR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2 (300 MHz, DMSO, d_6).



Εικόνα 15: Φάσμα ^1H NMR του DES Glu: LA: W 1:5:6,2 (300 MHz, DMSO, d_6).

Στα υψηλά πεδία του φάσματος εμφανίζονται τα πρωτόνια της ένωσης, που είναι πιο αποπροστατευμένα, λόγω αλληλεπιδράσεων με γειτονικά πρωτόνια και τμήματα του μορίου, ενώ στα χαμηλά πεδία του φάσματος τα πρωτόνια που εμφανίζονται είναι τα πιο προστατευμένα.

Συγκεκριμένα, στα 4,950-4,880 ppm παρατηρείται μια multi κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο και δεν μπορεί να αποδοθεί με σιγουριά η προέλευσή του. Multi κορυφές παρατηρούνται στα εύρη 4,321-4,237 και 4,210-4,093 ppm, όπου ομοίως, δεν είναι δυνατή η έγκυρη απόδοση της προέλευσης των πρωτονίων, και ολοκληρώνουν για 1 και 4 πρωτόνια αντίστοιχα. Στα 4,033 ppm εντοπίζεται μια τετραπλή κορυφή ($J=6,9$ Hz), η οποία ολοκληρώνεται για 5 πρωτόνια, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της ομάδας $-\text{CH}-$ των 5 μορίων του γαλακτικού οξέος. Σε 4 πρωτόνια ολοκληρώνουν οι multi κορυφές του εύρους 3,802-3,298 ppm, ενώ στο εύρος 3,136-3,016 ppm εντοπίζονται multi κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια. Οι επόμενες multi κορυφές βρίσκονται στα εύρη 2,926-2,855 και 1,400-1,263 ppm και ολοκληρώνουν για 1 πρωτόνιο έκαστη. Τέλος, μια διπλή κορυφή παρατηρείται στα 1,223 ppm ($J=6,9$ Hz), η οποία ολοκληρώνει για 15 πρωτόνια που αντιστοιχούν στα πιο προστατευμένα πρωτόνια της ομάδας $-\text{CH}_3$ των 5 μορίων του γαλακτικού οξέος.

3.1.2 Πολικότητα & pH

Οι τιμές λ_{max} καθώς και της ενέργειας μοριακής μετάβασης όπως μετρήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο που αναλύθηκε στην παράγραφο 2.4.2, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11: Τιμές λ_{\max} και E_{NR} των NaDESs.

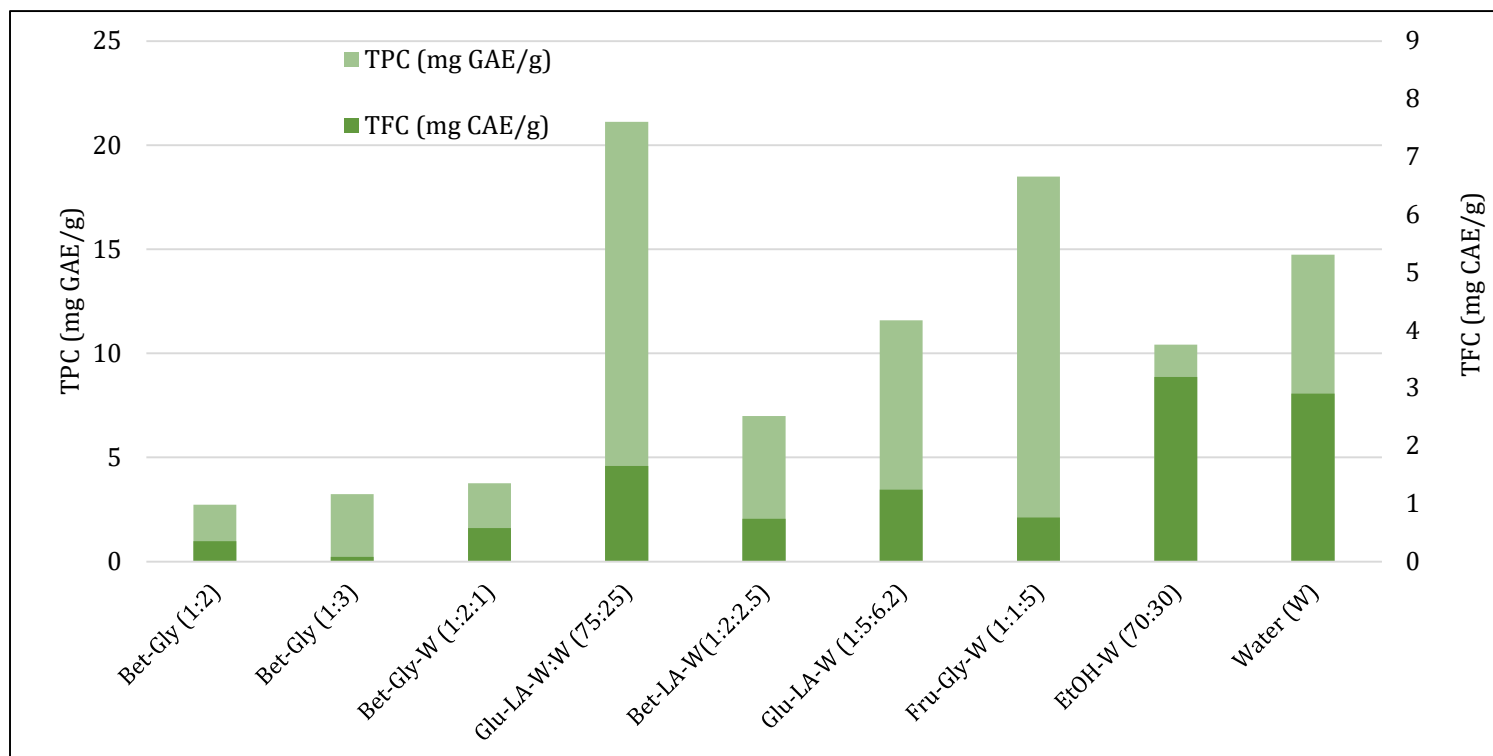
Κωδικός Πειράματος	NaDES	Μοριακή Αναλογία	λ_{\max} (nm)	E_{NR} (kcal \cdot mol ⁻¹)	pH
GB1	Bet-Gly	1:2	566	50,51	6,62
GB2	Glu-LA-W	1:5:6,2	598	47,81	1,28
GB4	Bet-LA-W	1:2:2,5	572	49,98	3,28
GB5	Bet-Gly	1:3	570	50,16	7,82
GB12	Bet-Gly-W	1:2:1	573	44,67	7,73
GB28	Fru-Gly-W	1:1:5	592	48,30	6,66

3.2 Ολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή

Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν τόσο από την πρώτη σειρά πειραμάτων, όσο και από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού, αξιολογούνται για το ολικό περιεχόμενό τους σε φαινολικά και φλαβονοειδή καθώς και για την αντιοξειδωτική τους δράση, ακολουθώντας τις μεθόδους που έχουν περιγραφεί στο πειραματικό μέρος. Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακα για τα πειράματα της πρώτης σειράς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες, δηλαδή σε θερμοκρασία 40°C, με αναλογία χαμομηλιού/NaDES ίση με 25 mg/g και διάρκεια εκχύλισης 1 ώρα.

Πίνακας 12: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.

Κωδικός Πειράματος	Διαλύτης	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CAE/g)
GB7	Bet-Gly (1:2)	2,72	0,35
GB9	Bet-LA-W (1:2:2,5)	6,99	0,74
GB10	Bet-Gly (1:3)	3,45	0,08
GB13	Bet-Gly-W (1:2:1)	3,76	0,58
GB16	Glu-LA-W:W (75:25)	21,15	1,65
GB21	Glu-LA-W (1:5:6,2)	11,59	1,24
GB29	Fru-Gly-W (1:1:5)	18,49	0,76
GB33	EtOH-W (70:20)	10,41	3,19
GB39	W	14,74	2,90



Διάγραμμα 1: Γραφική αναπαράσταση τιμών του ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών (TFC) των εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.

Από τον πίνακα και από το διάγραμμα παρατηρείται πως το εκχύλισμα με διαλύτη D-γλυκόζη-D, L γαλακτικό οξύ- νερό (1:5:6,2) αναμειγμένο με νερό σε κατά βάρος αναλογία 75:25, περιέχει το μεγαλύτερο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή, σε σύγκριση με τους άλλους NaDESs, ενώ επίσης το εκχύλισμα αυτό περιέχει μεγαλύτερο ολικό περιεχόμενο φαινολικών σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα των συμβατικών διαλυτών. Ακόμα, το σύστημα αυτό, πέρα από το γεγονός ότι παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα, είναι ευκολότερα διαχειρίσιμο σε σύγκριση με τα άλλα NaDESs, καθώς λόγω της παρουσίας νερού μειώνεται το ιξώδες και η πυκνότητά του.

3.3 Αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων της πρώτης σειράς πειραμάτων, κατασκευάστηκαν τα γραφήματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης του εκάστοτε διαλύματος, για τρεις χρόνους επώασης (15, 30 και 60 λεπτά) αντίστοιχα. Το ποσοστό αναστολής ρίζας προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$(\%) \text{ Αναστολή ρίζας} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

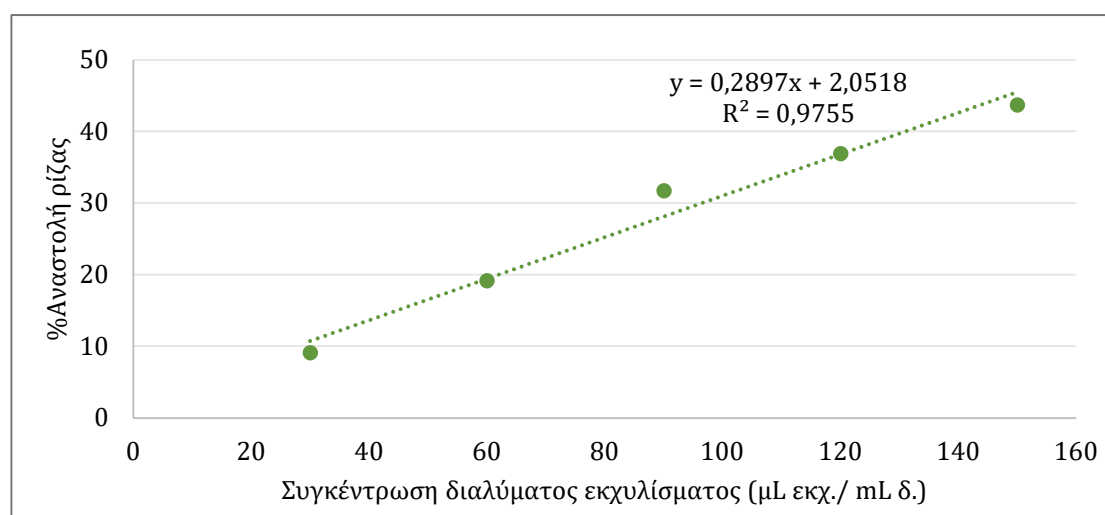
Όπου ως A_{blank} ορίζεται η απορρόφηση του τυφλού δείγματος και ως A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν το εκχύλισμα

Σε κάθε διάγραμμα συμπεριλαμβάνεται η γραμμή προσαρμογής, με την αντίστοιχη εξίσωση και τον συντελεστή προσδιορισμού R². Επισημαίνεται ότι όσο πλησιέστερα στην μονάδα είναι η τιμή του R², τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή της ευθείας στα πειραματικά δεδομένα. Επιπλέον, για κάθε μέτρηση αναγράφεται η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος εκχυλίσματος (stock) και βάσει της εξίσωσης προσαρμογής υπολογίζεται η τιμή IC₅₀ όπως προβλέπεται από τον τύπο:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Όπου b η αποτέμνουσα και a η κλίση της ευθείας.

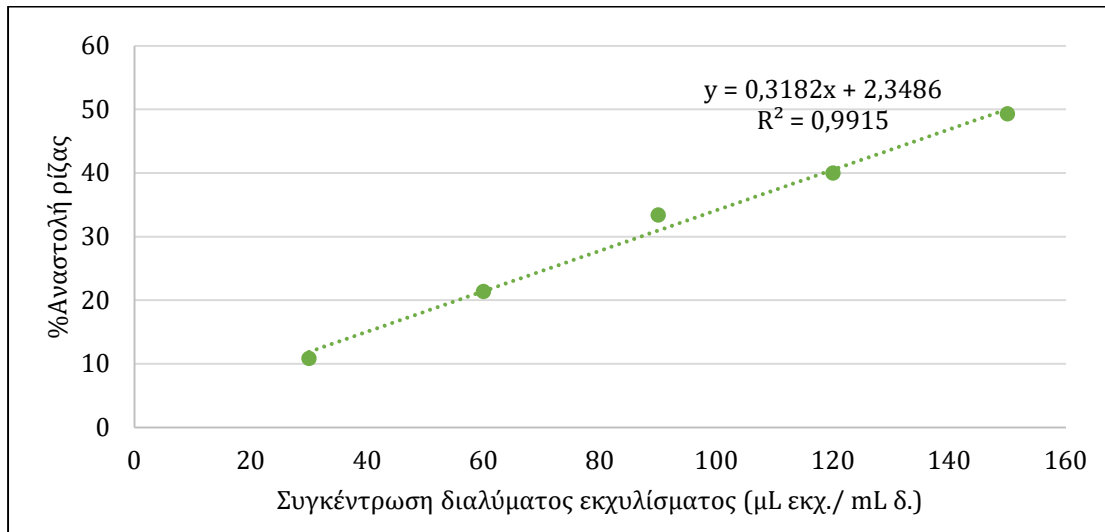
- **Εκχύλισμα GB7** (Bet-Gly, 1:2), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 2: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 165,51 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

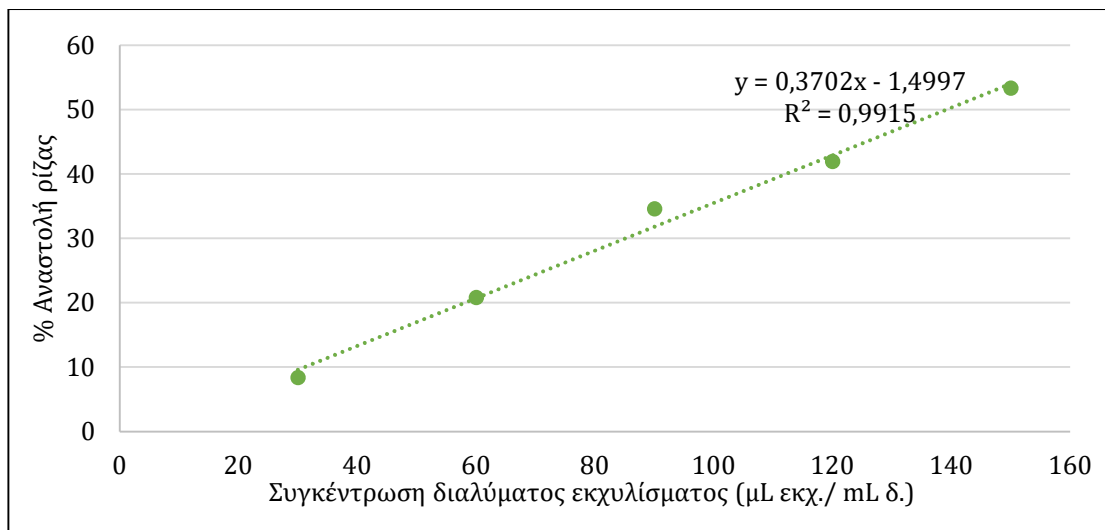
- **Εκχύλισμα GB7** (Bet-Gly, 1:2), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 3: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 150,89 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

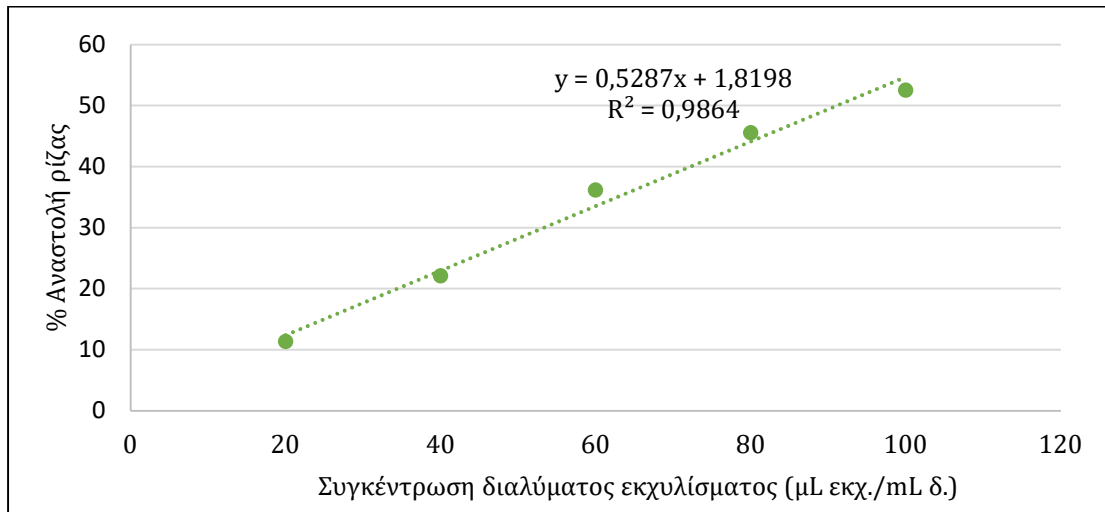
- **Εκχύλισμα GB7** (Bet-Gly, 1:2), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 4: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB7, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 139,11 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

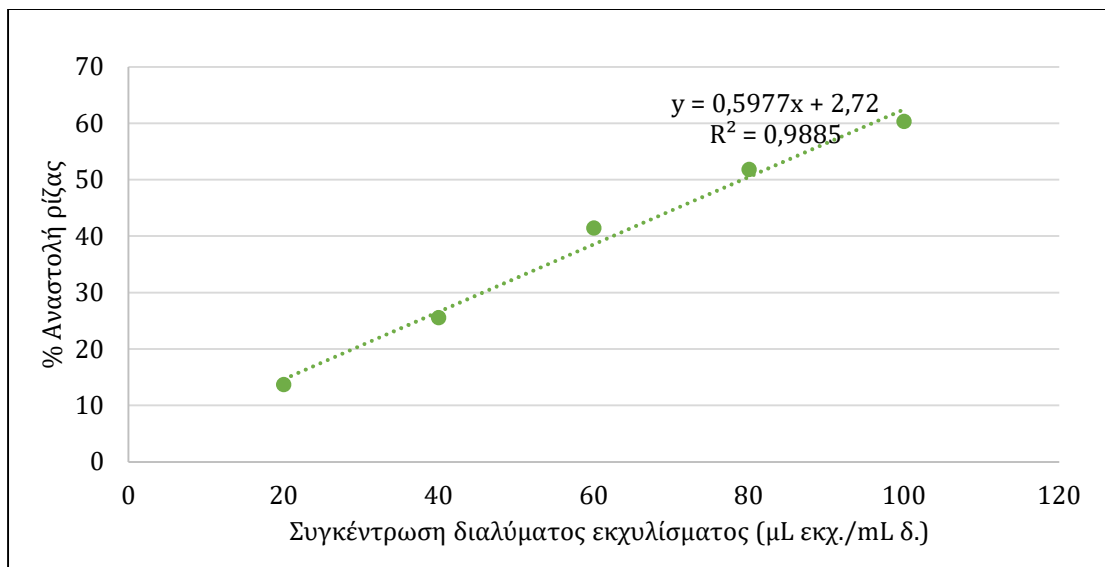
- **Εκχύλισμα GB9** (Bet-LA-W, 1:2:2,5), με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 5: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 91,13 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

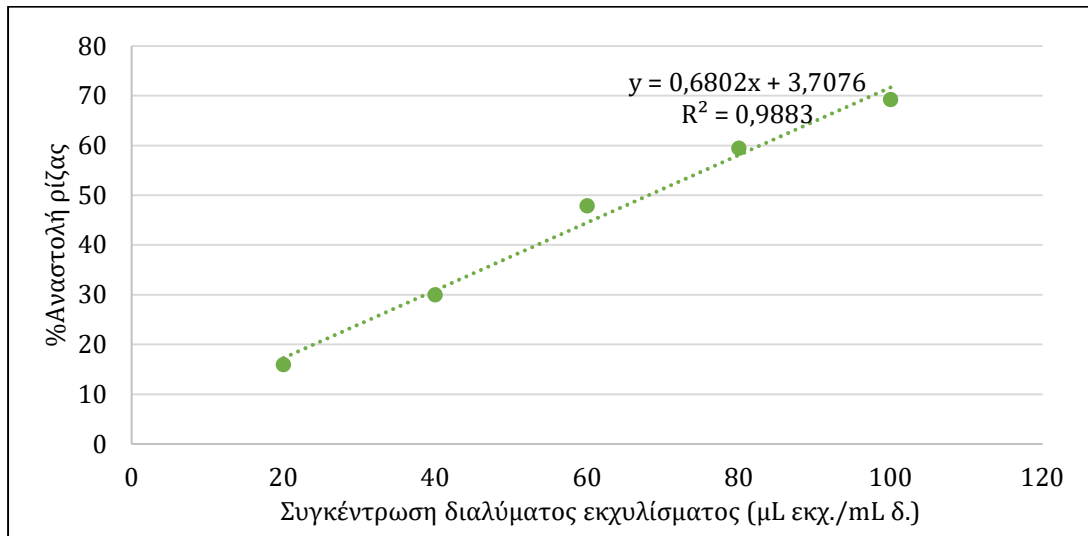
- **Εκχύλισμα GB9** (Bet-LA-W, 1:2:2,5), με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**



Διάγραμμα 6: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 79,10 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

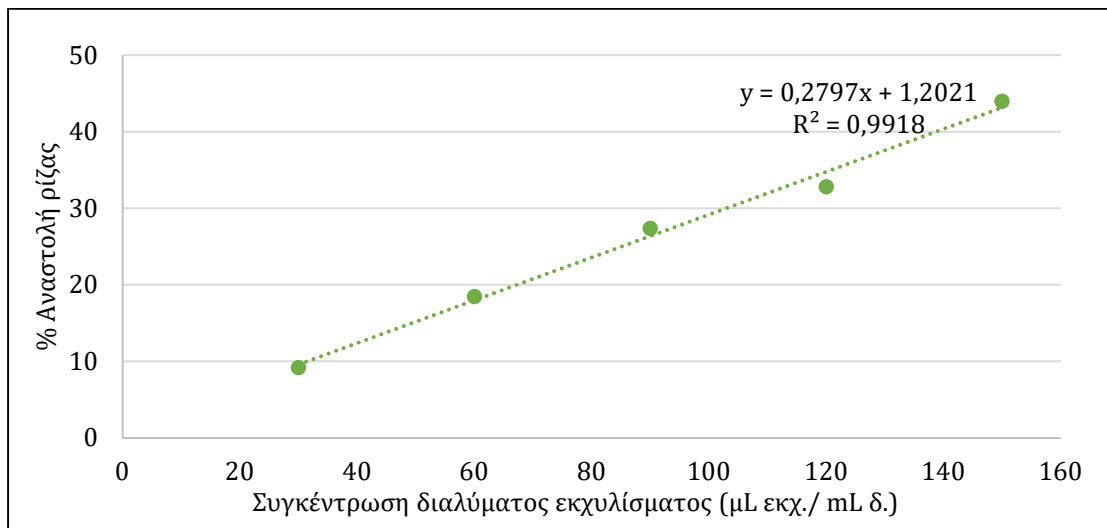
- **Εκχύλισμα GB9** (Bet-LA-W, 1:2:2,5), με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 7: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB9, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 68,06 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

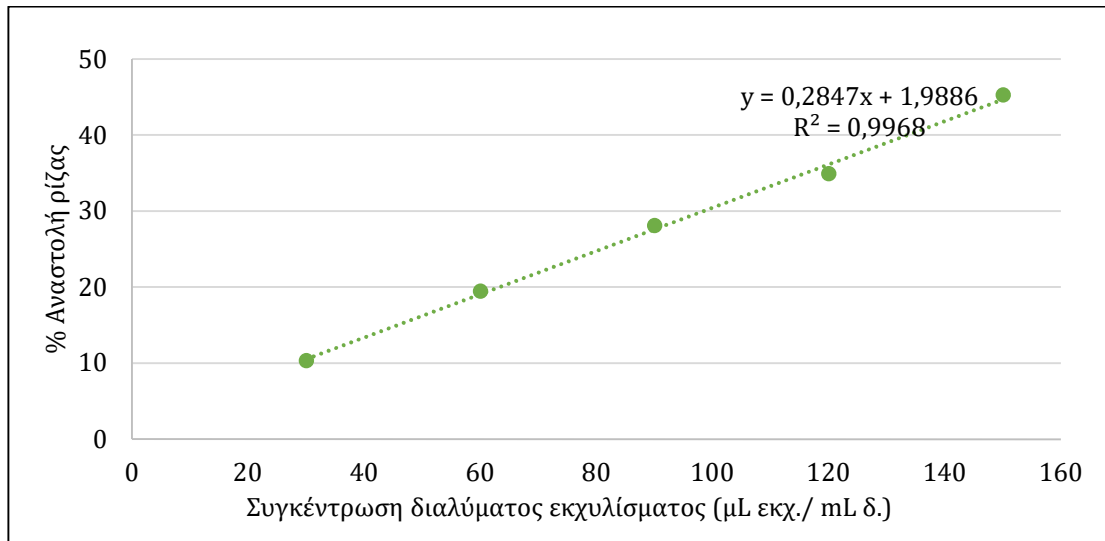
- **Εκχύλισμα GB10** (Bet-Gly, 1:3), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 8: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 174,47 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

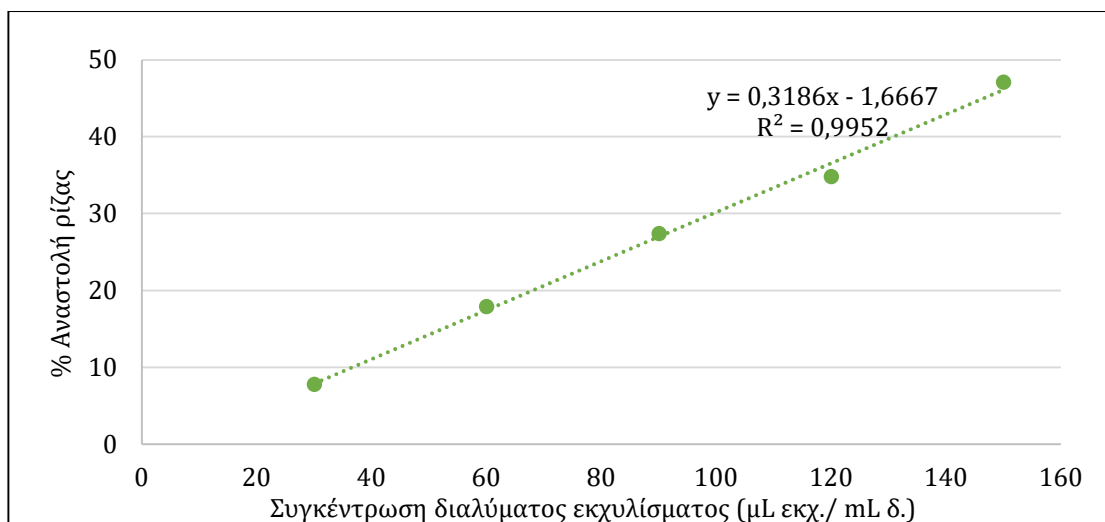
- **Εκχύλισμα GB10** (Bet-Gly, 1:3), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**



Διάγραμμα 9: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 168,64 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

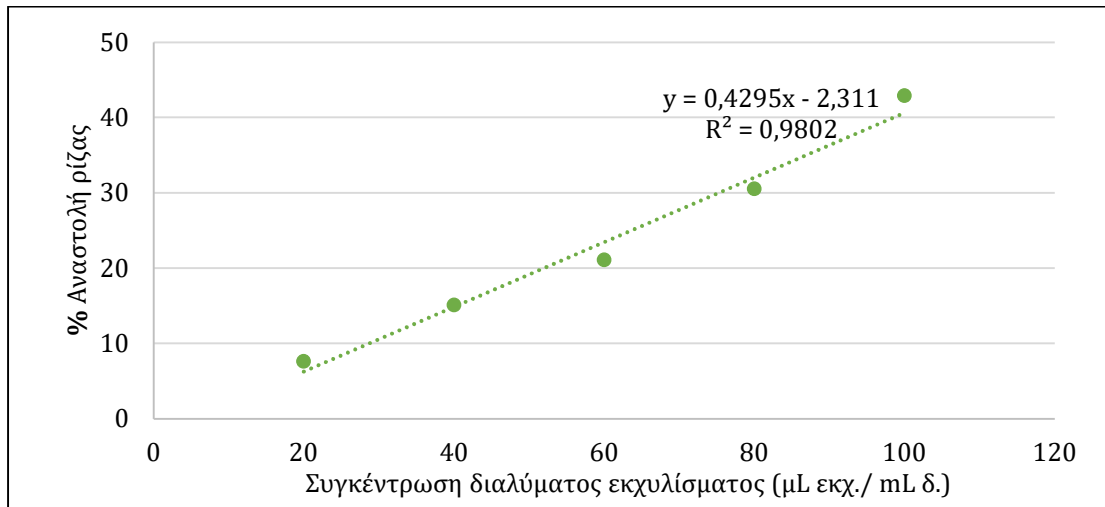
- **Εκχύλισμα GB10** (Bet-Gly, 1:3), με αρχική συγκέντρωση 0,3 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**



Διάγραμμα 10: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB10, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,3 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 162,17 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

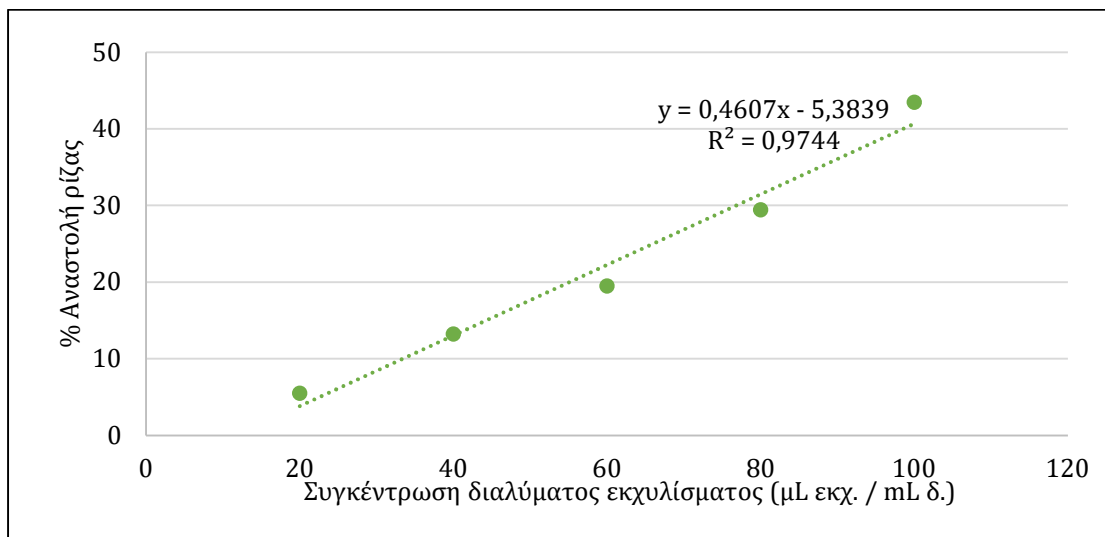
- **Εκχύλισμα GB13** (Bet-Gly-W, 1:2:1) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 11: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 121,80 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

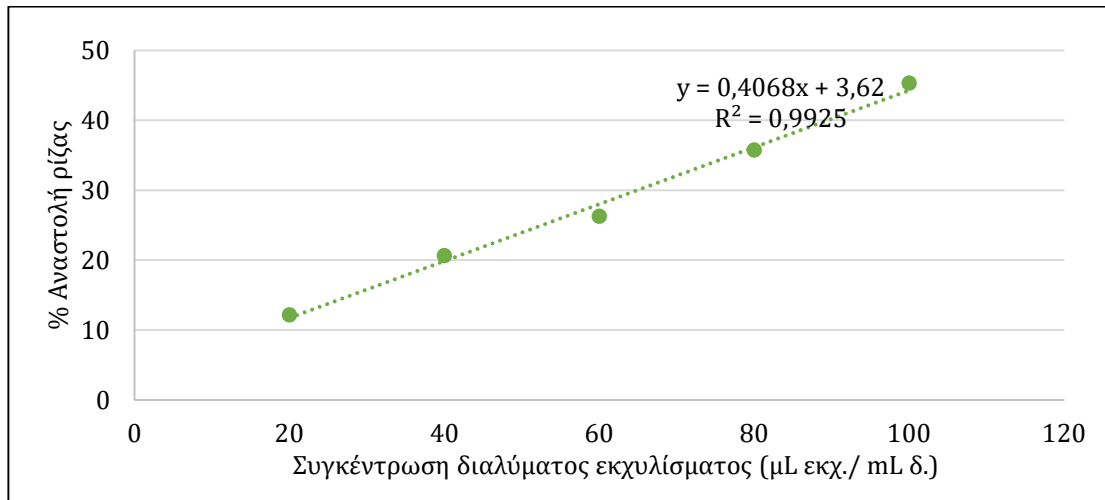
- **Εκχύλισμα GB13** (Bet-Gly-W, 1:2:1) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 12: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 120,22 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

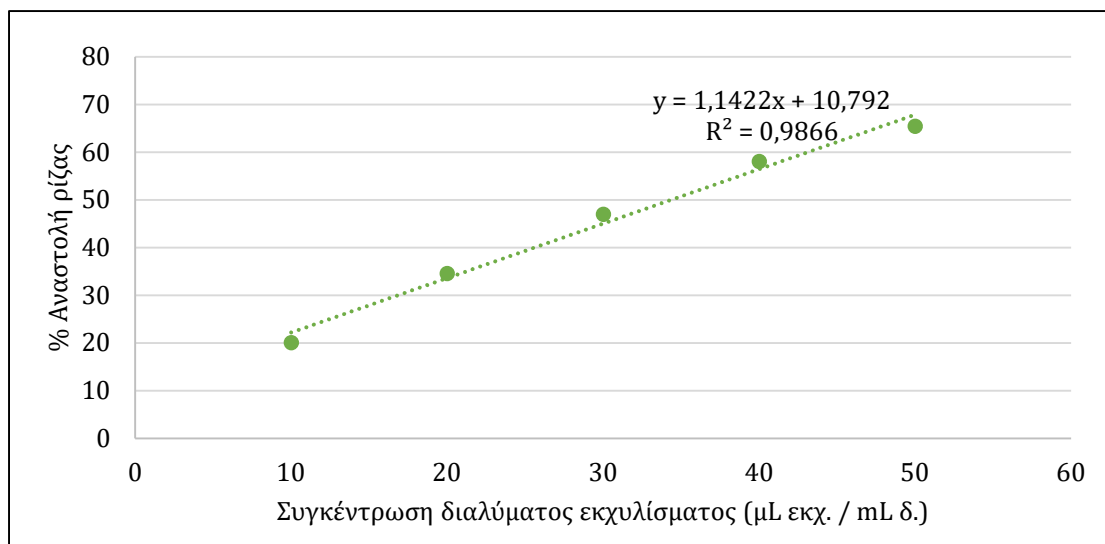
- **Εκχύλισμα GB13** (Bet-Gly-W, 1:2:1) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 13: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB13, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 114,22 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

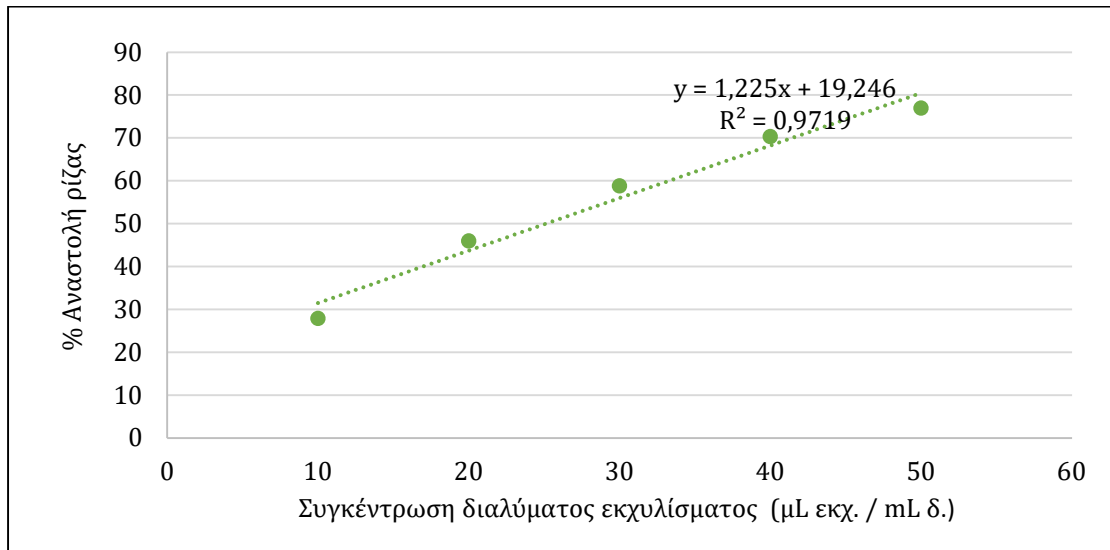
- **Εκχύλισμα GB16** (Glu-La-W: W, 75:25) με αρχική συγκέντρωση 0,1 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 14: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 34,33 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

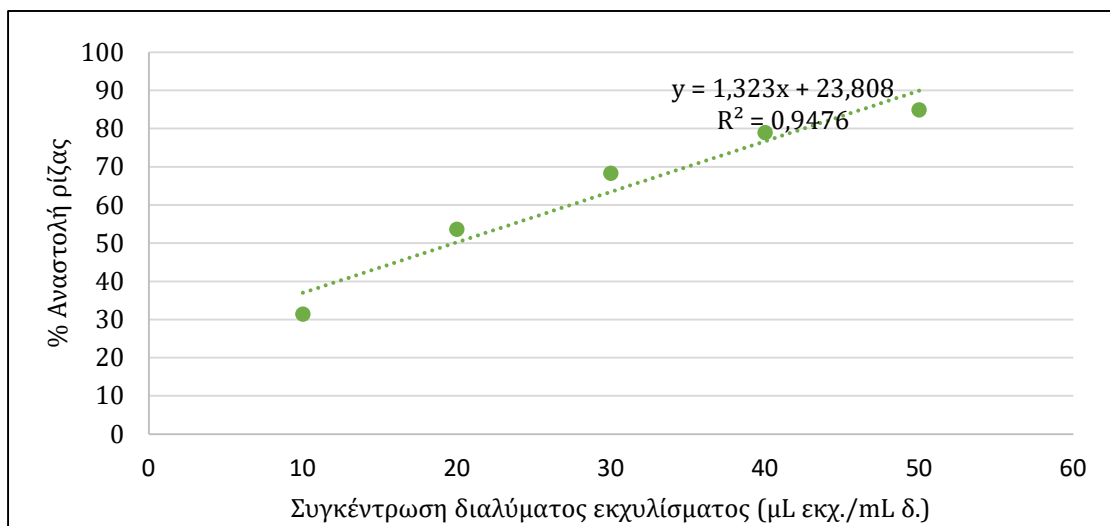
- **Εκχύλισμα GB16** (Glu-LA-W: W, 75:25) με αρχική συγκέντρωση 0,1 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 15: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 25,11 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

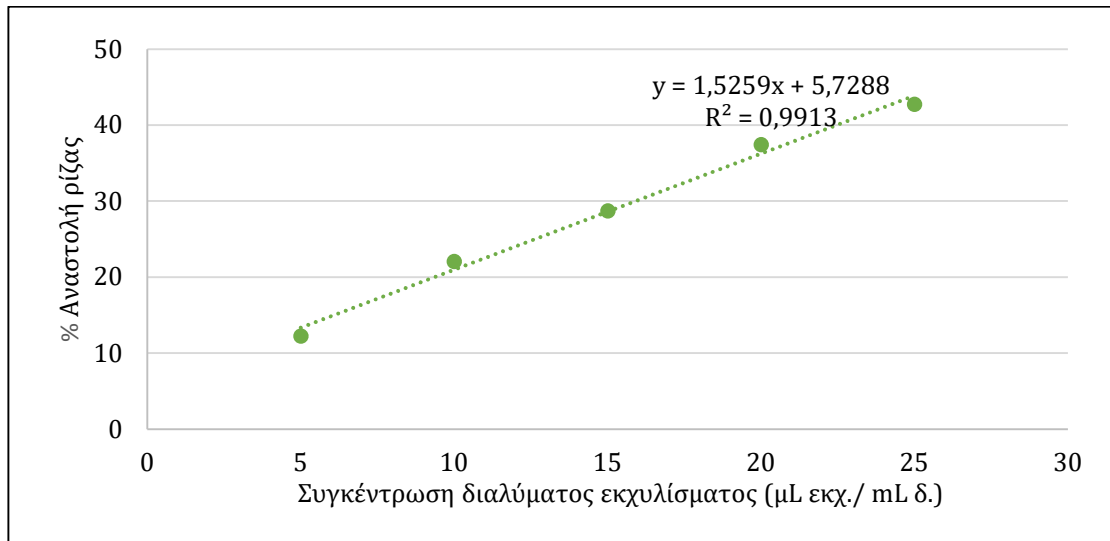
- **Εκχύλισμα GB16** (Glu-LA-W: W, 75:25) με αρχική συγκέντρωση 0,1 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 16: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB16, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,1 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 19,80 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

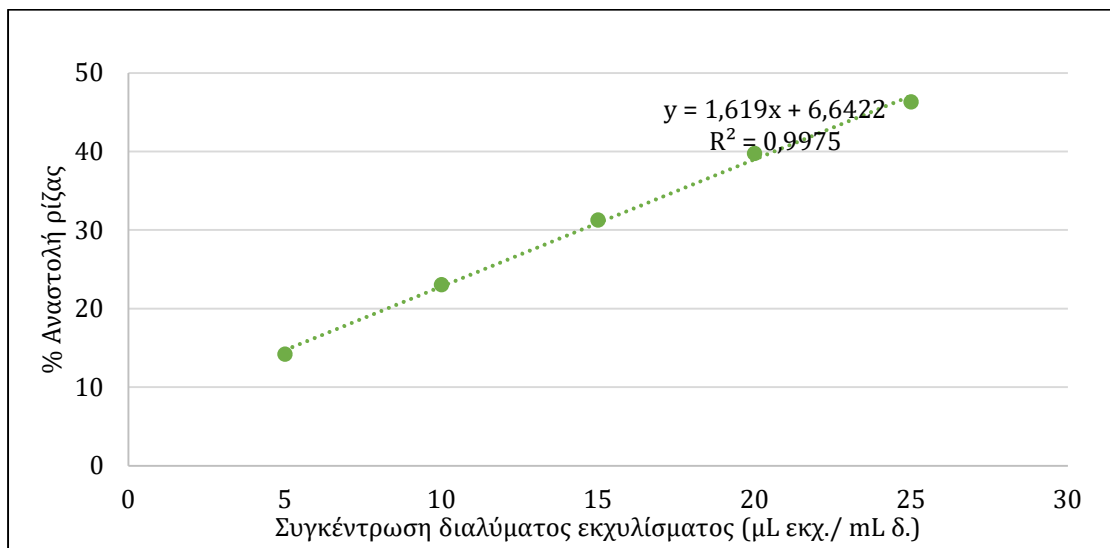
- **Εκχύλισμα GB21** (Glu-LA-W, 1:5:6.2) με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**



Διάγραμμα 17: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 29,01 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

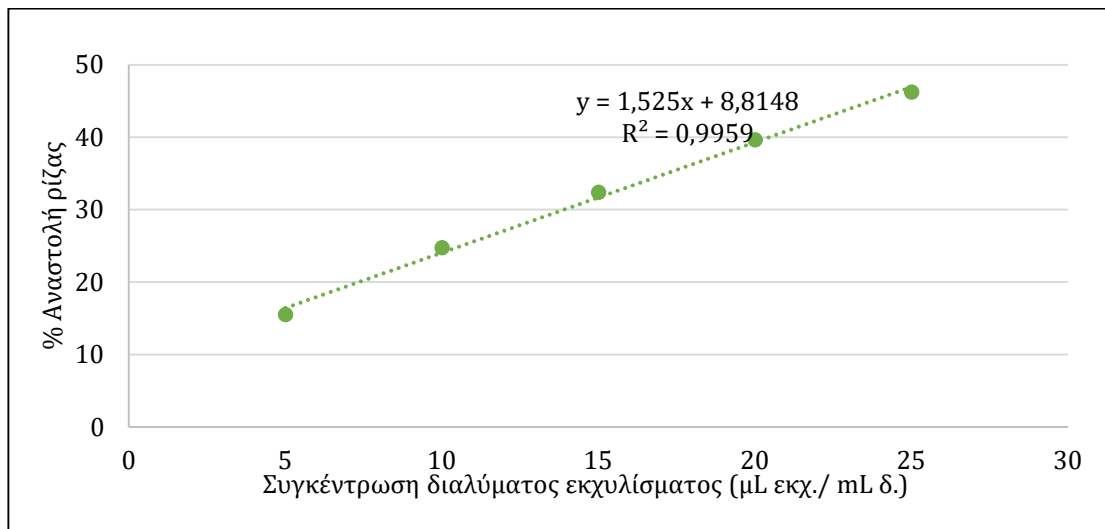
- **Εκχύλισμα GB21** (Glu-LA-W, 1:5:6.2) με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 18: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 26,78 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

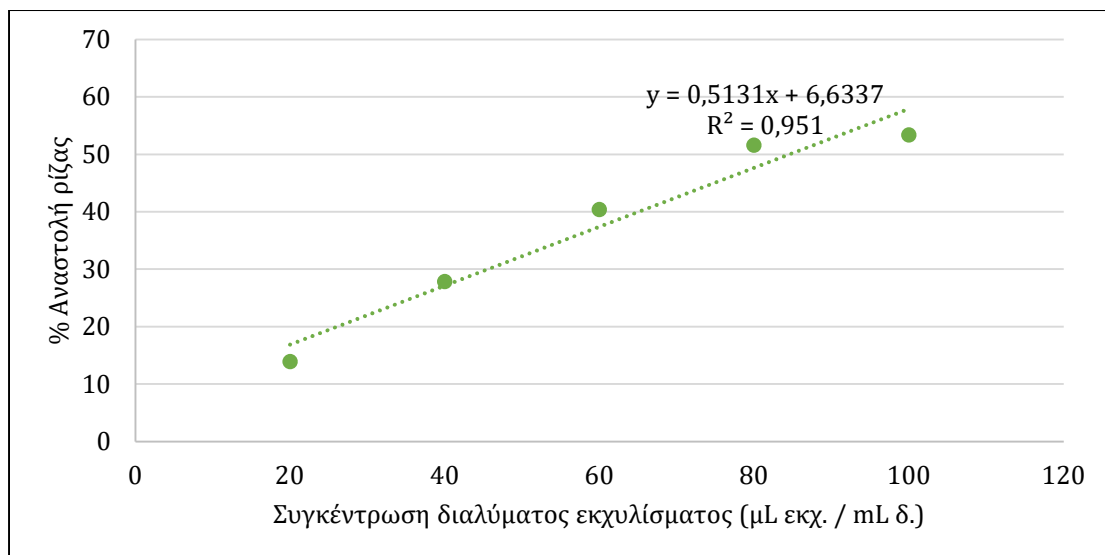
- **Εκχύλισμα GB21** (Glu-LA-W, 1:5:6.2) με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 19: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB21, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 27,01 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

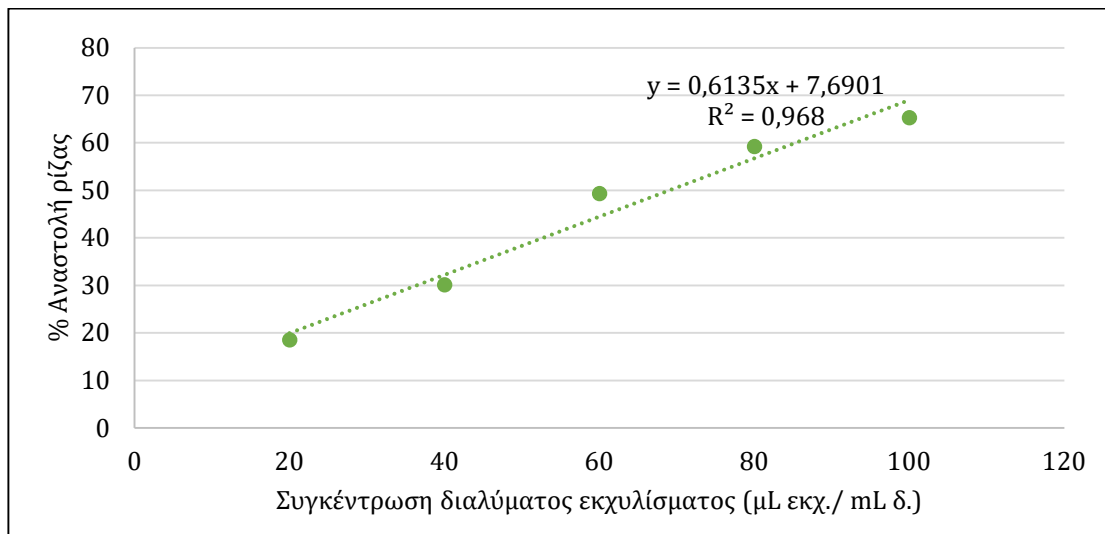
- **Εκχύλισμα GB29** (Fru-Gly-W, 1:1:5) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 20: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 54,52 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

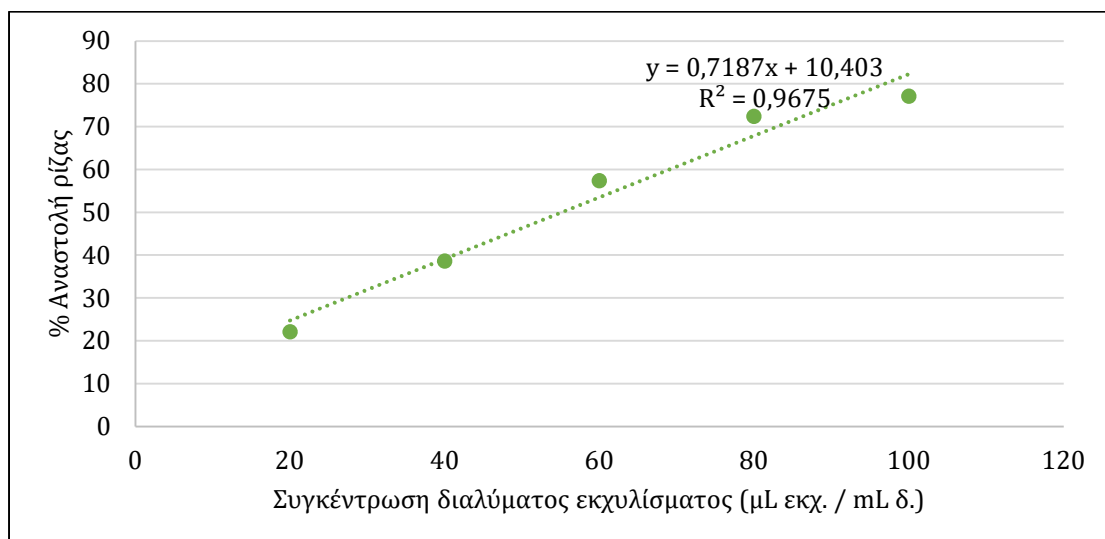
- Εκχύλισμα **GB29** (Fru-Gly-W, 1:1:5) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 21: γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 68,96 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

- Εκχύλισμα **GB29** (Fru-Gly-W, 1:1:5) με αρχική συγκέντρωση 0,2 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 22: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB29, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,2 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 55,10 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

Από τα παραπάνω διαγράμματα επιβεβαιώνεται ότι η σχέση μεταξύ του ποσοστού αναστολής της ρίζας και της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος είναι γραμμική. Επίσης, παρατηρείται με την πάροδο του χρόνου αύξηση του ποσοστού αναστολής, καθώς για δεδομένο όγκο δείγματος, τα αντιοξειδωτικά καταφέρνουν να αναστέλλουν περισσότερες ρίζες σε 1 ώρα μέτρησης από ότι σε 15 λεπτά. Στον παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται τα αποτελέσματα του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά και φλαβονοειδή, καθώς και οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν στα 15, 30 και 60 λεπτά. Παρατηρείται πως το εκχύλισμα με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση είναι το GB16 που αποτελεί σύστημα διαλύτη D-γλυκόζη: D, L-γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6.2) αναμειγμένο με νερό σε κατά βάρος αναλογία 75:25. Ακόμα, το εκχύλισμα αυτό εμφανίζει το μεγαλύτερο ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά και φλαβονοειδή. Συνεπώς, λόγω των ικανοποιητικών αποτελεσμάτων του, επιλέγεται ο συγκεκριμένος διαλύτης για την ανάπτυξη του πειραματικού σχεδιασμού.

Πίνακας 13: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) και αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων χαμομηλιού από διαφορετικούς διαλύτες.

Κωδικός πειράματος	Διαλύτης	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CAE/g)	IC ₅₀ (μL/mL)		
				15 min	30 min	60 min
GB7	Bet-Gly (1:2)	2,72	0,35	165,51	150,89	139,11
GB9	Bet-LA-W (1:2:2.5)	6,99	0,74	91,10	79,10	68,06
GB10	Bet-Gly (1:3)	3,45	0,08	174,46	168,64	162,17
GB13	Bet-Gly-W (1:2:1)	3,76	0,58	121,80	120,22	114,01
GB16	Glu-LA-W:W (75:25)	21,15	1,65	34,33	25,11	19,80
GB21	Glu-LA-W (1:5:6,2)	11,59	1,24	29,10	26,78	27,01
GB29	Fru-Gly-W (1:1:5)	18,49	0,76	84,52	68,96	55,10

3.4 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την ανάπτυξη του πειραματικού σχεδιασμού διεξήχθησαν 15 πειράματα συνολικά, εκ των οποίων τα 3 αποτελούν πειράματα μηδενικού σημείου (000). Σε κάθε πείραμα προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση. Μέσω του λογισμικού Design-Expert προσδιορίστηκε το μαθηματικό μοντέλο που συσχετίζει τις συνθήκες εκχύλισης με τα TPC και TFC, ενώ επίσης λήφθηκαν και τα 3D διαγράμματα επιφάνειας που παρουσιάζονται στις παραγράφους 3.4.3.1 και 3.4.3.2. Στον παρακάτω

πίνακα παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα για τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνονται οι συνθήκες εκχύλισης για κάθε πείραμα, ο συμβολισμός κατά Box-Behnken, οι τιμές TPC και TFC καθώς και οι τιμές IC₅₀ για χρόνο επώασης ίσο με 15, 30 και 60 λεπτά.

Πίνακας 14: Αξιολόγηση ολικού περιεχομένου σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) των εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού καθώς και συνθήκες εκχύλισης.

Κωδικός Πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (x ₁)	Λόγος mg Χαμομηλιού /g διαλύτη (x ₂)	% w/w Νερού ως συνδιαλύτης (x ₃)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CAE/g)
GB37	--0	2	20	25	35,09	5,24
GB36	-0+	2	50	50	27,00	6,80
GB38	-0-	2	50	0	21,67	5,00
GB42	--0	2	80	25	23,35	6,77
GB47	000	4	50	25	27,12	7,78
GB49	000	4	50	25	25,75	7,67
GB52	000	4	50	25	24,94	7,47
GB41	0+-	4	80	0	21,76	6,25
GB40	0--	4	20	0	27,22	5,21
GB44	0++	4	80	50	20,50	7,07
GB43	0-+	4	20	50	37,82	7,42
GB51	+0-	6	50	0	26,19	6,07
GB45	+0	6	20	25	37,55	10,36
GB50	++0	6	80	25	23,30	5,51
GB46	+0+	6	50	50	20,71	7,35

3.4.1 Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC)

Έπειτα από την εισαγωγή των πειραματικών αποτελεσμάτων στο λογισμικό, συνίσταται το "Reduced Quadratic Model", δηλαδή το απλοποιημένο τετραγωνικό, ως το καταλληλότερο μοντέλο για την μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου των φαινολικών. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει του όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B² και C², όπου ως A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή ως A έχει οριστεί η

διάρκεια εκχύλισης σε ώρες, ως B έχει οριστεί το κατά βάρος ποσοστό του νερού στον διαλύτη και ως C έχει οριστεί ο λόγος mg χαμομηλιού/ g διαλύτη. Από το μαθηματικό μοντέλο αφαιρέθηκαν οι όροι που δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί, καθώς η τιμή του p-value ήταν αρκετά υψηλή. Συνεπώς, το μοντέλο που προέκυψε είναι το ακόλουθο:

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

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	445,02	7	63,57	27,82	0,0001	significant
A-TIME	0,3200	1	0,3200	0,1400	0,7193	
B-% WATER	12,25	1	12,25	5,36	0,0538	
C-Cham/Des	293,79	1	293,79	128,56	< 0.0001	
AB	31,30	1	31,30	13,70	0,0076	
BC	33,70	1	33,70	14,75	0,0064	
B ²	25,53	1	25,53	11,17	0,0124	
C ²	43,01	1	43,01	18,82	0,0034	
Residual	16,00	7	2,29			
Lack of Fit	13,84	5	2,77	2,57	0,3034	not significant
Pure Error	2,15	2	1,08			
Cor Total	461,02	14				

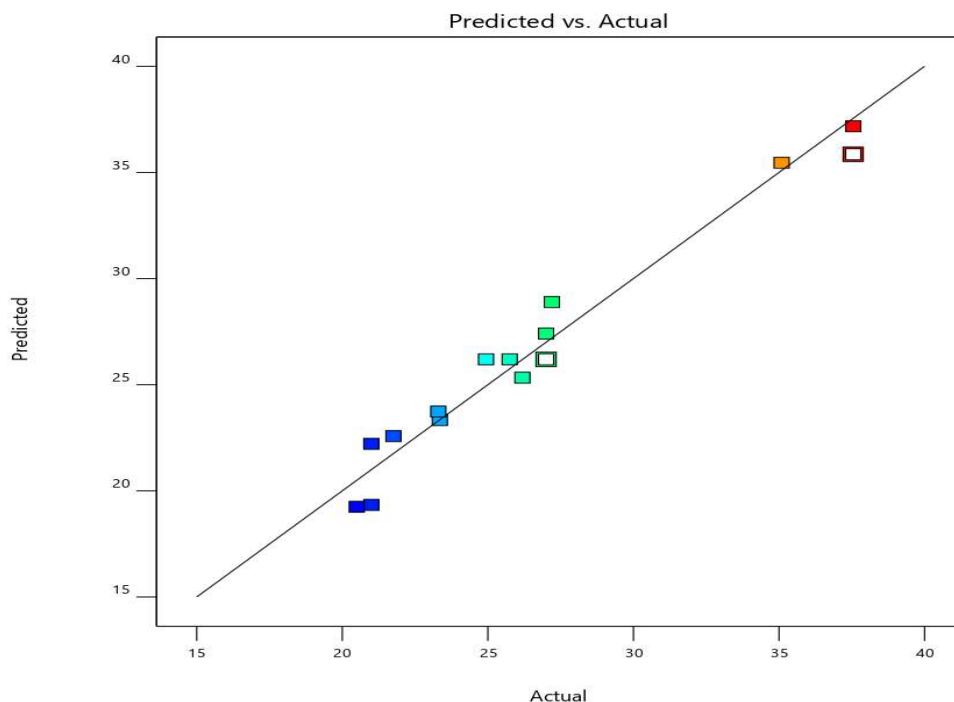
Η τιμή F-value του μοντέλου έχει τιμή ίση με 27,82, και επομένως το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, ενώ η πιθανότητα αυτή η τιμή να έχει προκύψει λόγω θορύβου είναι 0,01%. Στο μοντέλο οι όροι C, AB, BC, B², C² είναι στατιστικά σημαντικοί, καθώς η τιμή p-value είναι μικρότερη του 0,05. Οι όροι A και B δεν είναι στατιστικά σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας ανώτερο του 95%, ωστόσο για λόγους διατήρησης της ιεραρχίας του μοντέλου δεν απορρίφθηκαν. Επιπλέον, η τιμή F-value του Lack of fit μοντέλου είναι ίση με 2,57 υποδηλώνοντας ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό, και συνεπώς η προσαρμογή του μοντέλου είναι σωστή και δεν απαιτείται προσθήκη άλλων όρων στο μοντέλο.

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζεται η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Η τιμή του είναι πολύ κοντά στην μονάδα, υποδεικνύοντας την καλή συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Επίσης, η διαφορά μεταξύ των Adjusted R^2 και Predicted R^2 είναι μικρότερη του 0,2 οπότε η προσαρμογή του μοντέλου κρίνεται ικανοποιητική. Τέλος, η τιμή του όρου «Adequate Precision», που ορίζεται ως ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο είναι μεγαλύτερος του 4, που είναι και το επιθυμητό.

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

Std. Dev.	1,51	R^2	0,9653
Mean	26,61	Adjusted R^2	0,9306
C.V. %	5,68	Predicted R^2	0,7309
		Adeq Precision	16,2368

Στο διάγραμμα 23 απεικονίζεται γραφικά η συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών του μοντέλου και των τιμών που προέκυψαν πειραματικά. Παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση, καθώς τα πειραματικά σημεία είναι αρκετά κοντά στην ευθεία, υποδεικνύοντας πως οι τιμές πρόβλεψης είναι πολύ κοντά με τις πειραματικές τιμές.



Διάγραμμα 23: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών (TPC) (εκφρασμένη ως προς τους όρους A, B,C) είναι η εξής:

$$\text{TPC} = 26,20 + 0,20 \cdot A + 1,24 \cdot B - 6,06 \cdot C - 2,80 \cdot AB - 2,90 \cdot BC - 2,62 \cdot B^2 + 3,40 \cdot C^2$$

Η κωδικοποιημένη εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις των απόκρισεων για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Εξ ορισμού, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων, συγκρίνοντας τους συντελεστές παραγόντων.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών (TPC) είναι η εξής:

$$\begin{aligned} \text{TPC} = & 31,05645 + 1,49875 \cdot \text{TIME} + 0,676554 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W} \% \right) - 0,483370 \\ & \cdot \text{mg Chamomile / g NaDES} - 0,055950 \cdot \text{TIME} \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W} \% \right) \\ & - 0,003870 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W} \% \right) \cdot \text{mg Chamomile / g NaDES} \\ & - 0,004195 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W} \% \right)^2 + 0,003781 \\ & \cdot \text{mg Chamomile / g NaDES}^2 \end{aligned}$$

Η εξίσωση με τους πραγματικούς παράγοντες, εξυπηρετεί στην πραγματοποίηση προβλέψεων για την απόκριση, σε δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Στην προκειμένη περίπτωση, τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν παράγοντα. Αυτή η εξίσωση σε αντίθεση με την κωδικοποιημένη, δεν πρέπει να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται, ώστε να προσαρμόζονται στις μονάδες κάθε παράγοντα.

3.4.2 Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC)

Για την μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών επιλέγεται το “Reduced Cubic Model”, δηλαδή το απλοποιημένο κυβικό. Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το μοντέλο περιέχει του όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C², A²B, A²C, AB², όπου ως A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές, δηλαδή ως A έχει οριστεί η διάρκεια εκχύλισης σε ώρες, ως B έχει οριστεί το κατά βάρος ποσοστό του νερού στον διαλύτη και ως C έχει οριστεί ο λόγος mg χαμηλιού/ g διαλύτη. Από το μαθηματικό μοντέλο αφαιρέθηκαν οι όροι που δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί, καθώς η τιμή του p-value ήταν αρκετά υψηλή. Συνεπώς, το μοντέλο που προέκυψε είναι το ακόλουθο:

Πίνακας 17: 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	16,94	10	1,69	80,28	0,0004	significant
A-TIME	1,89	1	1,89	89,65	0,0007	
B-% WATER	4,67	1	4,67	221,18	0,0001	
C-Cham/Des	0,1190	1	0,1190	5,64	0,0764	
AB	0,0676	1	0,0676	3,20	0,1480	
AC	5,41	1	5,41	256,22	< 0.0001	
BC	0,4830	1	0,4830	22,89	0,0087	
A ²	1,34	1	1,34	63,35	0,0013	
B ²	1,84	1	1,84	87,40	0,0007	
C ²	0,6487	1	0,6487	30,75	0,0052	
A ² C	0,8712	1	0,8712	41,29	0,0030	
Residual	0,0844	4	0,0211			
Lack of Fit	0,0531	2	0,0266	1,70	0,3705	not significant
Pure Error	0,0313	2	0,0156			
Cor Total	17,02	14				

Η τιμή F-value του μοντέλου είναι ίση με 80,28 γεγονός που δηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό, ενώ υπάρχει μόνο 0,04% πιθανότητα η τιμή αυτή να οφείλεται σε θόρυβο. Στο μοντέλο, οι όροι A, B, C, BC, A², B², C², A²C είναι στατιστικά σημαντικοί και απορρίφθηκαν οι όροι A²B και AB², λόγω μη σημαντικότητας. Επιπλέον, η τιμή F-value του Lack of fit μοντέλου είναι ίση με 1,70, υποδηλώνοντας ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό και συνεπώς η προσαρμογή του μοντέλου είναι σωστή και δεν απαιτείται προσθήκη άλλων όρων στο μοντέλο.

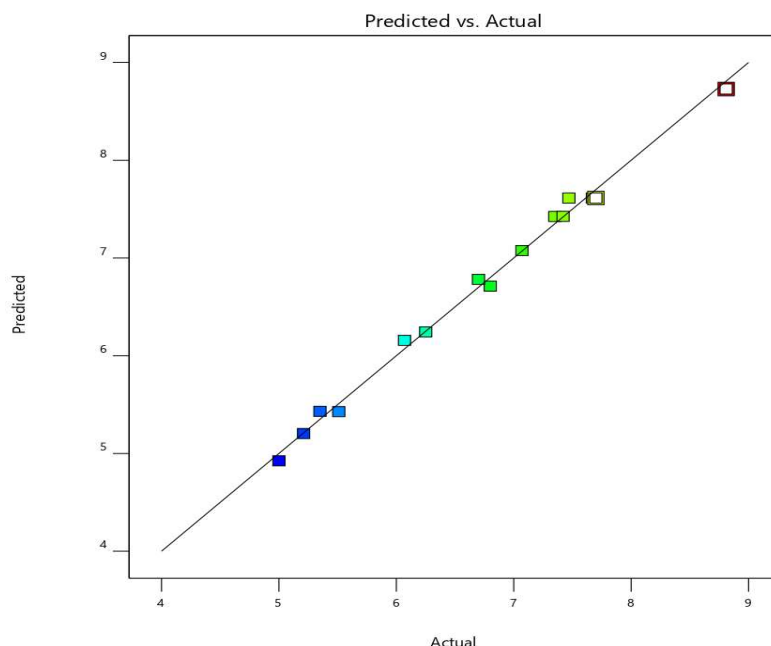
Στον Πίνακα 18 παρουσιάζεται η τιμή του R² του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή του είναι πολύ κοντά στην μονάδα, ενώ οι τιμές των Adjusted R² και Predicted R² έχουν διαφορά μικρότερη του 0,2, υποδηλώνοντας την καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Τέλος, η τιμή του όρου «Adequate Precision» που ορίζεται ως ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο είναι μεγαλύτερος του 4, που είναι και το επιθυμητό.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Std. Dev.	0,1453	R²	0,9950
Mean	6,69	Adjusted R²	0,9826
C.V. %	2,17	Predicted R²	0,8710
		Adeq Precision	30,5803

Στο διάγραμμα 24 απεικονίζεται γραφικά η συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών του μοντέλου και των τιμών που προέκυψαν πειραματικά. Παρατηρείται πολύ καλή συσχέτιση, καθώς τα πειραματικά

σημεία είναι πολύ κοντά στην ευθεία υποδεικνύοντας πως οι τιμές πρόβλεψης είναι πολύ κοντά με τις πειραματικές τιμές



Διάγραμμα 24: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών (TFC) (εκφρασμένη ως προς τους όρους A, B,C) είναι η εξής:

$$TFC = 7,61 + 0,4862 \cdot A + 0,7637 \cdot B + 0,1725 \cdot C - 0,1300 \cdot AB - 1,16 \cdot AC - 0,3475 \cdot BC - 0,6017A^2 - 0,7067 \cdot B^2 - 0,4192 \cdot C^2 - 0,6600 \cdot A^2C$$

Η εξίσωση με τους κωδικοποιημένους παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνουν προβλέψεις των απόκρισεων για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Εξ ορισμού, τα υψηλά επίπεδα των παραγόντων κωδικοποιούνται ως +1 και τα χαμηλά επίπεδα ως -1. Η κωδικοποιημένη εξίσωση εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων, συγκρίνοντας τους συντελεστές παραγόντων.

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών (TFC) είναι η εξής:

$$\begin{aligned}
\text{TFC} = & 0,997731 + 0,280208 \cdot \text{TIME} + 0,120650 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W}\%\right) + 0,053407 \\
& \cdot \frac{\text{mg Chamomile}}{\text{g NaDES}} - 0,002600 \cdot \text{TIME} \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W}\%\right) + 0,024625 \\
& \cdot \text{TIME} \cdot \frac{\text{mg Chamomile}}{\text{g NaDES}} - 0,000463 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W}\%\right) \\
& \cdot \frac{\text{mg Chamomile}}{\text{g NaDES}} + 0,124583 \cdot \text{TIME}^2 - 0,001131 \cdot \text{WATER} \left(\frac{W}{W}\%\right)^2 \\
& - 0,000466 \cdot \frac{\text{mg Chamomile}^2}{\text{g NaDES}} - 0,005500 \cdot \text{TIME}^2 \cdot \frac{\text{mg Chamomile}}{\text{g NaDES}}
\end{aligned}$$

Η εξίσωση με τους πραγματικούς παράγοντες, εξυπηρετεί στην πραγματοποίηση προβλέψεων για την απόκριση, σε δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Στην προκειμένη περίπτωση, τα επίπεδα των παραγόντων πρέπει να καθοριστούν στις αρχικές μονάδες για κάθε έναν παράγοντα. Αυτή η εξίσωση σε αντίθεση με την κωδικοποιημένη, δεν πρέπει να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της σχετικής επίδρασης κάθε συντελεστή, επειδή οι συντελεστές κλιμακώνονται, ώστε να προσαρμόζονται στις μονάδες κάθε παράγοντα.

3.4.3 Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης

Πραγματοποιούνται συνολικά τρεις βελτιστοποιήσεις που στοχεύουν:

- Στην μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων (TPC)
- Στην μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών (TFC)
- Στην ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών.

3.4.3.1 Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες που προτείνονται από το μοντέλο για την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις.

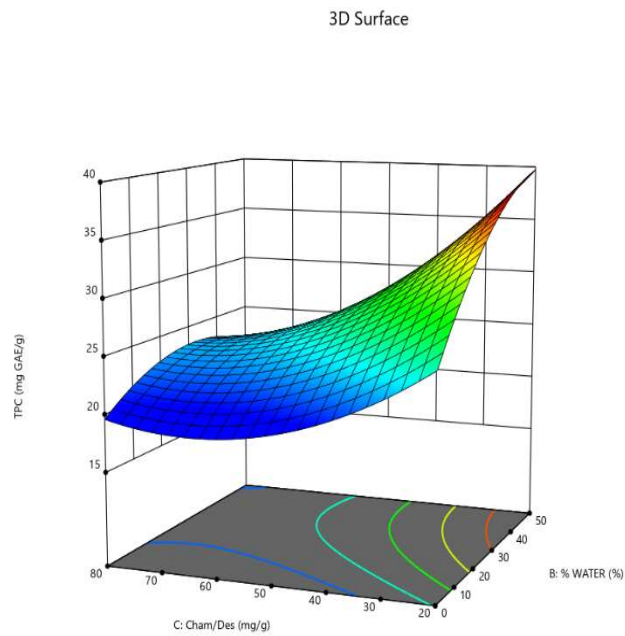
Πίνακας 19: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών.

Χρόνος εκχύλισης (h)	w/w % Νερού ως συνδιαλύτης	Αναλογία mg χαμομηλιού προς g διαλύτη	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (mg GAE/g)	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (mg CAE/g)
2,05	42,3	21,28	38,33	6,04

Παρακάτω παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών μεταβλητών κάθε φορά, με την τρίτη μεταβλητή να λαμβάνει την βέλτιστη τιμή της. Υπενθυμίζεται ότι τα

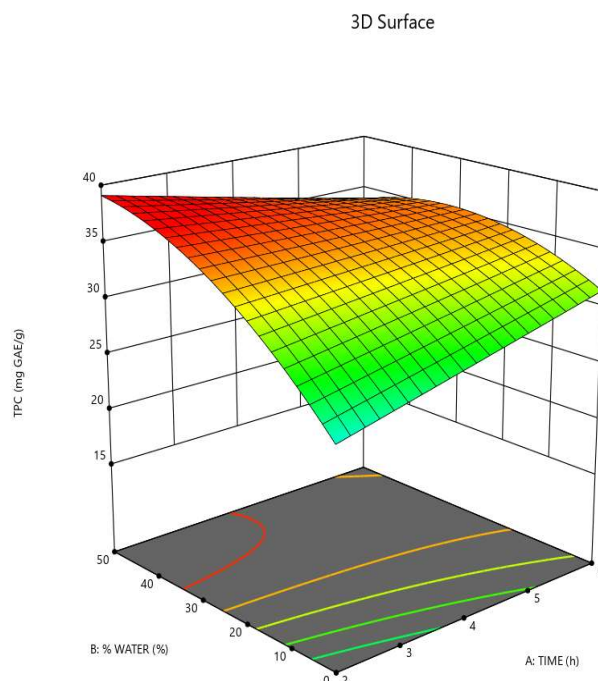
A, B, C συμβολίζουν τον χρόνο, το κατά βάρος ποσοστό του νερού που προστίθεται ως συνδιαλύτης και την αναλογία μάζας του χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη σε mg Chamomile/ g DES, αντίστοιχα.

Factor Coding: Actual
● Design Points
20.5 37.55
X1 = B: % WATER
X2 = C: Cham/Des
Actual Factor
A: TIME = 2,05



Διάγραμμα 25: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 20,5 37,55
 X1 = A: TIME
 X2 = B: % WATER
 Actual Factor
 C: Cham/Des = 21,28



Διάγραμμα 26: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και A για τη βέλτιστη τιμή C.

Παρατηρείται από τα παραπάνω γραφήματα πως με αύξηση του χρόνου εκχύλισης αυξάνεται το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών. Επίσης, η αύξηση του ποσοστού του νερού που προστίθεται ως συνδιαλύτης, φαίνεται να έχει θετική επίδραση στο ολικό περιεχόμενο των φαινολικών. Ειδικότερα, παρατηρείται μεγιστοποίηση του TPC, όταν μεγιστοποιείται η ποσότητα νερού που προστίθεται στον διαλύτη, ενώ όταν δεν προστίθεται νερό στο NaDES, η τιμή του TPC είναι αρκετά μειωμένη. Τέλος, φαίνεται πως η αύξηση της αναλογίας μάζας χαμομηλιού προς τη μάζα του διαλύτη επιφέρει μείωση της τιμής TPC.

3.4.3.2 Μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC)

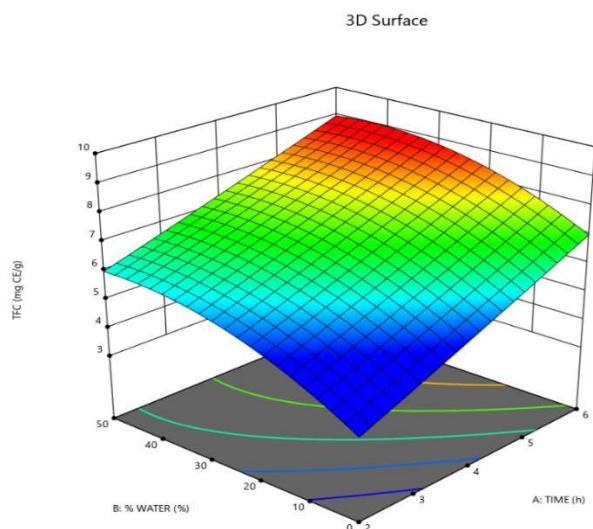
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες που προτείνονται από το μοντέλο για την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή.

Πίνακας 20: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών.

Χρόνος εκχύλισης (h)	w/w % Νερού ως συνδιαλύτης	Αναλογία mg χαμομηλιού προς g διαλύτη	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (mg GAE/g)	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (mg CAE/g)
5,93	32,26	21,20	35,04	8,86

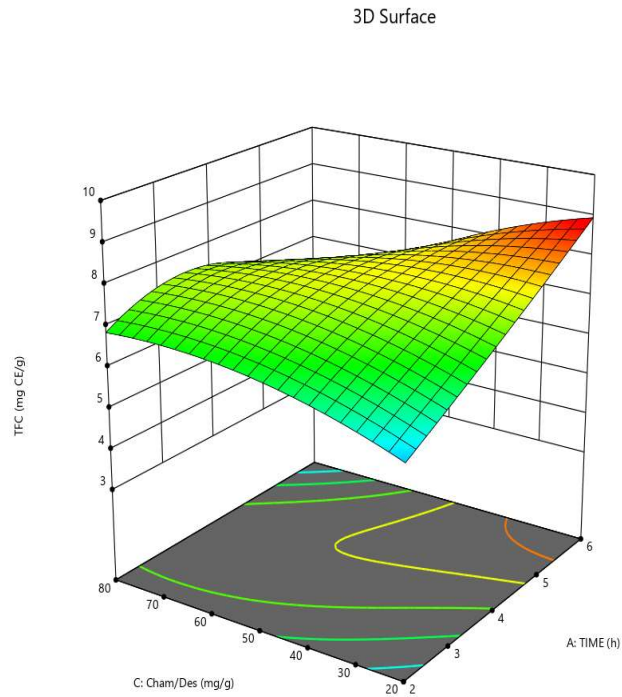
Παρακάτω παρουσιάζονται τα τρισδιάστατα γραφήματα των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών μεταβλητών κάθε φορά, με την τρίτη μεταβλητή να λαμβάνει την βέλτιστη τιμή της. Υπενθυμίζεται ότι τα A, B, C συμβολίζουν τον χρόνο, το κατά βάρος ποσοστό του νερού που προστίθεται ως συνδιαλύτης και την αναλογία μάζας του χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη σε mg Chamomile/g DES, αντίστοιχα.

Factor Coding: Actual
● Design Points
5 8,81
X1 = A: TIME
X2 = B: % WATER
Actual Factor
C: Cham/Des = 21,2



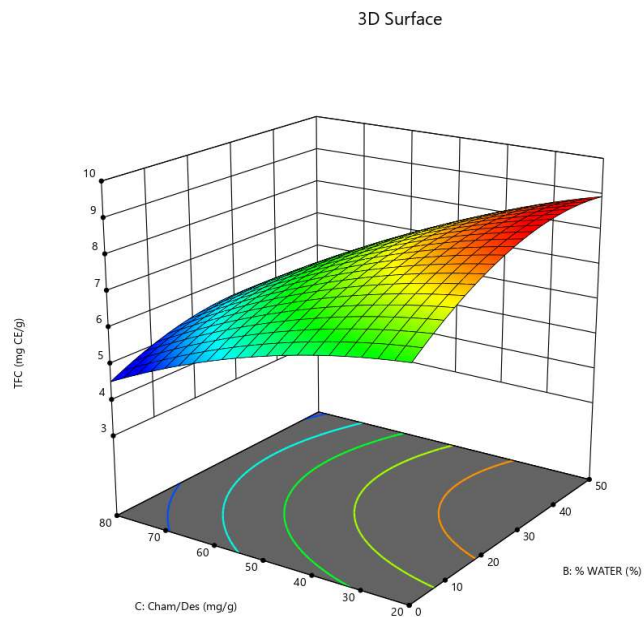
Διάγραμμα 27: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B για τη βέλτιστη τιμή C

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 5
 8,81
 X1 = A: TIME
 X2 = C: Cham/Des
Actual Factor
 B: % WATER = 32,26



Διάγραμμα 28: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C για τη βέλτιστη τιμή B.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 5
 8,81
 X1 = B: % WATER
 X2 = C: Cham/Des
Actual Factor
 A: TIME = 5,93



Διάγραμμα 29: 3D διάγραμμα επιφάνειας του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τη βέλτιστη τιμή A.

Παρατηρείται από τα γραφήματα πως τόσο η αύξηση του χρόνου εκχύλισης, όσο και η αύξηση του κατά βάρους ποσοστού του νερού που προστίθεται ως συνδιαλύτης μπορεί να επιδράσει θετικά στην αύξηση του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών. Σχετικά με την επίδραση της αναλογίας μάζας χαμομηλιού προς μάζα DES, παρατηρείται πως για δεδομένο ποσοστό προστιθέμενου νερού ίσο με 32,26% w/w, αύξηση της αναλογίας μπορεί να επιφέρει μικρή αύξηση της τιμής TFC, ενώ σε υψηλούς χρόνους εκχύλισης για να επιτευχθεί αύξηση της τιμής TFC συνιστάται η μείωση της αναλογίας.

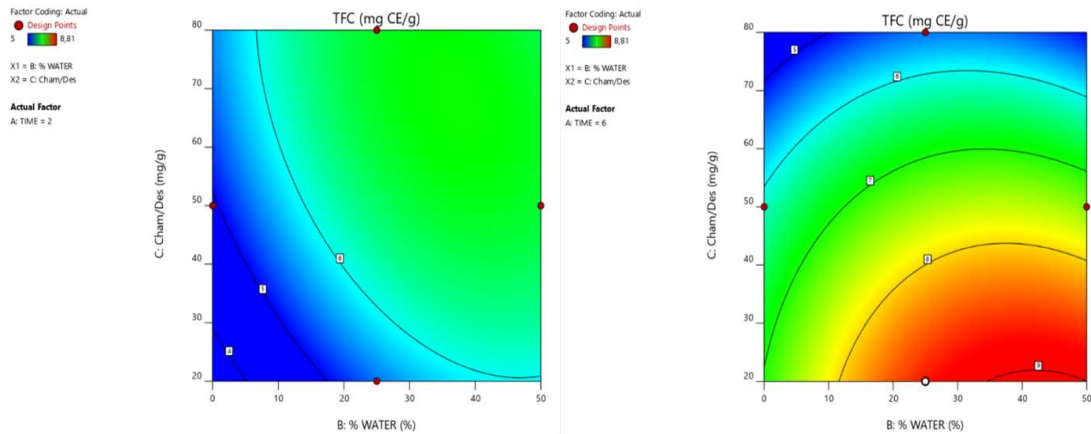
3.4.3.2 Ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι βέλτιστες συνθήκες που προτείνονται από το μοντέλο για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά και φλαβονοειδή.

Πίνακας 21: Βέλτιστες τιμές συνθηκών εκχύλισης για ταυτόχρονη μεγιστοποίηση ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών.

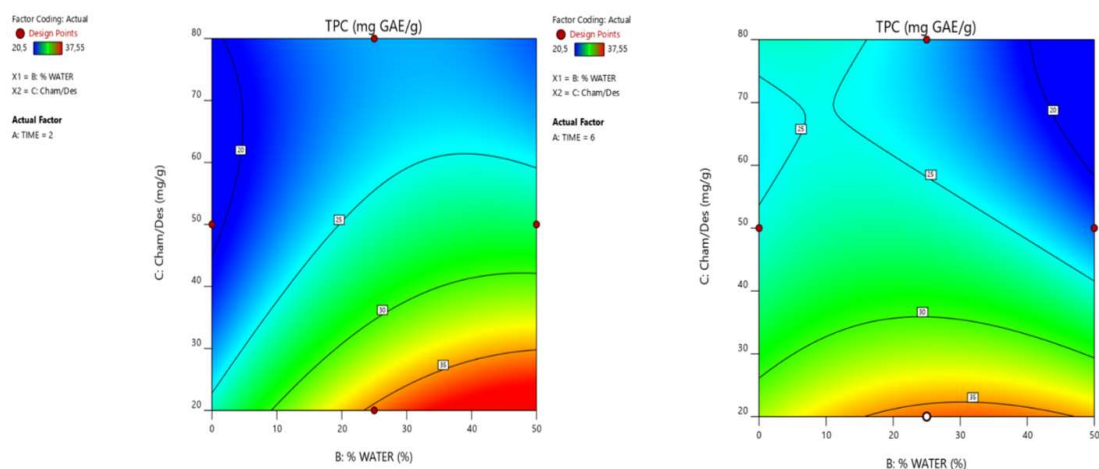
Χρόνος εκχύλισης (h)	w/w % Νερού ως συνδιαλύτης	Αναλογία mg χαμομηλιού προς g διαλύτη	Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (mg GAE/g)	Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (mg CAE/g)
5,79	33,86	20	36,09	8,81

Σύμφωνα με τον πίνακα 21 φαίνεται πως για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά και φλαβονοειδή είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση της εκχύλισης σε υψηλούς χρόνους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για την εκχύλιση των φλαβονοειδών είναι αναγκαία η υψηλή διάρκεια εκχύλισης, όπως παρατηρείται από τα παρακάτω διαγράμματα contour. Ειδικότερα, στο αριστερό διάγραμμα που αντιστοιχεί στα αποτελέσματα του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή για χρόνο εκχύλισης 2 ώρες, δεν εντοπίζεται η κόκκινη περιοχή που αντιστοιχεί στις υψηλές τιμές TFC, ενώ στο δεξί διάγραμμα όπου αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα TFC για χρόνο εκχύλισης ίσο με 6 ώρες, παρατηρείται η μεγιστοποίηση των τιμών TFC όταν ελαχιστοποιείται η αναλογία mg χαμομηλιού/ g διαλύτη και αυξάνεται το ποσοστό του προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη.



Διάγραμμα 30: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τον ελάχιστο χρόνο εκχύλισης (αριστερά) και τον μέγιστο χρόνο εκχύλισης (δεξιά).

Αντίθετα, η μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών μπορεί να επιτευχθεί σε χαμηλότερους χρόνους εκχύλισης, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα παρακάτω. Ειδικότερα, στο αριστερό διάγραμμα που αντιστοιχεί στα αποτελέσματα TPC για χρόνο εκχύλισης 2 ώρες, παρατηρείται μεγιστοποίηση των φαινολικών, καθώς ελαχιστοποιείται η αναλογία mg χαμομηλιού/ g διαλύτη και μεγιστοποιείται το ποσοστό του προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη. Αντίθετα, με την αύξηση του χρόνου η κοκκινισμένη περιοχή που αντιστοιχεί στις υψηλές τιμές TPC φαίνεται να υποχωρεί αρκετά, ενώ προκειμένου να ληφθούν ικανοποιητικές τιμές φαινολικών είναι απαραίτητη η ελαχιστοποίηση της αναλογία mg χαμομηλιού/ g διαλύτη και το ποσοστό του προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη να κυμαίνεται στο εύρος 20-50% w/w. Επομένως, η βέλτιστη λύση ώστε να μεγιστοποιηθούν και οι δύο παράμετροι, προβλέπει την πραγματοποίηση της εκχύλισης μεγάλης διάρκειας, με την ελάχιστη αναλογία mg χαμομηλιού/ g διαλύτη και με την παρουσία νερού ως συνδιαλύτη σε ποσοστό περίπου 30% w/w, όπως συνοψίζεται στον πίνακα 21.



Διάγραμμα 31: Διαγράμματα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C για τον ελάχιστο χρόνο εκχύλισης (αριστερά) και τον μέγιστο χρόνο εκχύλισης (δεξιά).

3.4.3 Επιβεβαίωση του μοντέλου

Για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας του μοντέλου και των προβλέψεων του διεξήχθη ένα επιπλέον πείραμα επιβεβαίωσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση χαμομηλιού και προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC). Οι συνθήκες διεξαγωγής του επιβεβαιωτικού πειράματος είναι ίδιες με τις συνθήκες μεγιστοποίησης του ολικού περιεχομένου των φαινολικών που περιγράφονται στην παράγραφο 3.4.3.1, δηλαδή για χρόνο εκχύλισης ίσο με 2,05 ώρες, με 42,3% w/w νερό ως συνδιαλύτη και αναλογία μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη ίση με 21,25 mg/g. Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις βρέθηκε ίσο με 41,4 mg GAE/g, ενώ το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή ισούται με 5,51 mg CAE/g. Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, τα αποτελέσματα αυτά είναι εντός των ορίων που συνιστά το λογισμικό, και επομένως επιβεβαιώνεται η εγκυρότητα του μοντέλου ενώ δεν απαιτείται κάποια πρόσθετη τροποποίηση.

Πίνακας 22: Πειραματικά αποτελέσματα ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων του πειράματος επιβεβαίωσης του μοντέλου.

Confirmation

Two-sided Confidence = 95%

Solution 8 of 100 Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
TPC	38,3331	38,3331		1,51168	1	1,92588	33,7791	41,4	42,8871
TFC	6,04193	6,04193		0,145251	1	0,204727	5,47352	5,51	6,61034

3.5 Αξιολόγηση Αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού

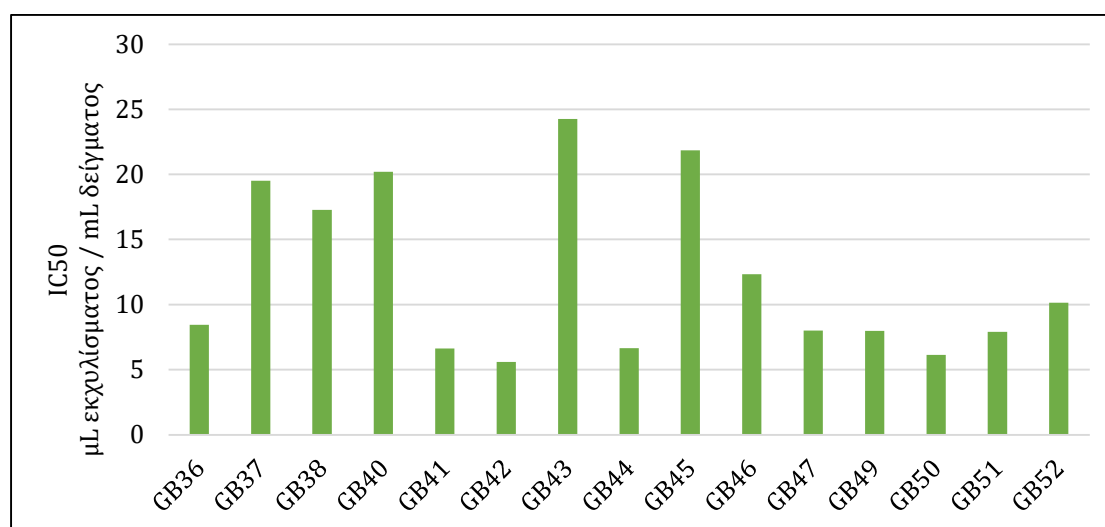
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται για τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού, οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων μαζί με τις συνθήκες εκχύλισης για τρεις χρόνους επώασης (15, 30 και 60 λεπτά).

Πίνακας 23: Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων πειραματικού σχεδιασμού καθώς και συνθήκες εκχύλισης.

Κωδικός Πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (x ₁)	Λόγος mg Χαμομηλιού /g διαλύτη (x ₂)	% w/w Νερού ως συνδιαλύτης (x ₃)	IC ₅₀ (μL εκχ./ml δ.)		
					15 min	30 min	60 min
GB37	--0	2	20	25	24,36	19,50	16,87
GB36	-0+	2	50	50	11,29	8,45	6,62
GB38	-0-	2	50	0	21,16	17,57	15,09

GB42	--0	2	80	25	7,51	5,58	4,69
GB47	000	4	50	25	9,70	8,00	6,89
GB49	000	4	50	25	9,81	7,98	6,66
GB52	000	4	50	25	13,79	10,14	8,96
GB41	0+-	4	80	0	8,51	6,62	5,18
GB40	0--	4	20	0	25,96	20,20	17,08
GB44	0++	4	80	50	8,61	6,65	5,57
GB43	0-+	4	20	50	31,97	24,25	19,05
GB51	+0-	6	50	0	9,76	7,91	6,76
GB45	+-0	6	20	25	22,38	21,84	18,86
GB50	++0	6	80	25	7,57	6,14	4,91
GB46	+0+	6	50	50	15,76	12,33	10,40

Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά η τιμή IC₅₀ καθενός από τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για χρόνο επώασης ίσο με 30 λεπτά.



Διάγραμμα 32: Γραφική αναπαράσταση αποτελεσμάτων μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

Σύμφωνα με το γράφημα, παρατηρείται ότι το εκχύλισμα με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή αυτό με την χαμηλότερη τιμή IC₅₀ είναι το εκχύλισμα GB42 με IC₅₀ 5,58 μL εκχυλίσματος/ mL δείγματος, το οποίο εκχυλίστηκε σε συνθήκες αναλογίας mg χαμομηλιού / g DES 80, ποσοστό προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη 25% w/w και χρόνο εκχύλισης 2 ώρες. Οι συνθήκες αυτές δεν φαίνεται να είναι καθόλου τυχαίες, όπως προκύπτει από την ακόλουθη αξιολόγηση.

Ειδικότερα, παρατηρείται από τα ζεύγη πειραμάτων GB36 & GB46, GB37 & GB45, GB42 & GB50, ότι η αύξηση του χρόνου εκχύλισης προκαλεί μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης. Επίσης, από τα ζεύγη GB42 & GB37, GB41 & GB40, GB45 & GB50 διαπιστώνεται ότι η αύξηση της αναλογίας των mg χαμομηλιού / g

DES επιφέρει μείωση της τιμής IC₅₀. Τέλος, μικρή επίδραση φαίνεται να επιφέρει το ποσοστό του προστιθέμενου νερού, καθώς παρατηρώντας τα ζεύγη GB40 & GB43, GB51 & GB46, GB41 & GB44 φαίνεται πως η αύξηση του ποσοστού του προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη επιφέρει ελάχιστη αύξηση της τιμής IC₅₀. Συνοψίζοντας λοιπόν, οι συνθήκες για την λήψη εκχυλίσματος με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση απαιτούν μικρό χρόνο εκχύλισης, υψηλή αναλογία μάζας χαμομηλιού προς τη μάζα διαλύτη, ενώ το ποσοστό του προστιθέμενου νερού δεν είναι τόσο σημαντικό.

Κεφάλαιο 4^ο : Συμπεράσματα

Κατά την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 6 διαφορετικοί NaDESs, που αξιοποιήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα για την λήψη και ποσοτικό προσδιορισμό βιοδραστικών ενώσεων του εκχυλίσματος χαμομηλιού. Ειδικότερα, οι διαλύτες που παρήχθησαν είναι οι εξής: βεταΐνη: γλυκερόλη (1:2), βεταΐνη: γλυκερόλη (1:3), βεταΐνη: γλυκερόλη: νερό (1:2:1), D- γλυκόζη: D, L- γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6,2), βεταΐνη: D, L γαλακτικό οξύ: νερό (1:2:2,5), φρουκτόζη: γλυκερόλη: νερό (1:1:5). Για κάθε ένα από τα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC) καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση. Ο καταλληλότερος διαλύτης ήταν το NaDES D-γλυκόζη: D, L- γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6,2), ο οποίος επιλέχθηκε για την πραγματοποίηση των επομενων πειραμάτων κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, καθώς το σύστημα που προκύπτει με την προσθήκη νερού ως συνδιαλύτη παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα. Επισημαίνεται ότι πέρα από την σύγκριση των NaDESs μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκε σύγκριση και με συμβατικά εκχυλιστικά μέσα όπως το νερό και το σύστημα αιθανόλη: νερό (70:30). Από την σύγκριση αυτή βρέθηκε πως διαλύτες όπως το σύστημα D-γλυκόζη: D, L- γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6,2) με προσθήκη νερού ως συνδιαλύτη σε ποσοστό 25% w/w, καθώς και ο διαλύτης φρουκτόζη: γλυκερόλη: νερό (1:1:5) είναι αποτελεσματικότεροι από τους συμβατικούς διαλύτες που προαναφέρθηκαν.

Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό τύπου Box-Behnken διεξήχθησαν 15 πειράματα, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενό τους σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή, ενώ αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση. Από την βελτιστοποίηση της διεργασίας, βρέθηκε ότι τόσο η αύξηση του χρόνου εκχύλισης όσο και της ποσότητας προστιθέμενου νερού ως συνδιαλύτη μπορούν να ενισχύσουν την εκχύλιση των φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, ενώ παράλληλα συνιστάται η μείωση της αναλογίας μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη.

Επιπρόσθετα, για την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά απαιτούνται οι εξής συνθήκες: χρόνος εκχύλισης 2,05 ώρες, κατά βάρος περιεκτικότητα νερού ως συνδιαλύτης 42,30% w/w και αναλογία μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη 21,28 mg/g. Για την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου των φαινολικών φαίνεται πως απαιτούνται μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης, ειδικότερα απαιτούνται: 5,93 ώρες εκχύλισης, κατά βάρος περιεκτικότητα νερού ως συνδιαλύτης 32,26% w/w και αναλογία μάζας χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη 21,20 mg/g. Επιπλέον, για την ταυτόχρονη αύξηση του περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή οι συνθήκες που προτείνονται από το μοντέλο είναι: χρόνος εκχύλισης 5,79 ώρες, κατά βάρος περιεκτικότητα νερού ως συνδιαλύτης 33,86% w/w και αναλογία μάζας

χαμομηλιού προς μάζα διαλύτη 20 mg/g. Το μοντέλο επιβεβαιώθηκε μέσω επιβεβαιωτικού πειράματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη των δομικών χαρακτηρισιστικών για τρεις διαλύτες (βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3, βεταΐνη- D,L γαλακτικό οξύ- νερό 1:2:2,5, D γλυκόζη-D, L γαλακτικό οξύ-νερό 1:5:6,2), καθώς και μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών όλων των διαλυτών. Ειδικότερα, οι ιδιότητες που μελετήθηκαν ήταν το pH και η πολικότητα των διαλυτών. Σχετικά με τις τιμές του pH, παρατίθεται η ταξινόμηση των διαλυτών κατά αύξουσα σειρά: D-γλυκόζη: D, L- γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6,2) < βεταΐνη: D, L γαλακτικό οξύ: νερό (1:2:2,5) < βεταΐνη: γλυκερόλη (1:2) \cong φρουκτόζη: γλυκερόλη: νερό (1:1:5) < βεταΐνη: γλυκερόλη: νερό (1:2:1) < βεταΐνη: γλυκερόλη (1:3). Αναφορικά με την πολικότητα, παρατίθεται η ταξινόμηση των διαλυτών σε αύξουσα σειρά: βεταΐνη: γλυκερόλη (1:2) < βεταΐνη: γλυκερόλη (1:3) < βεταΐνη: D, L γαλακτικό οξύ: νερό (1:2:2,5) < φρουκτόζη: γλυκερόλη: νερό (1:1:5) < D- γλυκόζη: D, L- γαλακτικό οξύ: νερό (1:5:6,2) < βεταΐνη: γλυκερόλη: νερό (1:2:1).

Κεφάλαιο 5^ο : Προτάσεις για το μέλλον

Η παραπάνω έρευνα μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για την διερεύνηση νέων ερευνητικών μονοπατιών, καθώς τα αποτελέσματά της είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και επιβεβαιώνουν την δυνατότητα αξιοποίησης των DESs έναντι των συμβατικών διαλυτών. Αρχικά, για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής συνιστάται η μελέτη κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων χαμομηλιού καθώς και η εφαρμογή κάποιας χρωματογραφικής μεθόδου για την ταυτοποίηση σημαντικών βιοδραστικών ενώσεων, όπως η απιγενίνη, ένα φλαβονοειδές του χαμομηλιού με αντικαρκινικές ιδιότητες και με πολλές αναφορές στην επιστημονική βιβλιογραφία. Ακόμα, μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση θα αποτελούσε η σύγκριση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής με τα αποτελέσματα που θα προέκυπταν εφαρμόζοντας την μέθοδο των υπερήχων για τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης. Άλλες πράσινες τεχνικές υψηλής απόδοσης που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν είναι η υποκρίσιμη και υπερκρίσιμη εκχύλιση.

Επίσης, η δοκιμή άλλων NaDESs υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάδειξη νέων ικανών NaDESs για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το χαμομήλι. Παράλληλα, για δεδομένο διαλύτη θα μπορούσαν να ελεγχθούν διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης, όπως για παράδειγμα διαφορετικές θερμοκρασίες κ.ά με στόχο την βελτιστοποίηση της διεργασίας μέσω του πειραματικού σχεδιασμού .

Ακόμα, εναλλακτικές μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης και προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων θα μπορούσαν να δοκιμαστούν.

Τέλος, συνιστάται η μελέτη της αξιοποίησης των πράσινων εκχυλισμάτων για την ανάπτυξη καινοτόμων καλλυντικών, αφού πρώτα ελεγχθούν ως προς την ασφάλεια τους.

Κεφάλαιο 6^ο: Βιβλιογραφία

1. Zadeh, J. B., Kor, N. M., & Kor, Z. M. (2014). Chamomile (*Matricaria recutita*) as a valuable medicinal plant. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3), 823-829.
2. Ross, S., (2008). Chamomile. *Holistic Nursing Practice*, 22(1), 56-57.
3. Ghasemi, N. D., Asghari, G., Mostajeran, A., & Najafabadi, A. M. (2013). Evaluating the composition of *Matricaria recutita* L. flowers essential oil in hydroponic culture. *Journal of Current Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 54-59.
4. Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future. *Molecular medicine reports*, 3(6), 895-901.
5. Thalluri, G. S. K., & Srinu, P. (2018). Role of Chamomile in Cancer Treatment. *J Pathol Clin Med Res*, 1(001).
6. Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(9), 987-1000.
7. Mao, J. J., Xie, S. X., Keefe, J. R., Soeller, I., Li, Q. S., & Amsterdam, J. D. (2016). Long-term chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) treatment for generalized anxiety disorder: A randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 23(14), 1735-1742.
8. El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J. C., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., & Arnao, M. B. (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A Review of Ethnomedicinal Use, Phytochemistry and Pharmacological Uses. *Life*, 12(4), 479.
9. Chauhan, E. S., & Jaya, A. (2017). Chamomile an ancient aromatic plant-A review. *J. Ayurveda Med. Sci*, 2(4), 251-255.
10. Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., & Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 82.
11. Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing.
12. Espíndola, K., Ferreira, R., Narvaez, L., Silva Rosario, A., da Silva, A., Silva, A., Vieira, A. and Monteiro, M., (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9(514).
13. Meinhart, A. D., Caldeirao, L., Damin, F. M., Teixeira Filho, J., & Godoy, H. T. (2018). Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 76-82.
14. Zuo, J., Tang, W., & Xu, Y. (2015). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid and its related compounds. In *Coffee in health and disease prevention* (pp. 607-613). Academic Press.
15. Carmona-Hernandez, J. C., Taborda-Ocampo, G., & González-Correa, C. H. (2021). Folin-Ciocalteu reaction alternatives for higher polyphenol

- quantitation in Colombian passion fruits. *International Journal of Food Science*, 2021, 1-10.
16. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
 17. Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.
 18. Madunić, J., Madunić, I. V., Gajski, G., Popić, J., & Garaj-Vrhovac, V. (2018). Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Letters*, 413, 11-22.
 19. Venigalla, M., Gyengesi, E., & Münch, G. (2015). Curcumin and Apigenin—novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 10(8), 1181.
 20. Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932.
 21. Agidew, M. G. (2022). Phytochemical analysis of some selected traditional medicinal plants in Ethiopia. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 1-22.
 22. Emad, A. S., & Sanaa, M. S. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 7(10), 528-539.
 23. Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Lightfoot, A. P., Dos Santos, J. M., & Sandhu, M. A. (2021). The Role of Natural and Synthetic Antioxidants in Modulating Oxidative Stress in Drug-Induced Injury and Metabolic Disorders 2020. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021,1-3.
 24. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
 25. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
 26. Dhage, S. D. (2013). Applications of green chemistry principles in everyday life. *International Journal of Research in pharmacy and chemistry*, 3(3), 501-518.
 27. Li, C. J., & Trost, B. M. (2008). Green chemistry for chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13197-13202.
 28. Abdussalam-Mohammed, W., Ali, A. Q., & Errayes, A. O. (2020). Green chemistry: principles, applications, and disadvantages. *Chem. Methodol*, 4, 408-423.
 29. Ivanković, A., Dronjić, A., Bevanda, A. M., & Talić, S. (2017). Review of 12 principles of green chemistry in practice. *International Journal of Sustainable and Green Energy*, 6(3), 39-48.
 30. Erythropel, H., Zimmermann, J., de Winter, T., Petitjean, L., Melnikov, F., Lam, C., Lounsbury, A., Mellor, K., Janković, N., Tu, Q., Pincus, L., Falinski, M., Shi, W.,

- Coish, P., Plata, D. and Anastas, P., (2018). The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry*, 20(9), 1929-1961.
31. Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green plant of natural products: Concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627
 32. Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13(1), 1-26.
 33. Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.
 34. Cvetanović, A. (2019). Extractions without organic solvents: advantages and disadvantages. *Chemistry Africa*, 2(3), 343-349.
 35. 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
 36. Laguerre, M., & Lavaud, A. (2016). The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. *Naturex*, 45-47.
 37. Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(15), 2564-2592.
 38. El Achkar, T., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397-3408.
 39. Yang, Z. (2018). Natural deep eutectic solvents and their applications in biotechnology. *Application of ionic liquids in biotechnology*, 31-59.
 40. Owczarek, K., Szczepanska, N., Plotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., Shyshchak, O., Bratychak, M., & Namiesnik, J. (2016). Natural deep eutectic solvents in extraction process. *Chemistry & Chemical Technology*, 10(4), 601-606.
 41. 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.
 42. Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (Nades): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, 10(10), 2091.
 43. Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384.
 44. Skarpalezos, D., & Detsi, A. (2019). Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources. *Applied Sciences*, 9(19), 4169.
 45. 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.

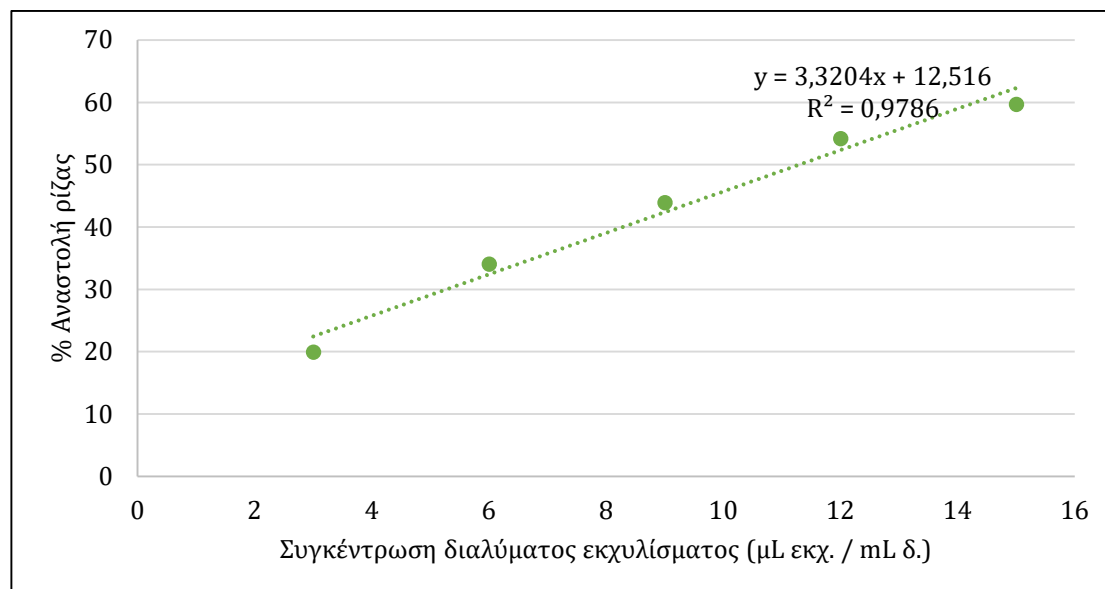
46. Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, *81*(3), 679-690.
47. Vanda, H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G., & Choi, Y. H. (2019). Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, 61-81.
48. Ranga, S., Jaimini, M., Sharma, S. K., Chauhan, B. S., & Kumar, A. (2014). A review on Design of Experiments (DOE). *Int. J. Pharm. Chem. Sci*, *3*(1), 216-24.
49. Said, K. A. M., & Amin, M. A. M. (2015). Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, *2*(1), 8-17.
50. Aydar, A. Y. (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.
51. Morshedi, A. and Akbarian, M. (2014) Application of Response Surface Methodology: Design of Experiments and Optimization: A Mini Review. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, *4*, 2434-2439.
52. 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.
53. Beg, S., & Akhter, S. (2021). Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. In *Design of Experiments for pharmaceutical product development*. Springer. 77-85.
54. Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., & Geiser, D. (2003). Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. *International Journal of Food Science & Technology*, *38*(8), 883-888.
55. Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandão, G., da Silva, E., Portugal, L., dos Reis, P., Souza, A. and dos Santos, W., (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, *597*(2), 179-186.
56. Ahmad, A., Rehman, M., Wali, A., El-Serehy, H., Al-Misned, F., Maooda, S., Aljawdah, H., Mir, T. and Ahmad, P., (2020). Box–Behnken Response Surface Design of Polysaccharide Extraction from *Rhododendron arboreum* and the Evaluation of Its Antioxidant Potential. *Molecules*, *25*(17), 3835.
57. Guerrero-Pérez, M. O., & Patience, G. S. (2020). Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *98*(1), 25-33.
58. Hilal, N., Ismail, A., Matsuura, T. and Oatley-Radcliffe, D., (2017). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in *Membrane characterization*. Elsevier. 3-29.
59. Θ. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας. (2006). Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών, Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος. 16-20.

60. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R., *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης (2007, 6^η έκδοση)*, Εκδόσεις Κωσταράκη, Κεφάλαιο 19

Παράρτημα

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα της ποσοστιαίας αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκάστοτε διαλύματος για τον προσδιορισμό της τιμής IC₅₀ των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού.

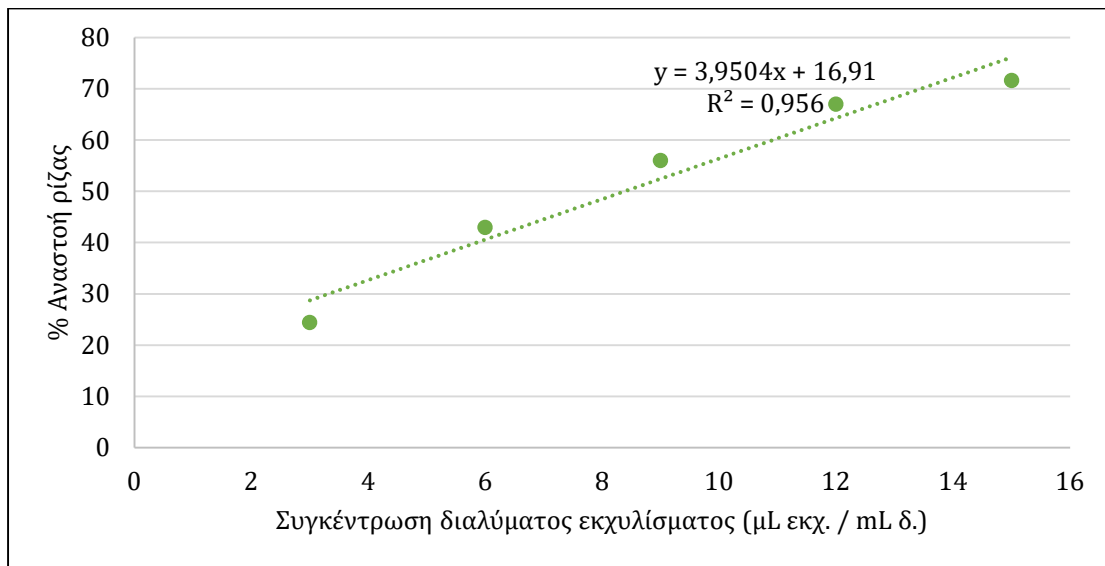
- **Εκχύλισμα GB36** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 33: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 11,29 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

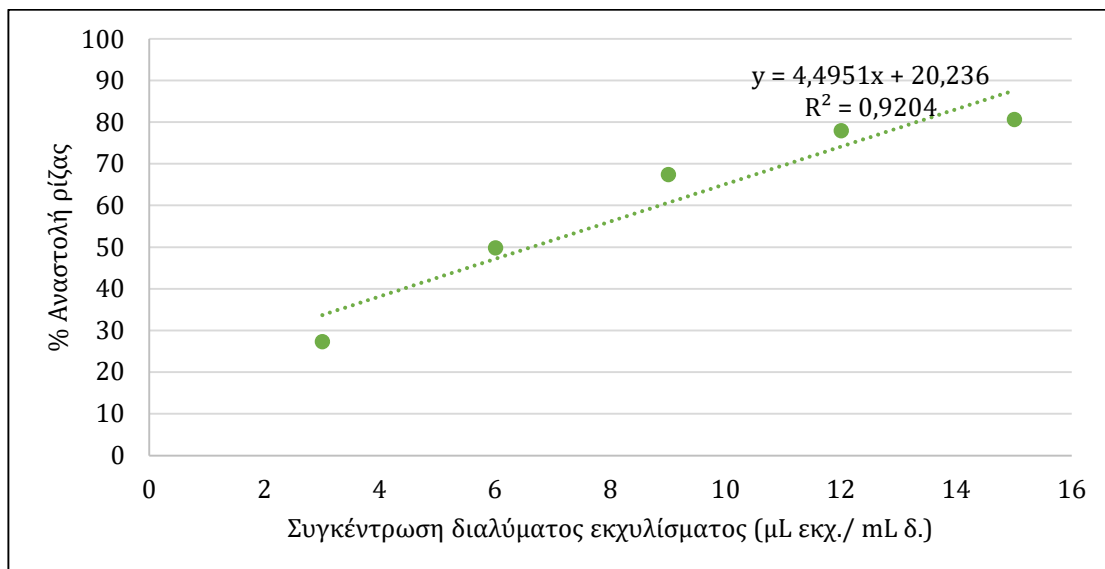
- **Εκχύλισμα GB36** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 34: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 8,45 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

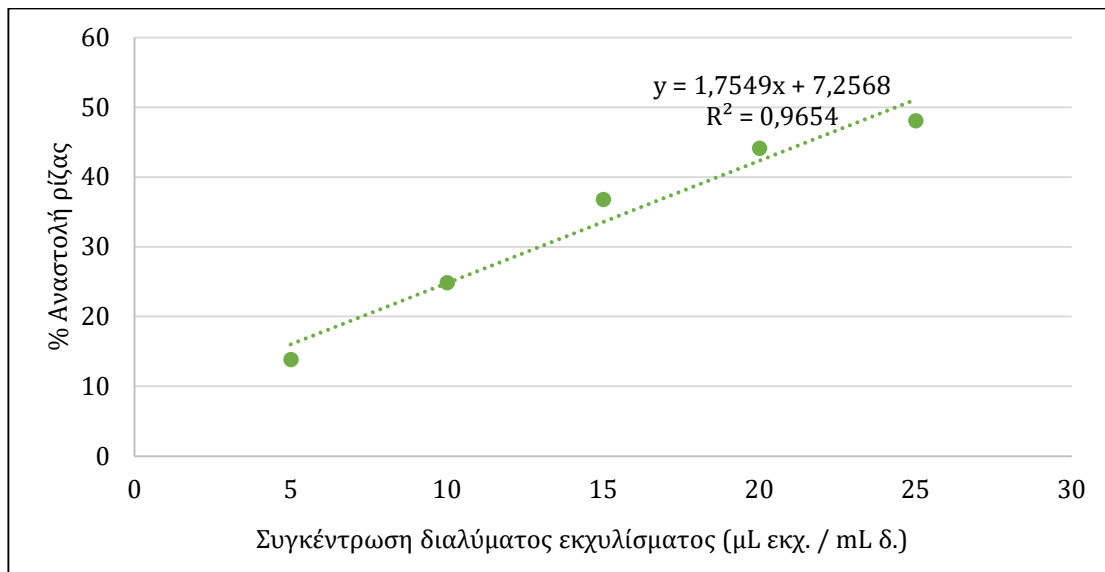
- **Εκχύλισμα GB36** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 35: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB36, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,62 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

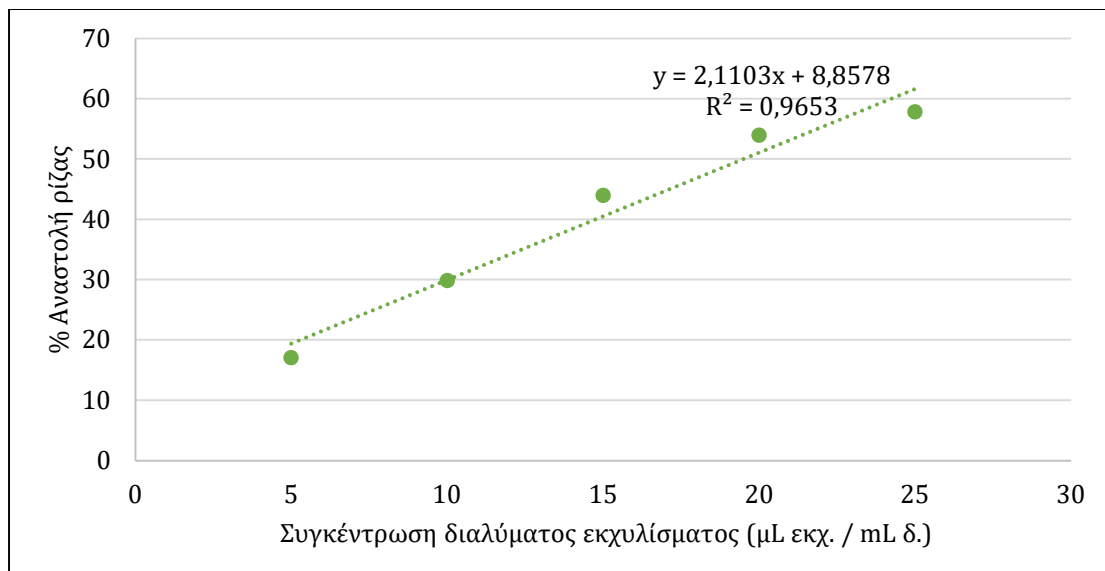
- **Εκχύλισμα GB37** με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 36: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB37, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 24,36 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

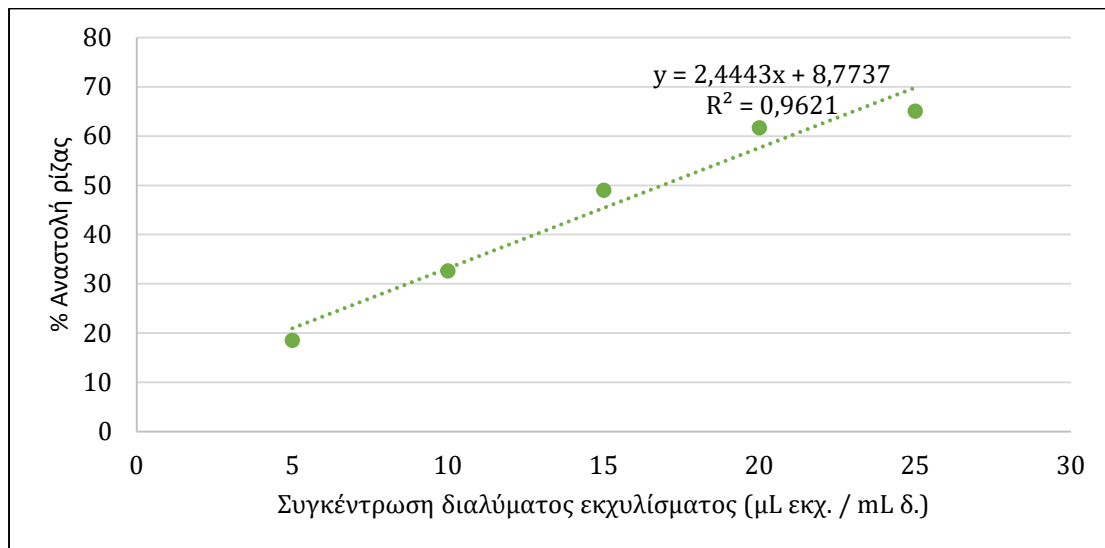
- **Εκχύλισμα GB37** με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 37: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB37, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 19,50 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

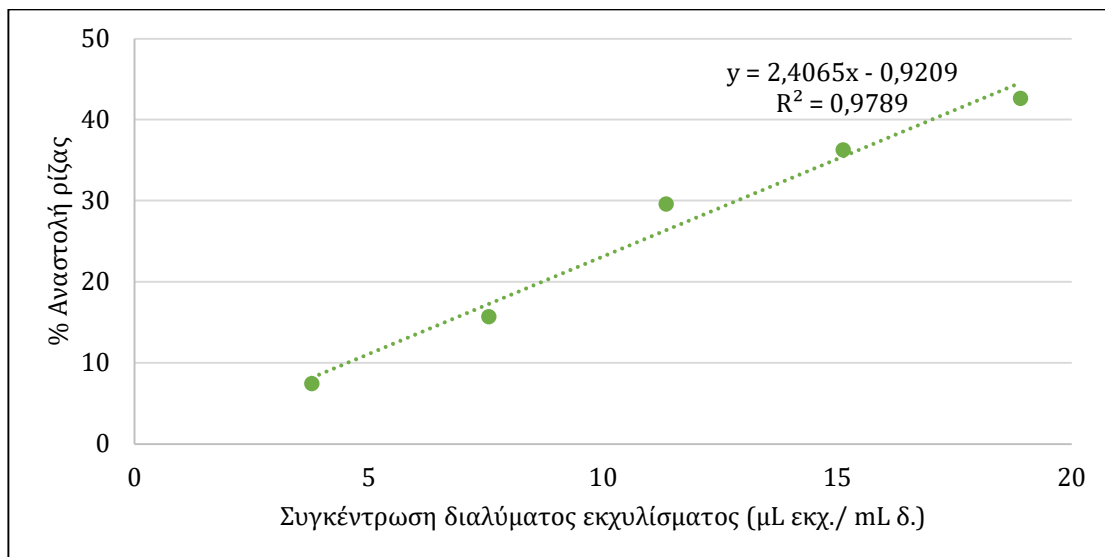
- **Εκχύλισμα GB37** με αρχική συγκέντρωση 0,05 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 38: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB37, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,05 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 16,87 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

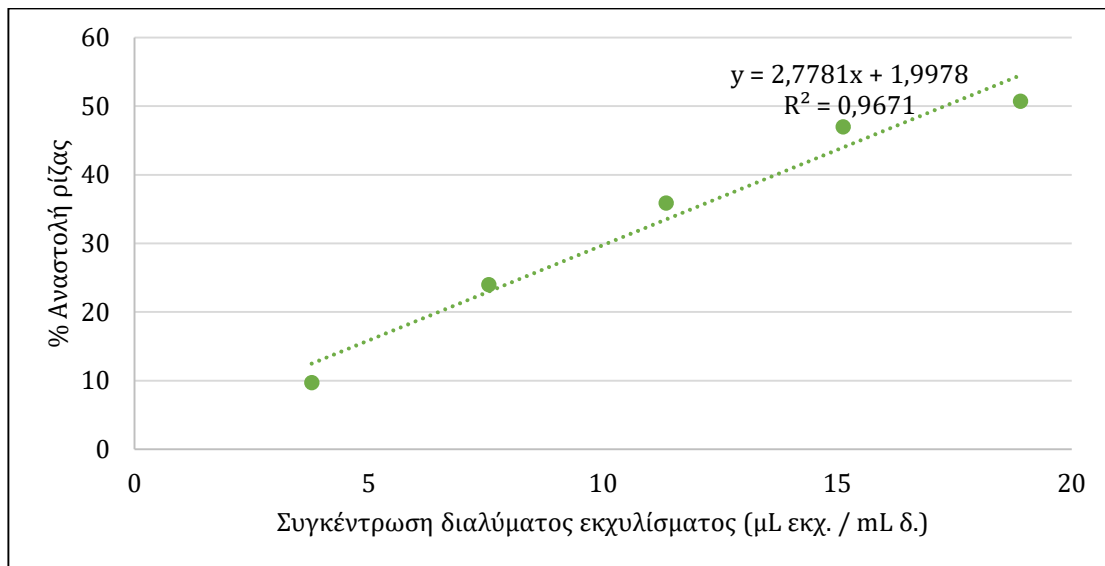
- **Εκχύλισμα GB38** με αρχική συγκέντρωση 0,039 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 39: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB38, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,039 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 21,16 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

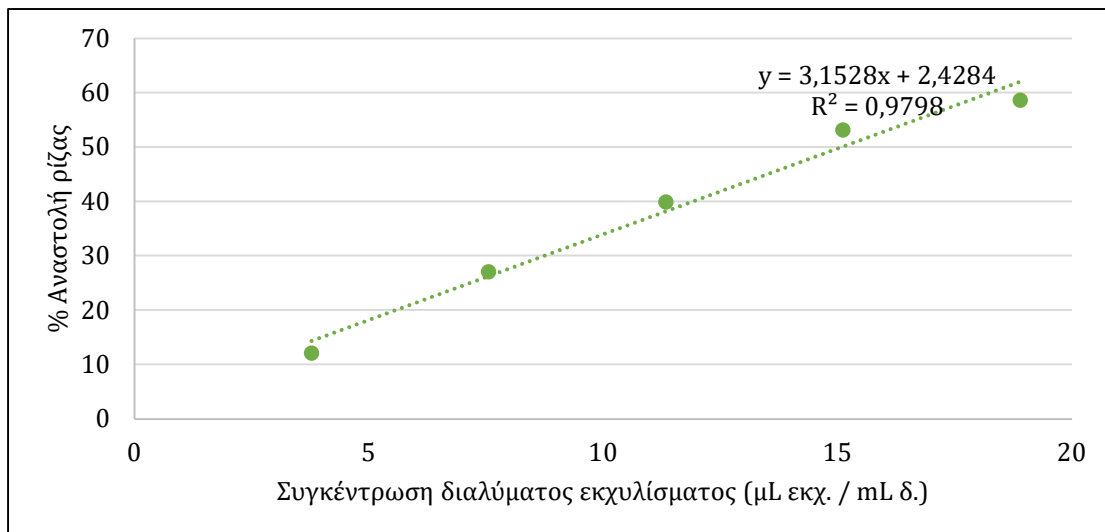
- **Εκχύλισμα GB38** με αρχική συγκέντρωση 0,039 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 40: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB38, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,039 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 17,57 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

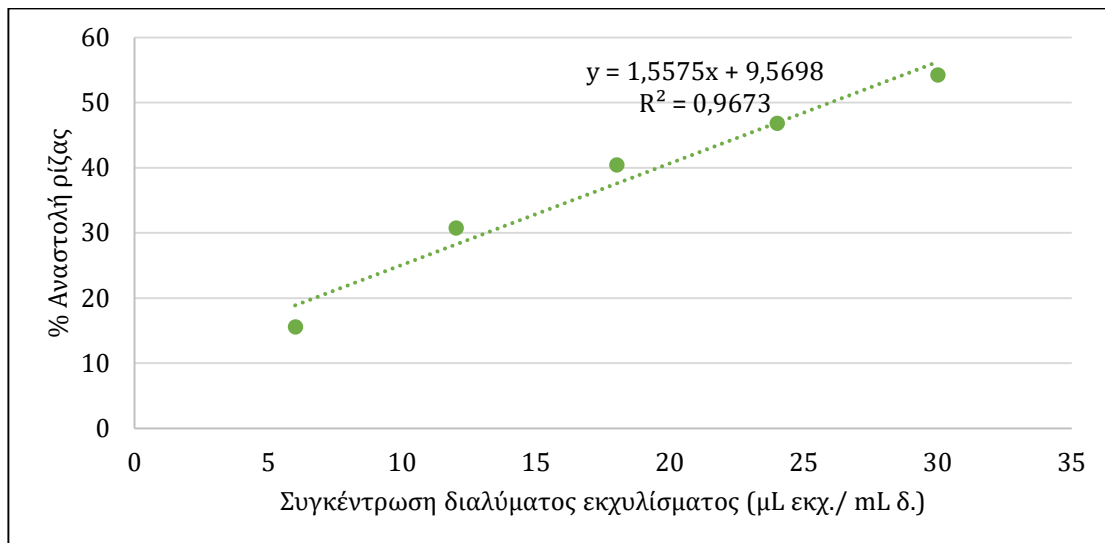
- **Εκχύλισμα GB38** με αρχική συγκέντρωση 0,039 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 41: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB38, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,039 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 15,09 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

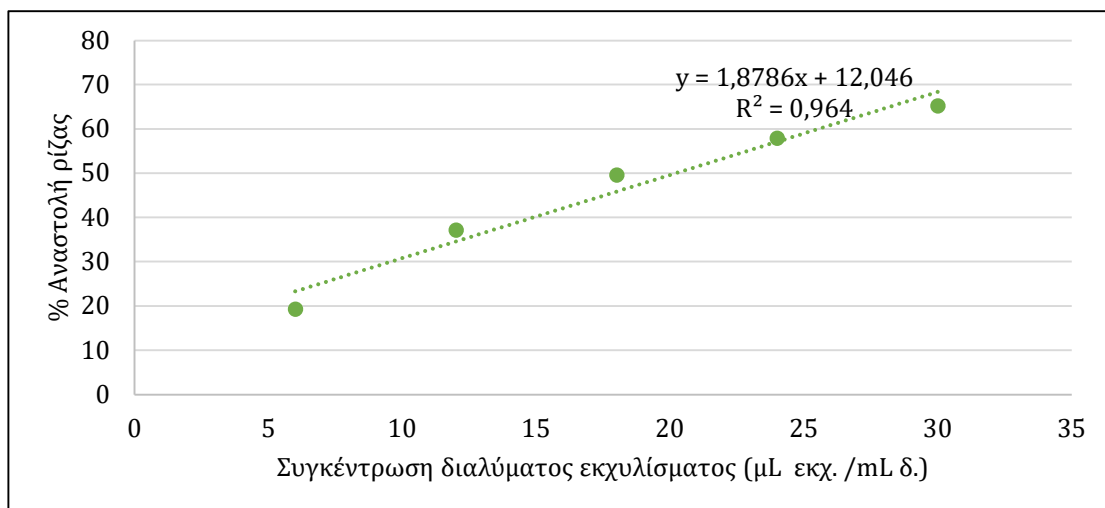
- **Εκχύλισμα GB40** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 42: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB40, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 25,96 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

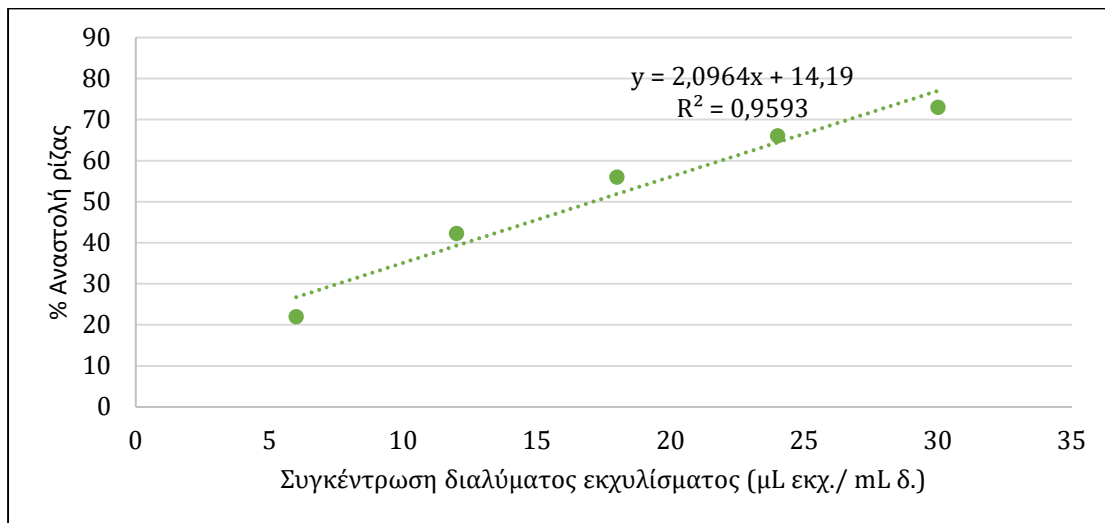
- **Εκχύλισμα GB40** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 43: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB40, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 μl/μl και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 20,20 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

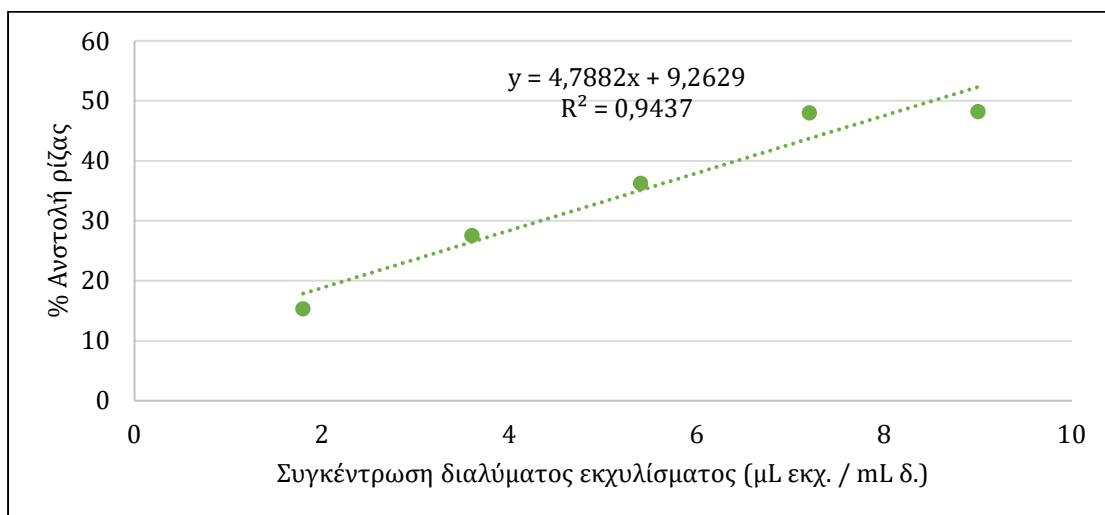
- **Εκχύλισμα GB40** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 44: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB40, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 17,08 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

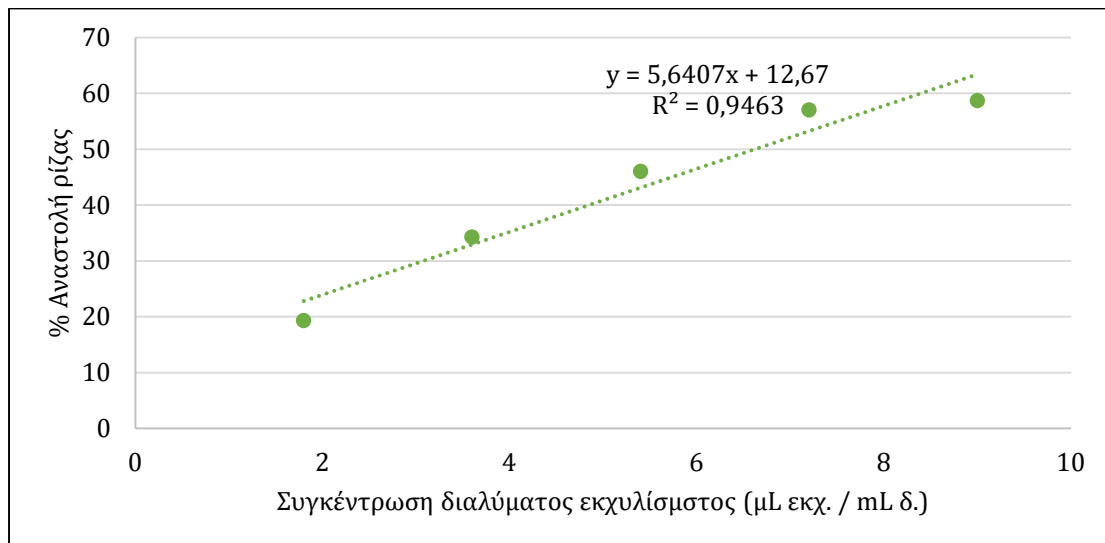
- **Εκχύλισμα GB41** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 45: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB41, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 8,51 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

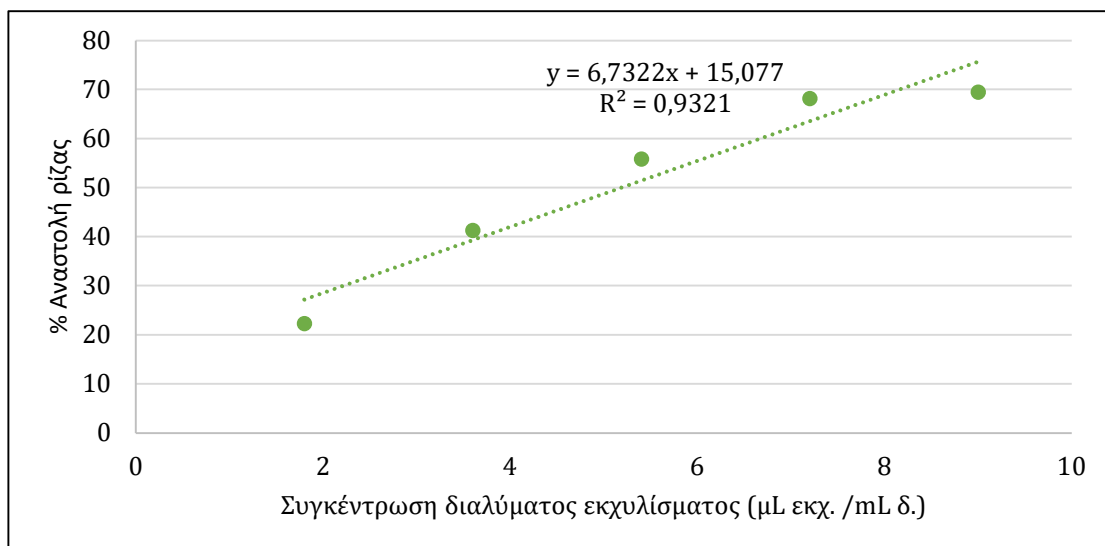
- **Εκχύλισμα GB41** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 46: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB41, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,62 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

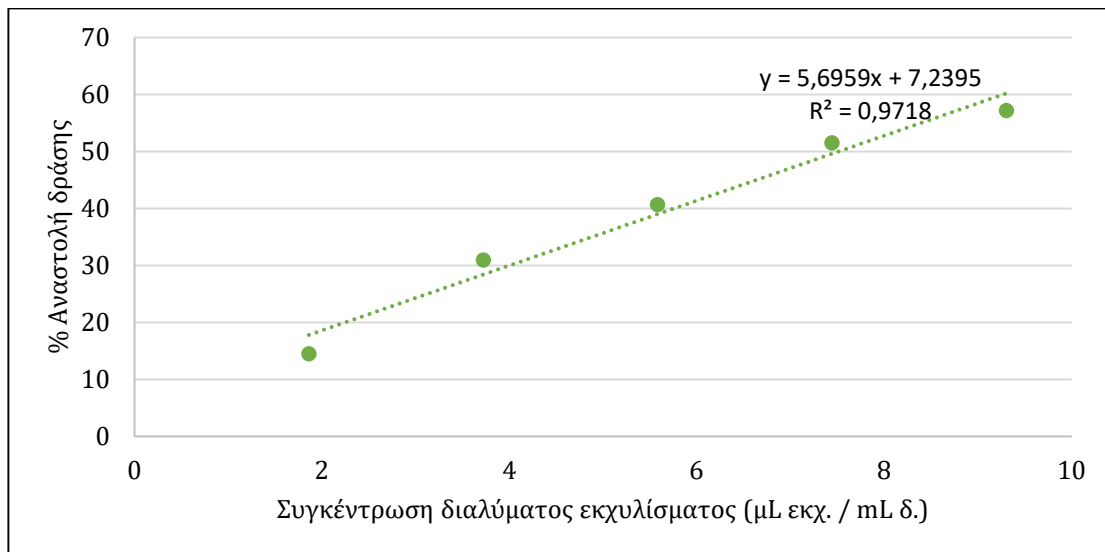
- **Εκχύλισμα GB41** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 47: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB41, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 5,19 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

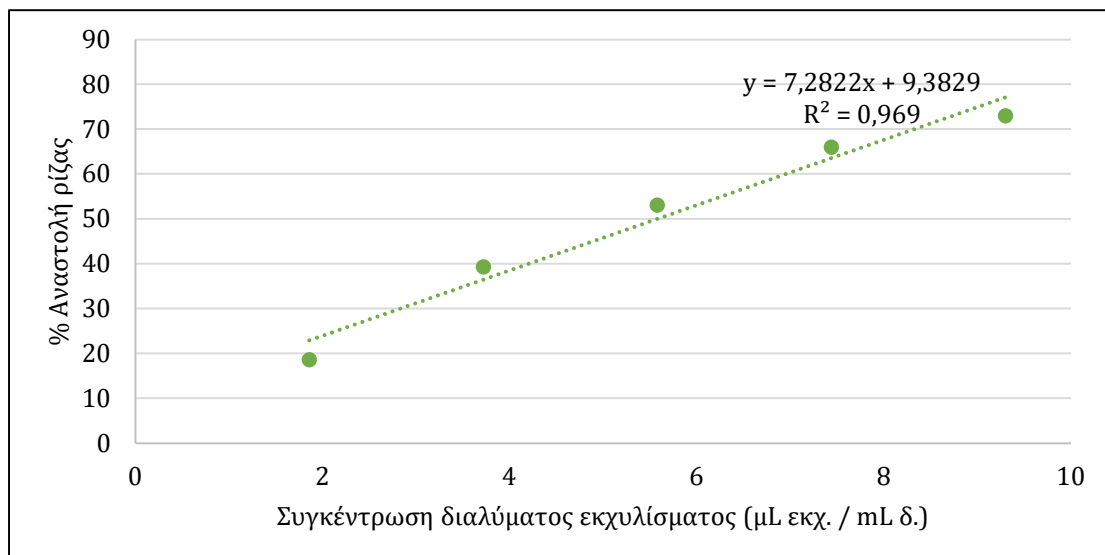
- **Εκχύλισμα GB42** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 48: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB42, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 7,51 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

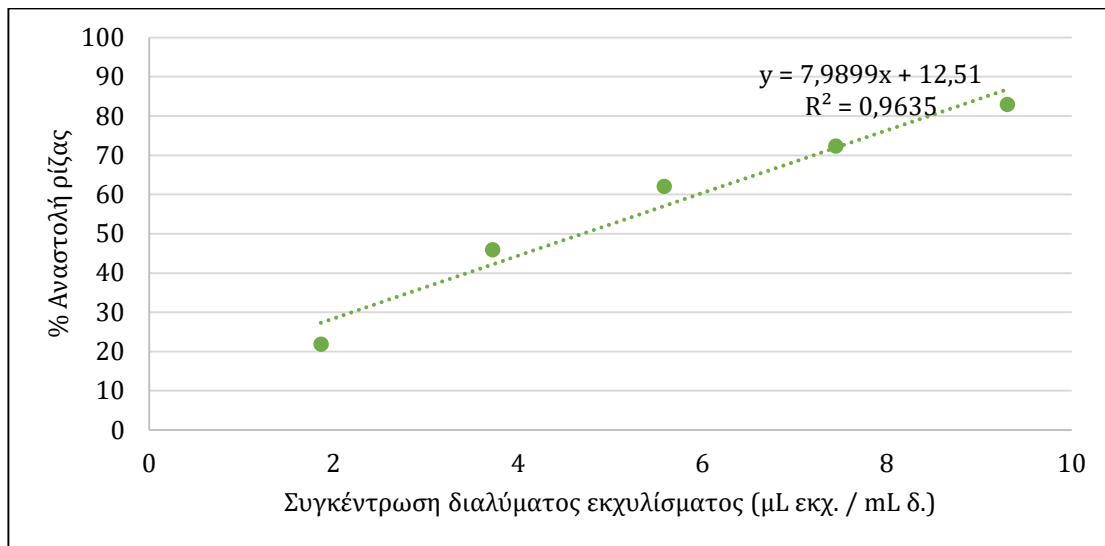
- **Εκχύλισμα GB42** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 49: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB42, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 5,58 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

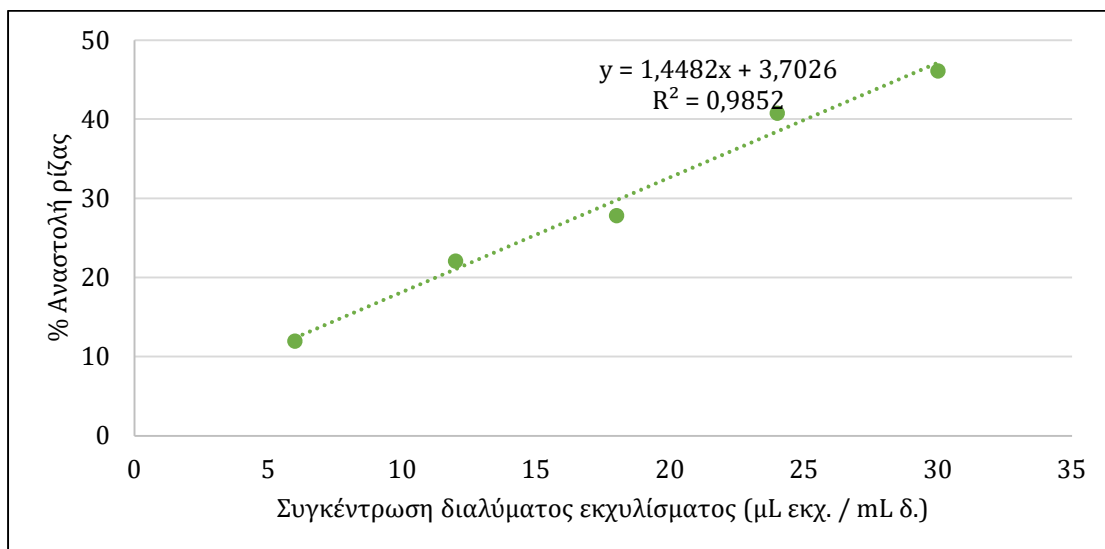
- **Εκχύλισμα GB42** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 50: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB42, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 μl/μl και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 4,69 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

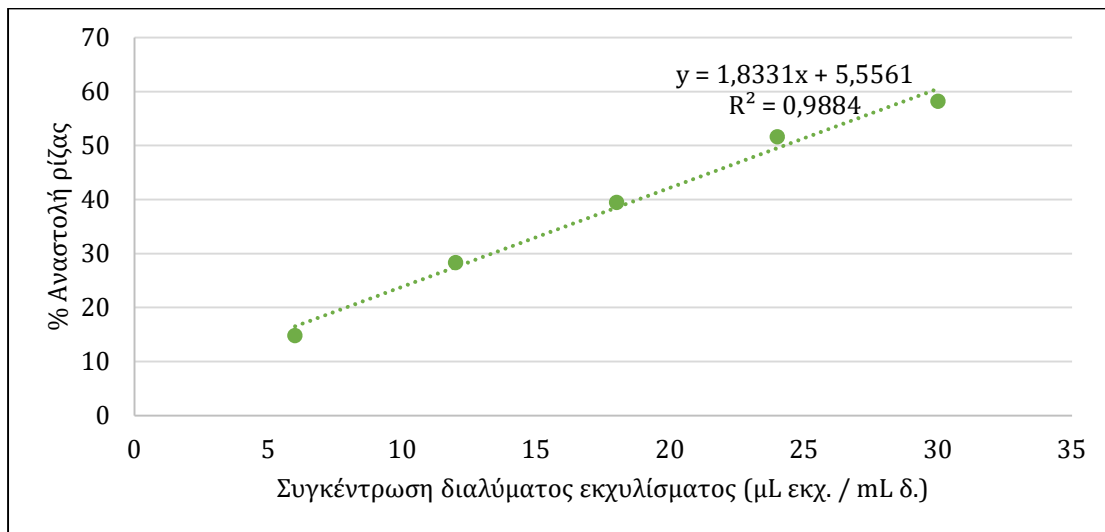
- **Εκχύλισμα GB43** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 51: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB43, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 μl/μl και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC₅₀ προκύπτει ίση με 31,97 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

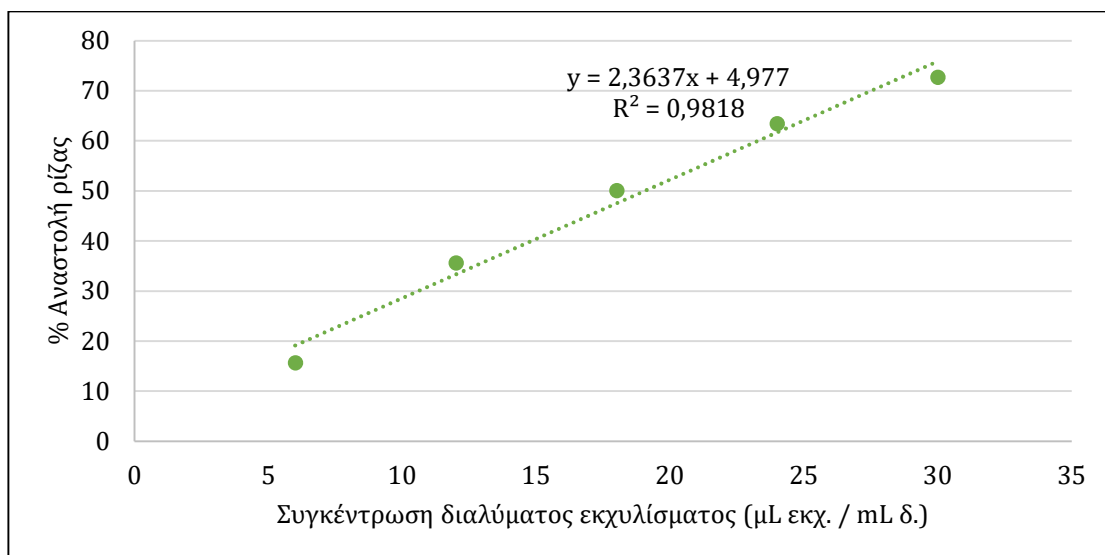
- **Εκχύλισμα GB43** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 52: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB43, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 24,25 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

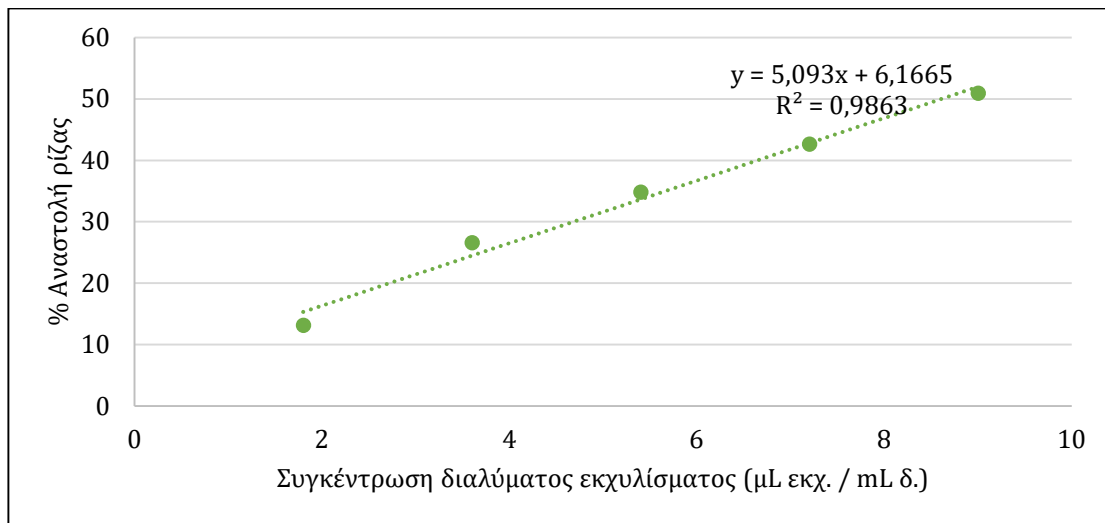
- **Εκχύλισμα GB43** με αρχική συγκέντρωση 0,06 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 53: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB43, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,06 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 19,05 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

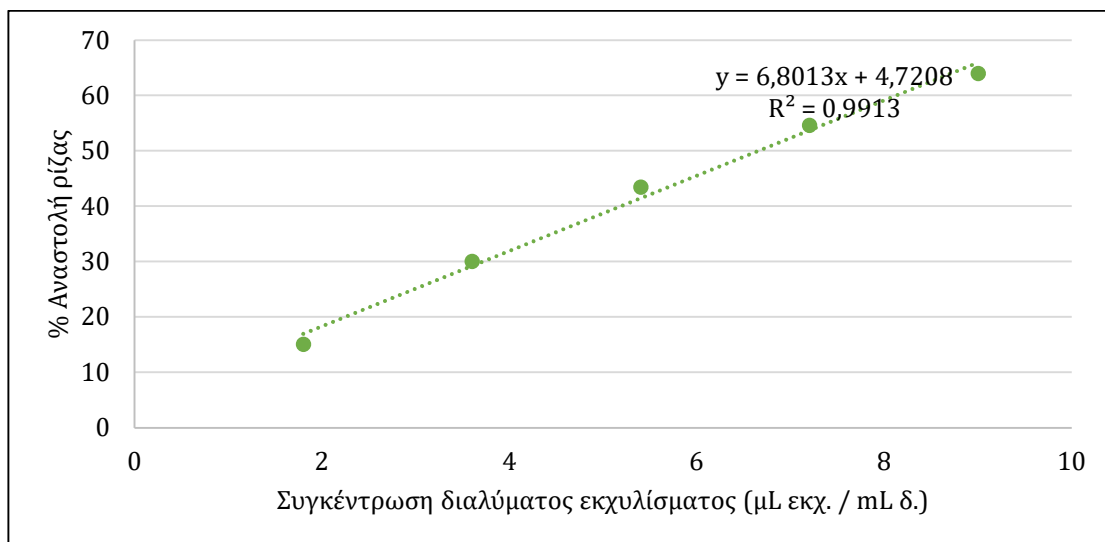
- **Εκχύλισμα GB44** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 54: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB44, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 8,61 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

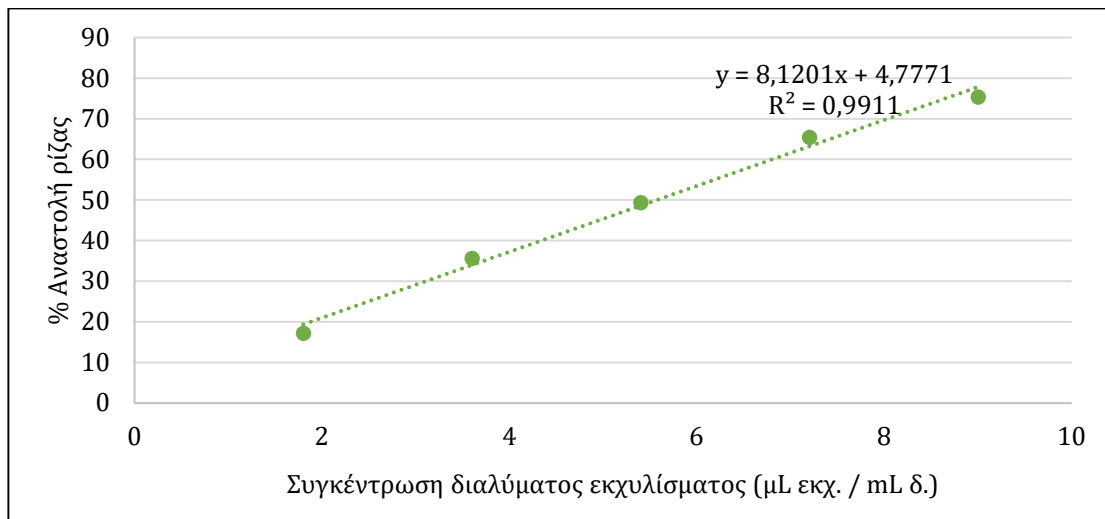
- **Εκχύλισμα GB44** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 55: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB44, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,66 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

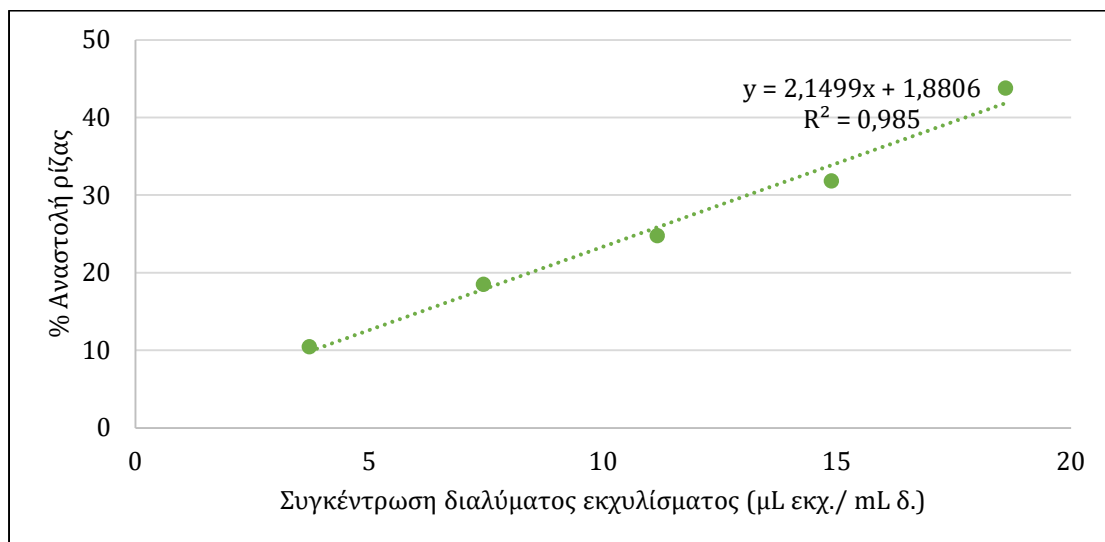
- **Εκχύλισμα GB44** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 56: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB44, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 5,57 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

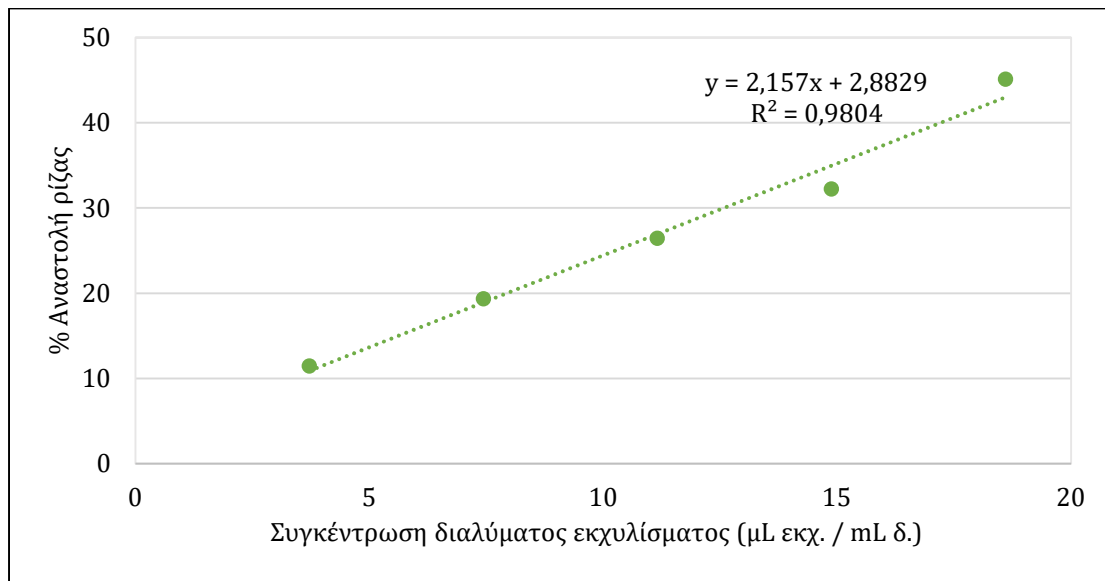
- **Εκχύλισμα GB45** με αρχική συγκέντρωση 0,037 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 57: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB45, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,037 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 22,38 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

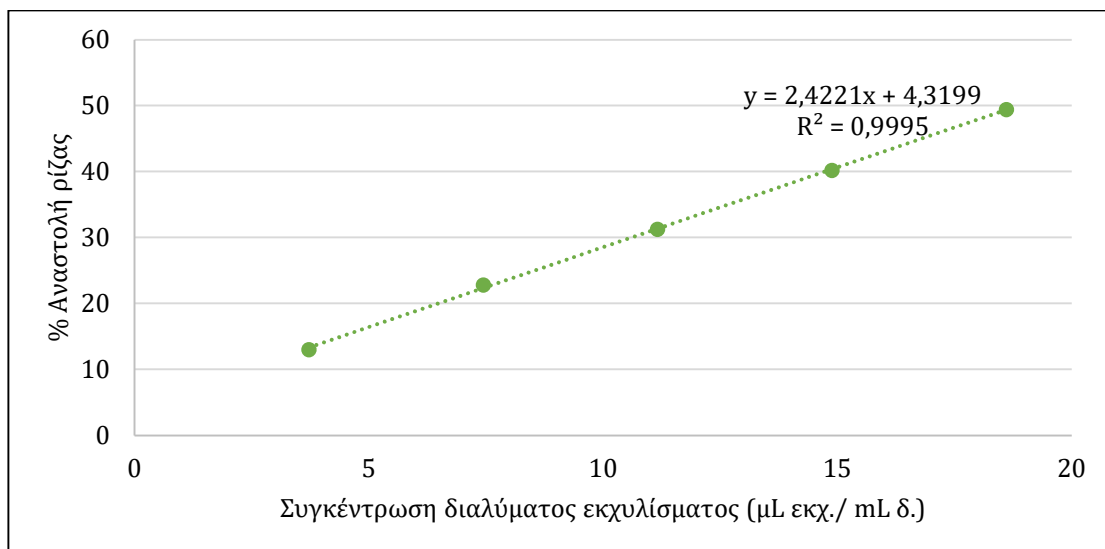
- **Εκχύλισμα GB45** με αρχική συγκέντρωση 0,037 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 58: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB45, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,037 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 21,84 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

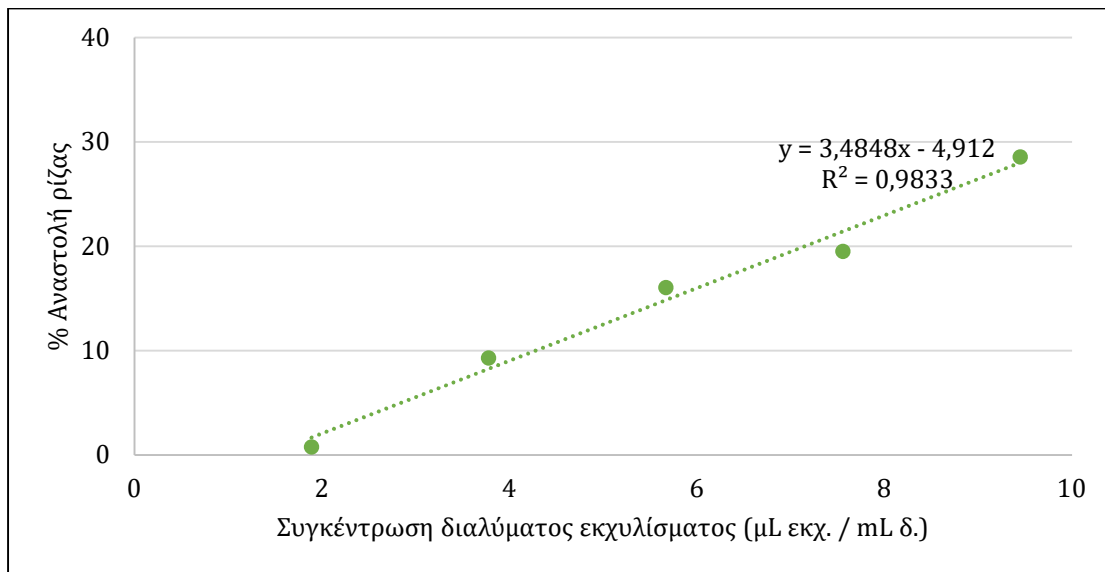
- **Εκχύλισμα GB45** με αρχική συγκέντρωση 0,037 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 59: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB45, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,037 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 18,86 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

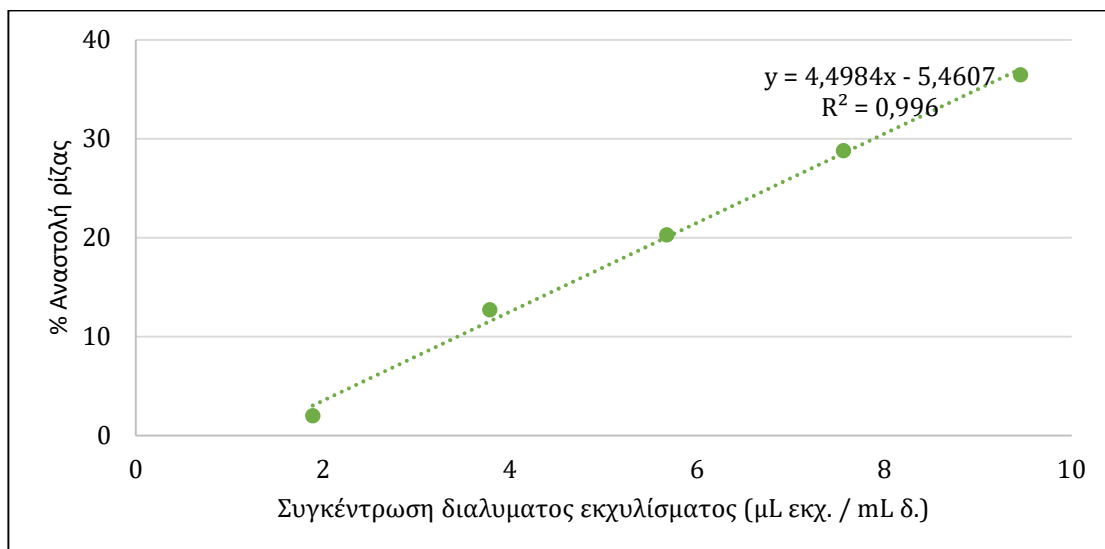
- **Εκχύλισμα GB46** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 60: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB46, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 15,76 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

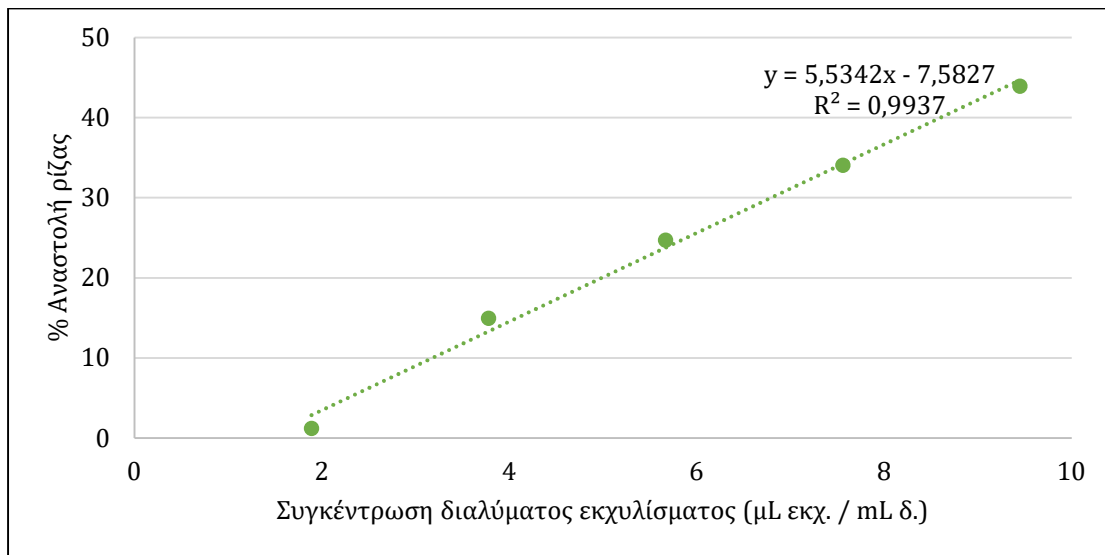
- **Εκχύλισμα GB46** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 61: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB46, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 12,33 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

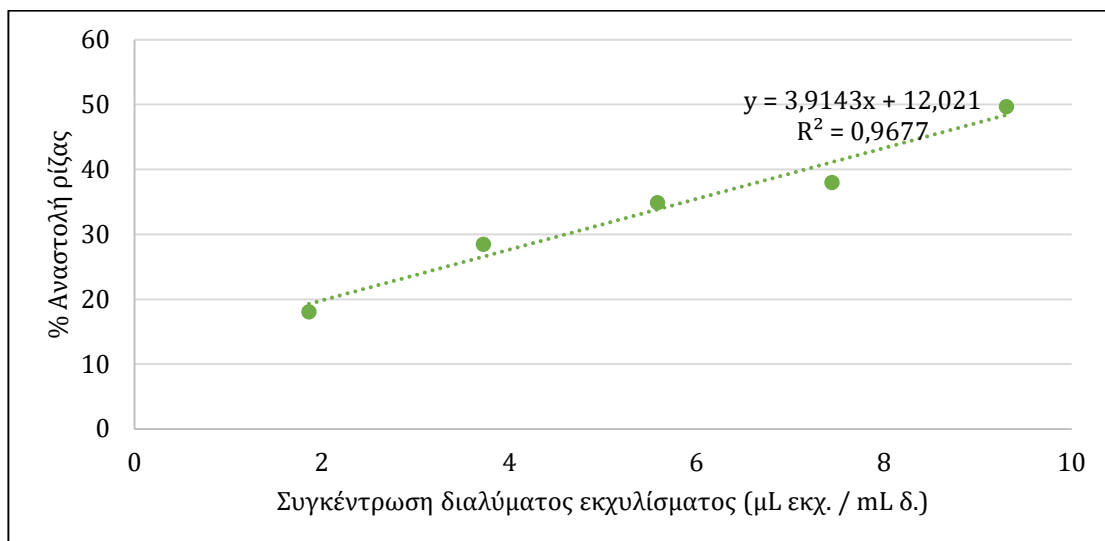
- **Εκχύλισμα GB46** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 62: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB46, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 10,40 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

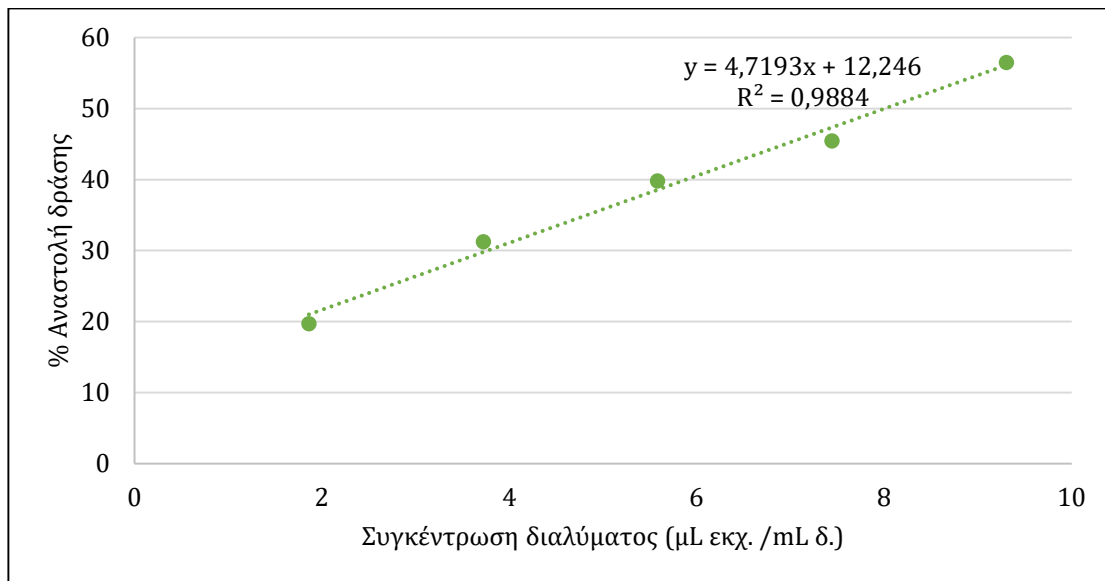
- **Εκχύλισμα GB47** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 63: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB47, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 9,70 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

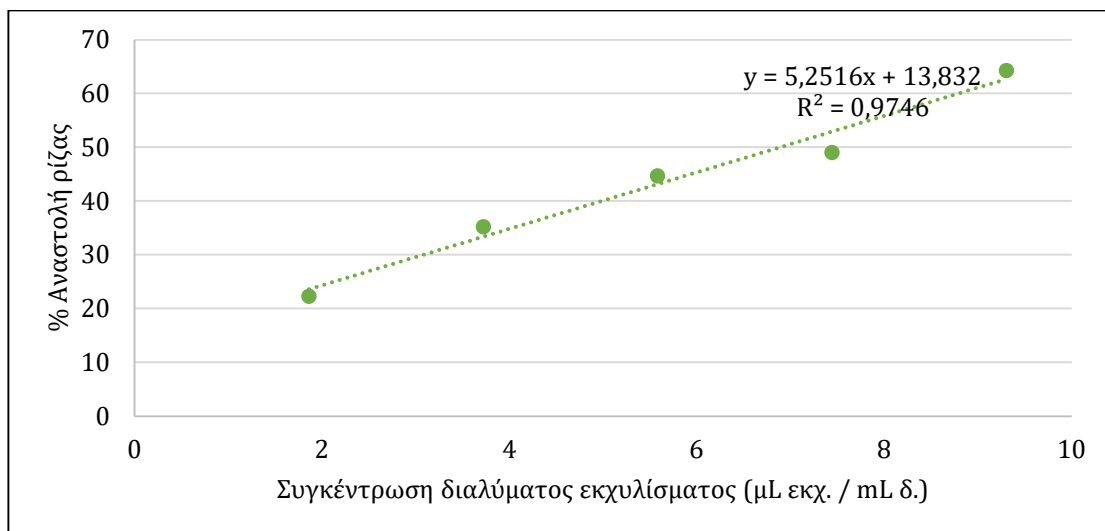
- **Εκχύλισμα GB47** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 64: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB47, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 8,00 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

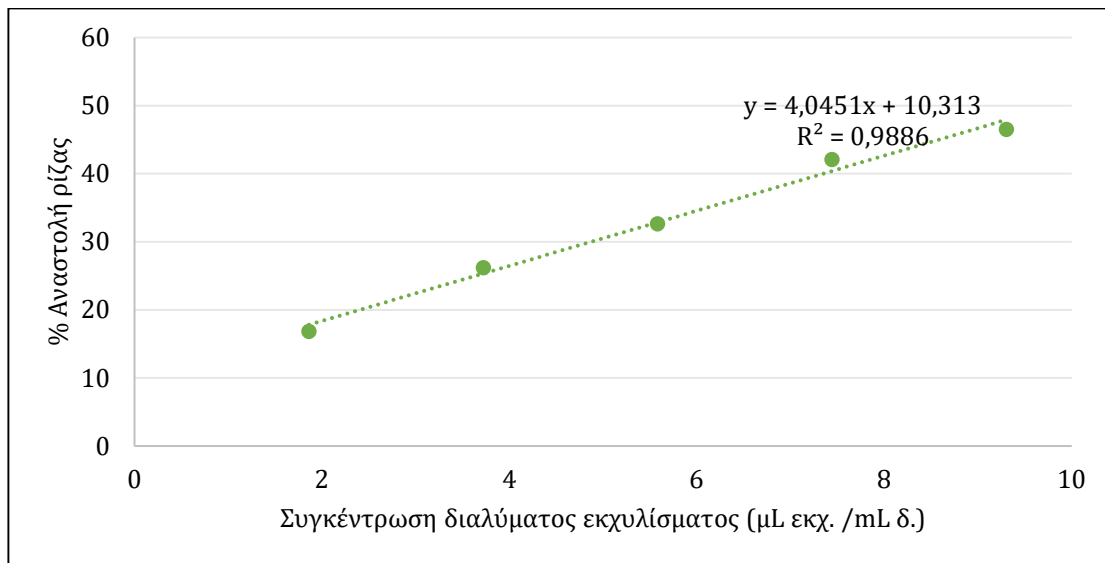
- **Εκχύλισμα GB47** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 65: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB47, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,89 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

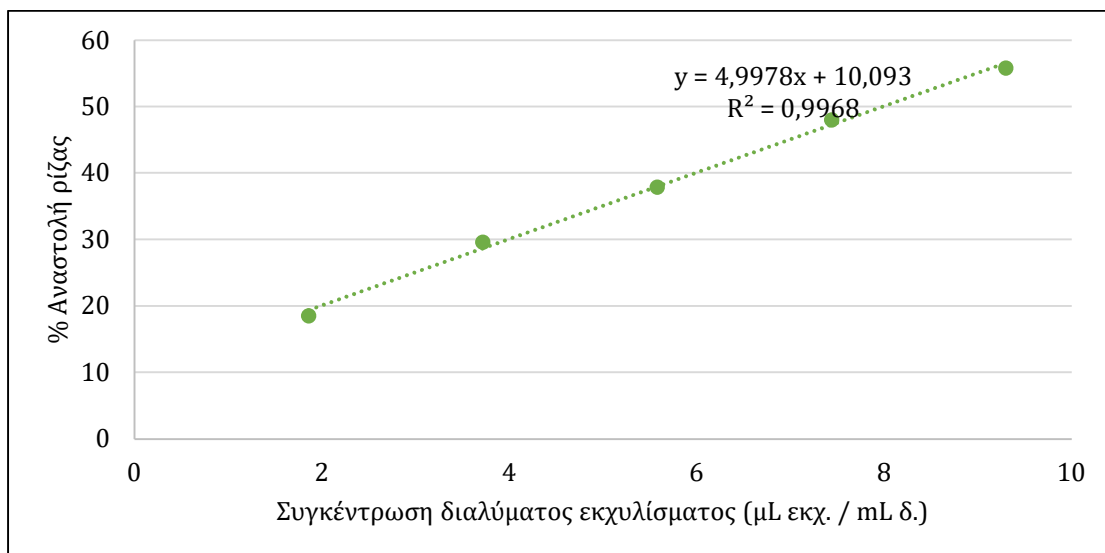
- **Εκχύλισμα GB49** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 66: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB49, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 9,81 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

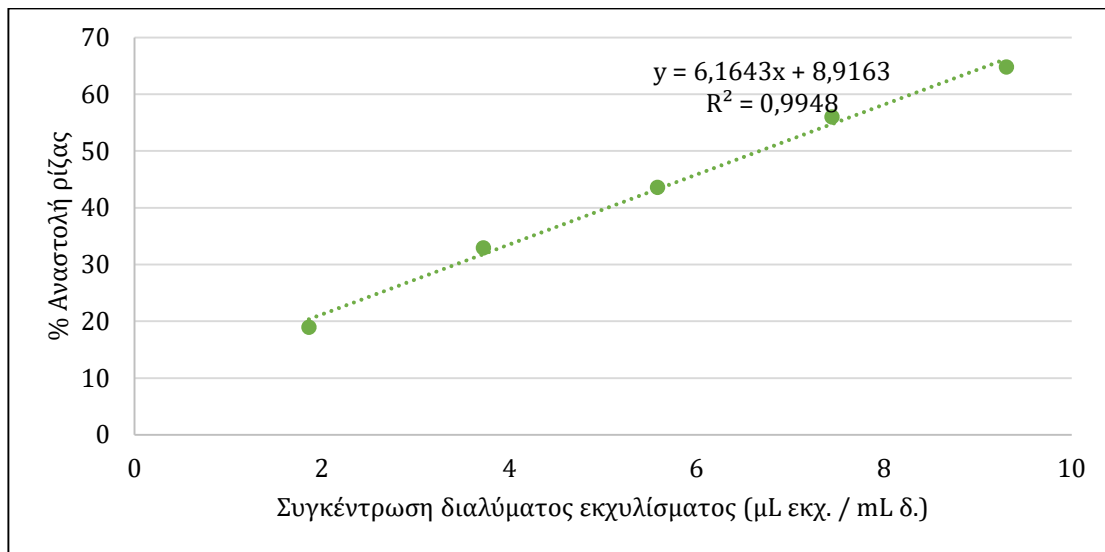
- **Εκχύλισμα GB49** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 67: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB49, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 7,98 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

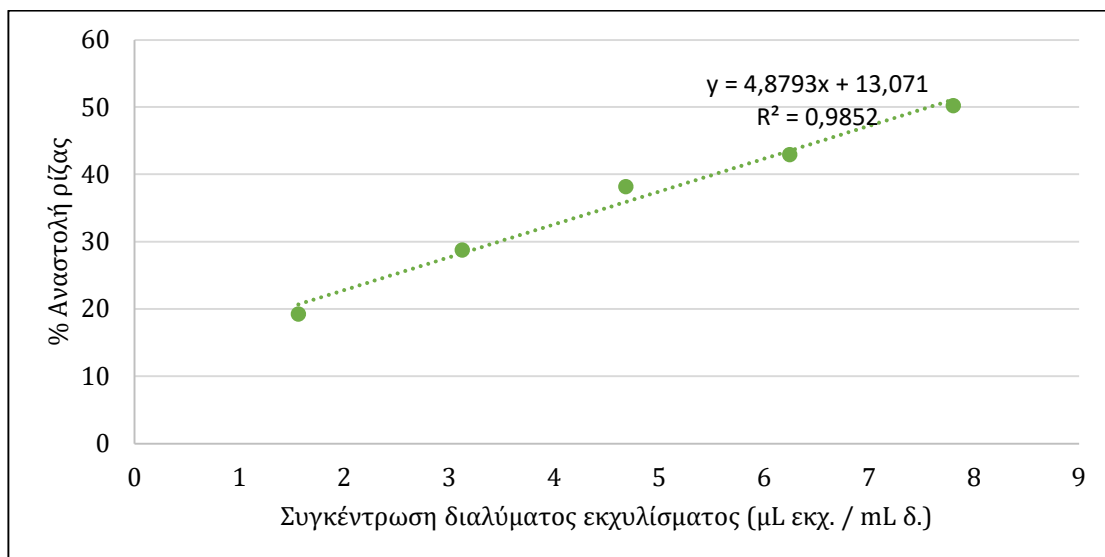
- **Εκχύλισμα GB49** με αρχική συγκέντρωση 0,019 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 68: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB49, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,019 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,66 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

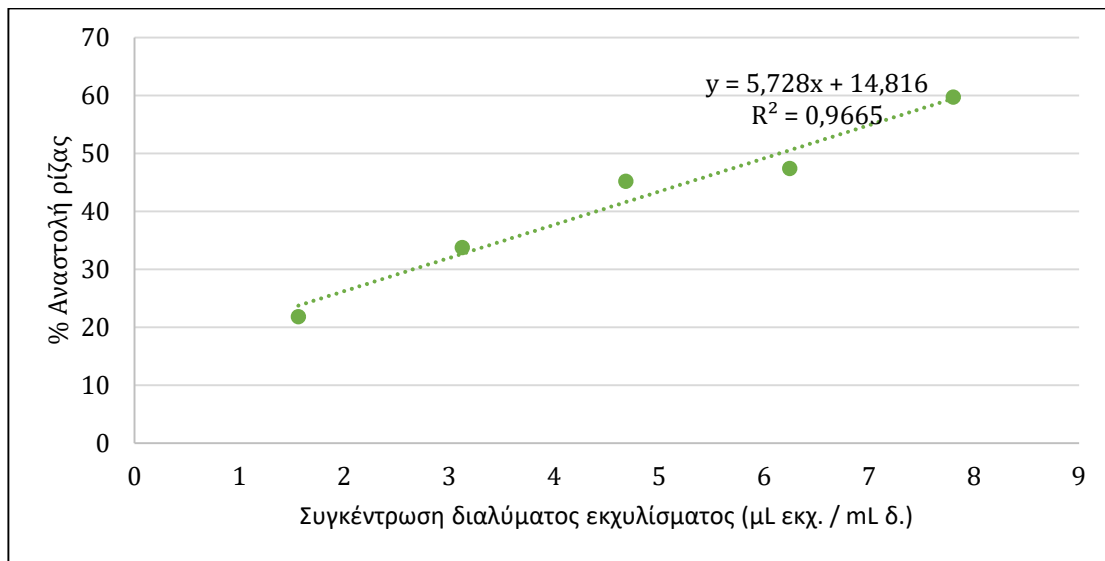
- **Εκχύλισμα GB50** με αρχική συγκέντρωση 0,016 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 69: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB50, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,016 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 7,57 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

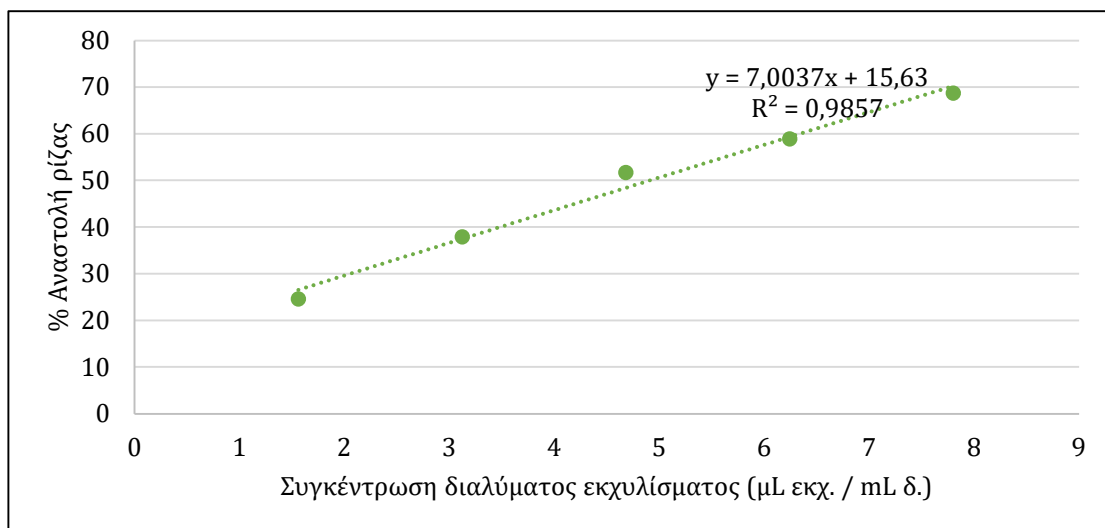
- **Εκχύλισμα GB50** με αρχική συγκέντρωση 0,016 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 70: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB50, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,016 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,14 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

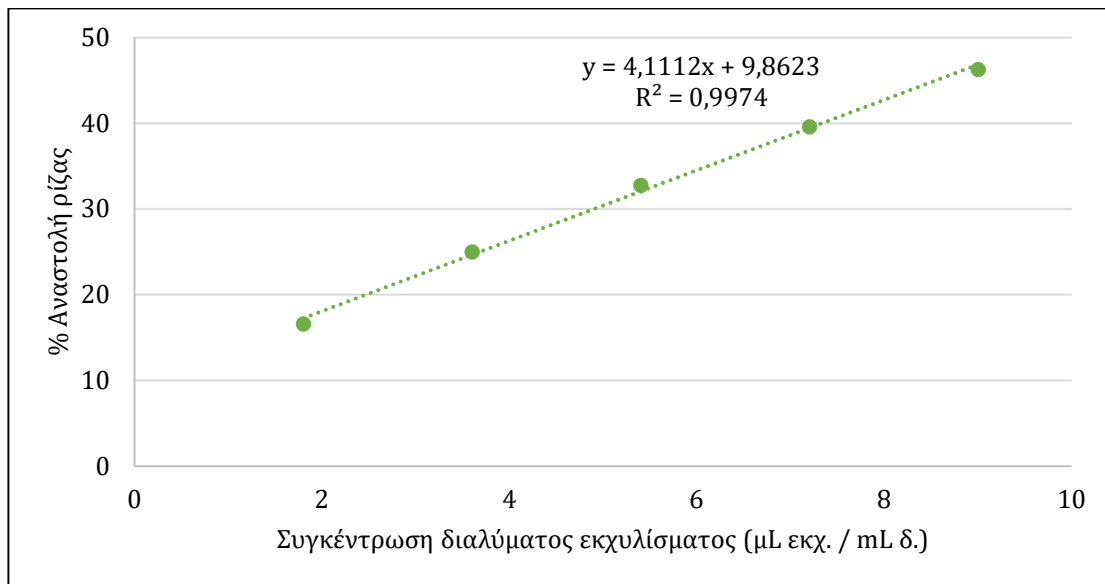
- **Εκχύλισμα GB50** με αρχική συγκέντρωση 0,016 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 71: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB50, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,016 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 4,91 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

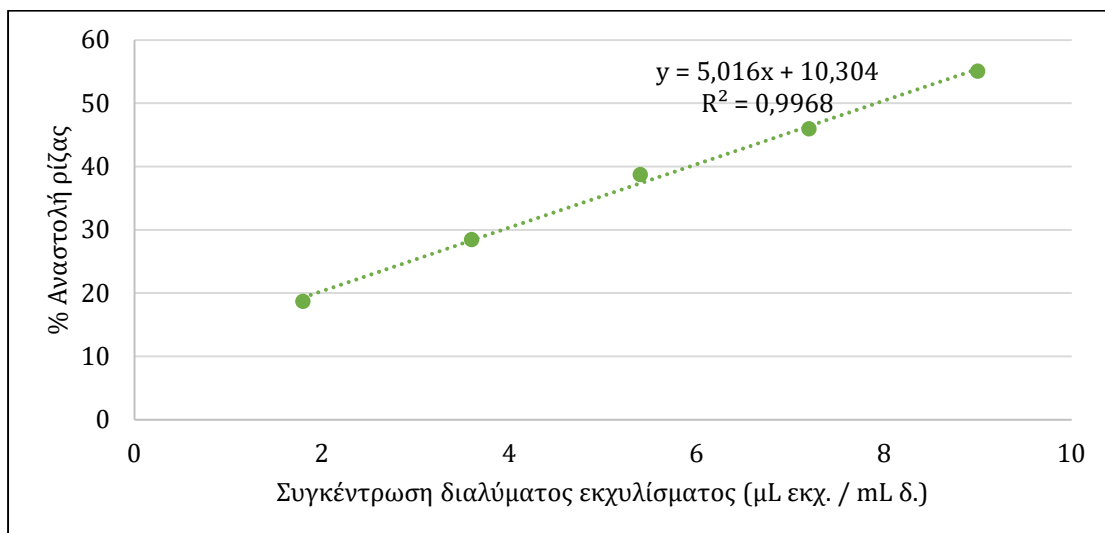
- **Εκχύλισμα GB51** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 72: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 9,76 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

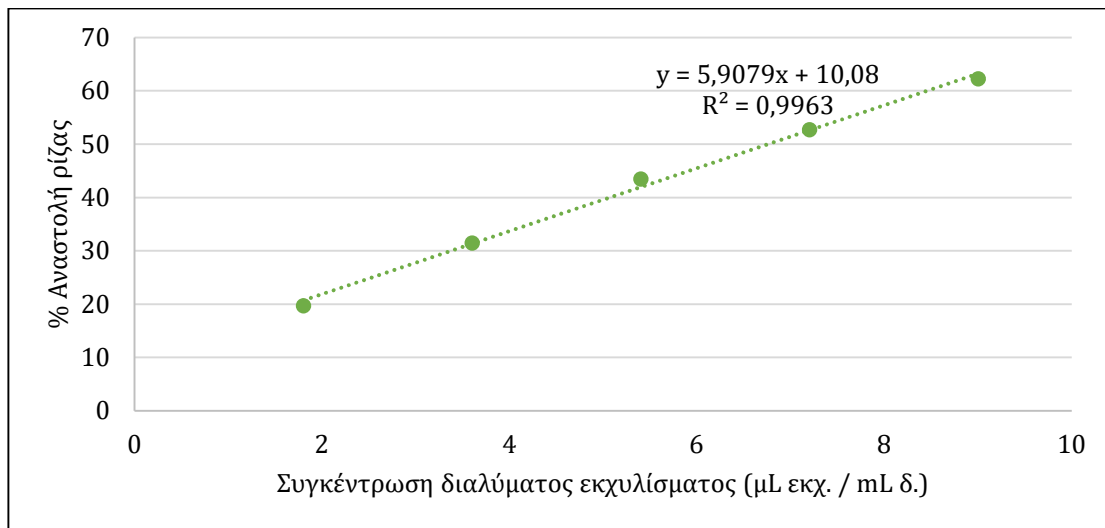
- Εκχύλισμα GB51 με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 73: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 7,91 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

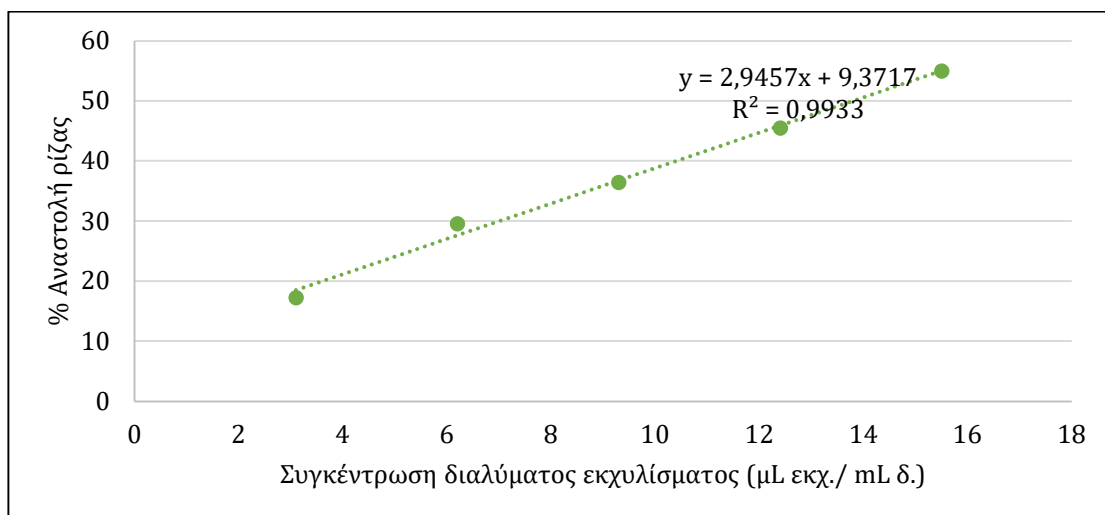
- **Εκχύλισμα GB51** με αρχική συγκέντρωση 0,018 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



Διάγραμμα 74: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB51, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,018 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 6,76 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

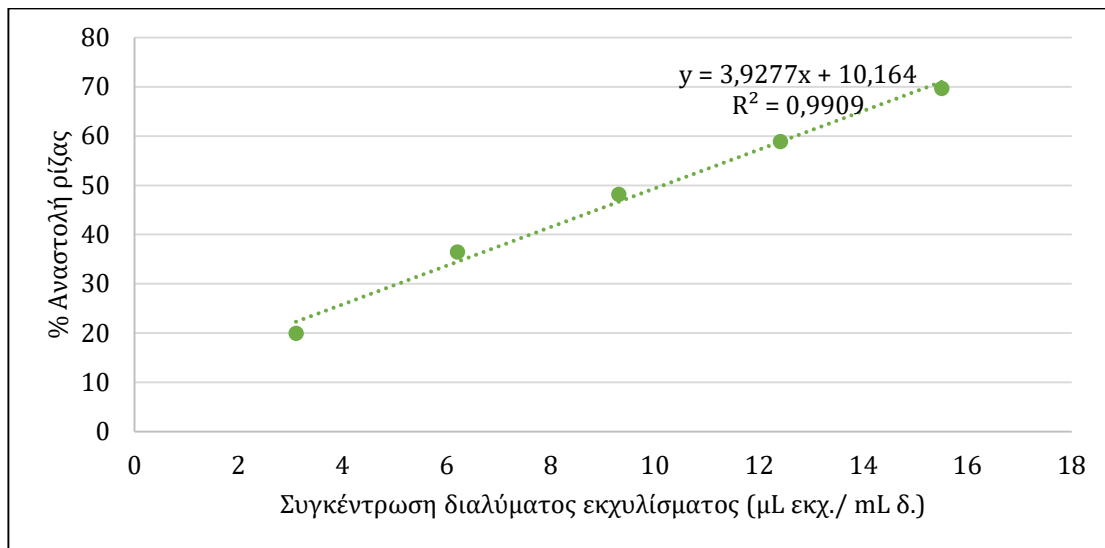
- **Εκχύλισμα GB52** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **15 λεπτά**.



Διάγραμμα 75: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ και χρόνο επώασης 15 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 13,79 μL εκχυλίσματος /mL δείγματος.

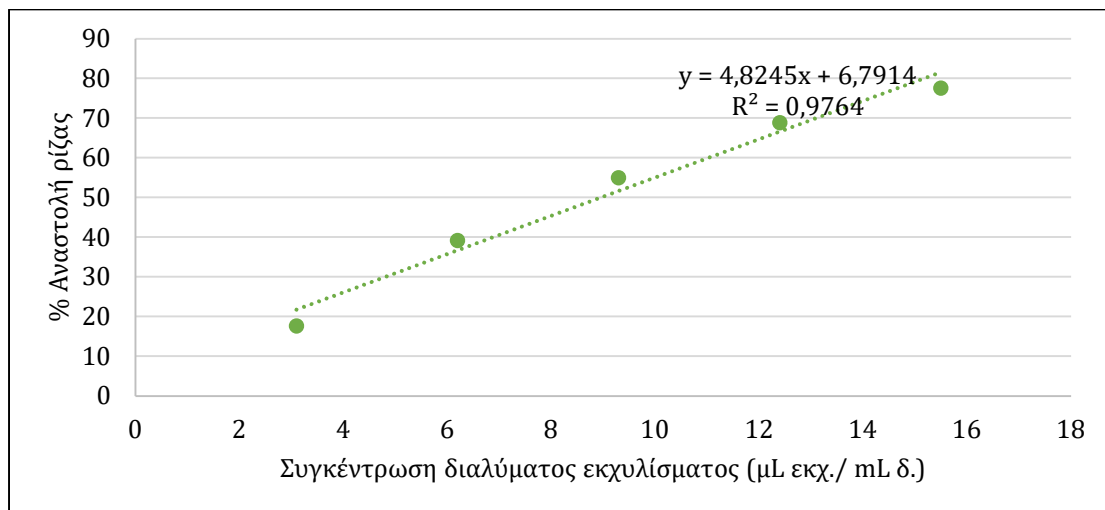
- **Εκχύλισμα GB52** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **30 λεπτά**.



Διάγραμμα 76: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 30 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 10,14 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

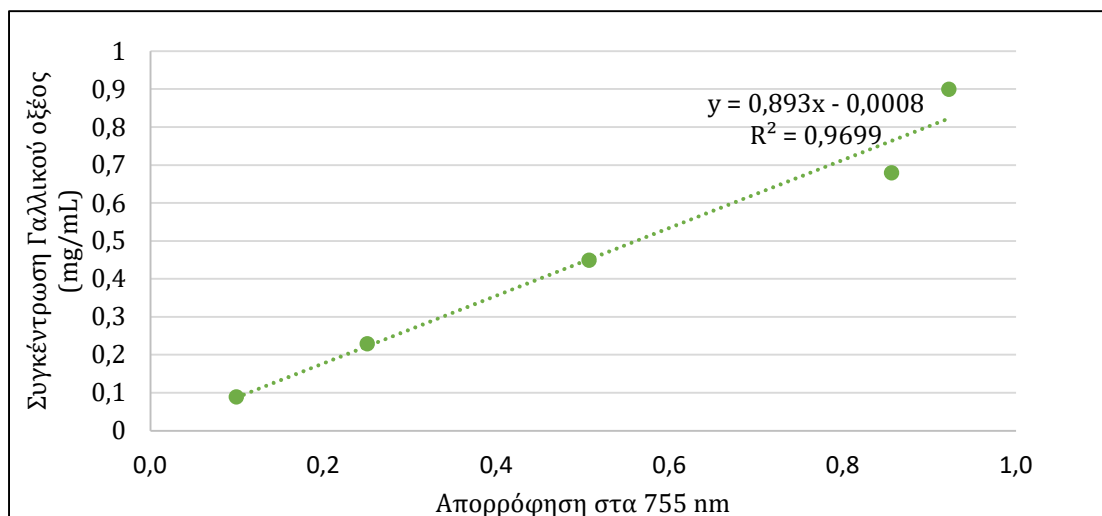
- **Εκχύλισμα GB52** με αρχική συγκέντρωση 0,03 μL εκχυλίσματος/ μL δείγματος και χρόνος επώασης **60 λεπτά**.



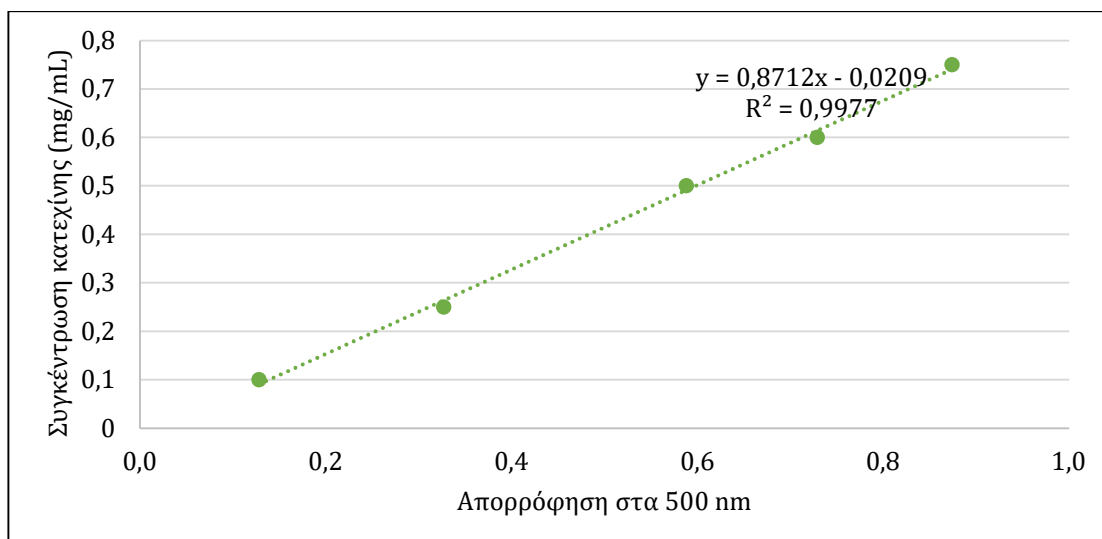
Διάγραμμα 77: Γράφημα της % αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος GB52, για συγκέντρωση stock διαλύματος 0,03 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ και χρόνο επώασης 60 min.

Σύμφωνα με την εξίσωση, η τιμή του IC_{50} προκύπτει ίση με 8,96 μL εκχυλίσματος / mL δείγματος.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς γαλλικού οξέος και κατεχίνης για τον προσδιορισμό της ισοδύναμης συγκέντρωσης και του ολικού περιεχομένου σε φαινολικά και φλαβονοειδή αντίστοιχα.

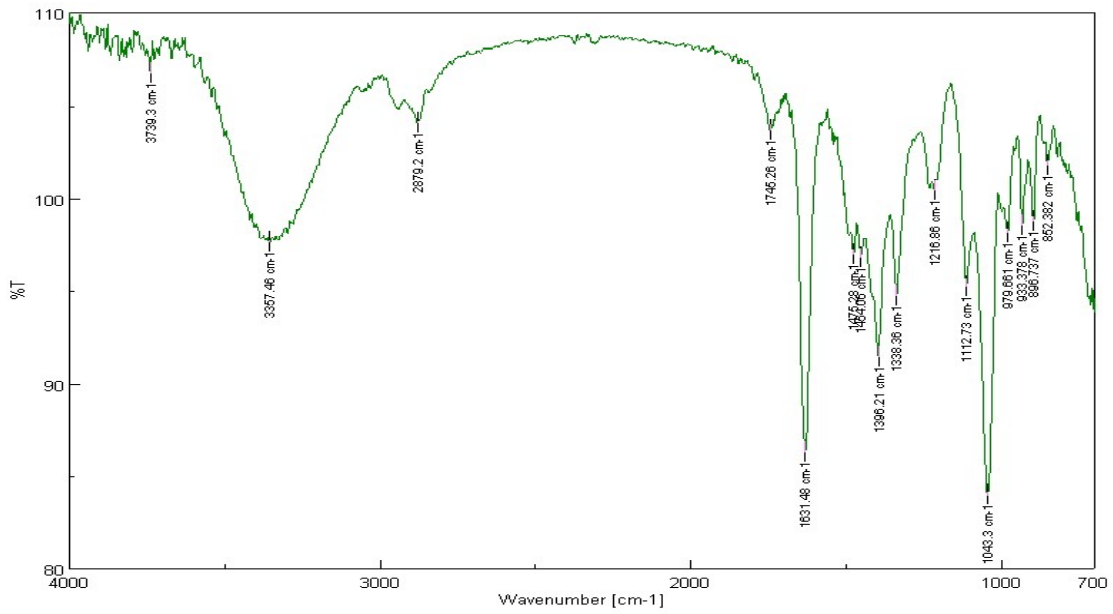


Διάγραμμα 78: Γράφημα της συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος (mg/mL) συναρτήσει της απορρόφησης στα 755 nm.

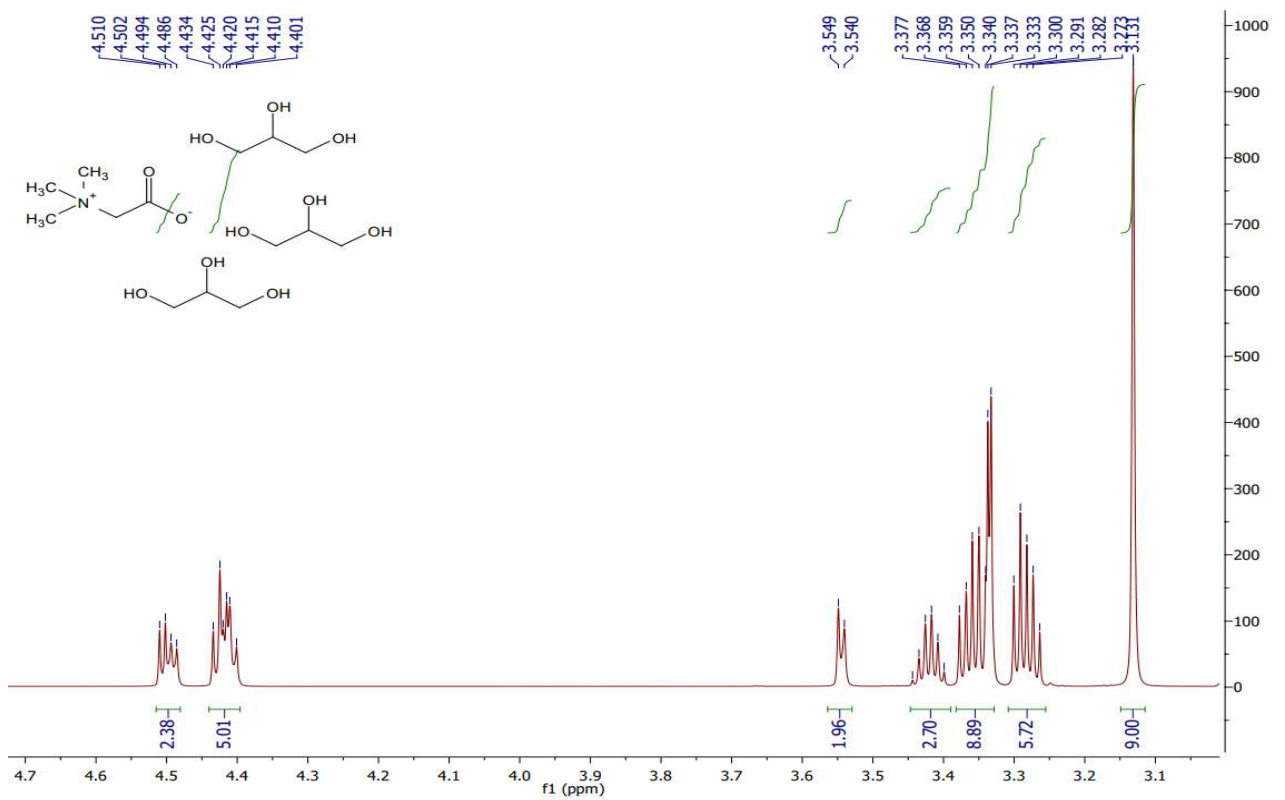


Διάγραμμα 79: Γράφημα της συγκέντρωσης της κατεχίνης (mg/mL) συναρτήσει της απορρόφησης στα 500 nm.

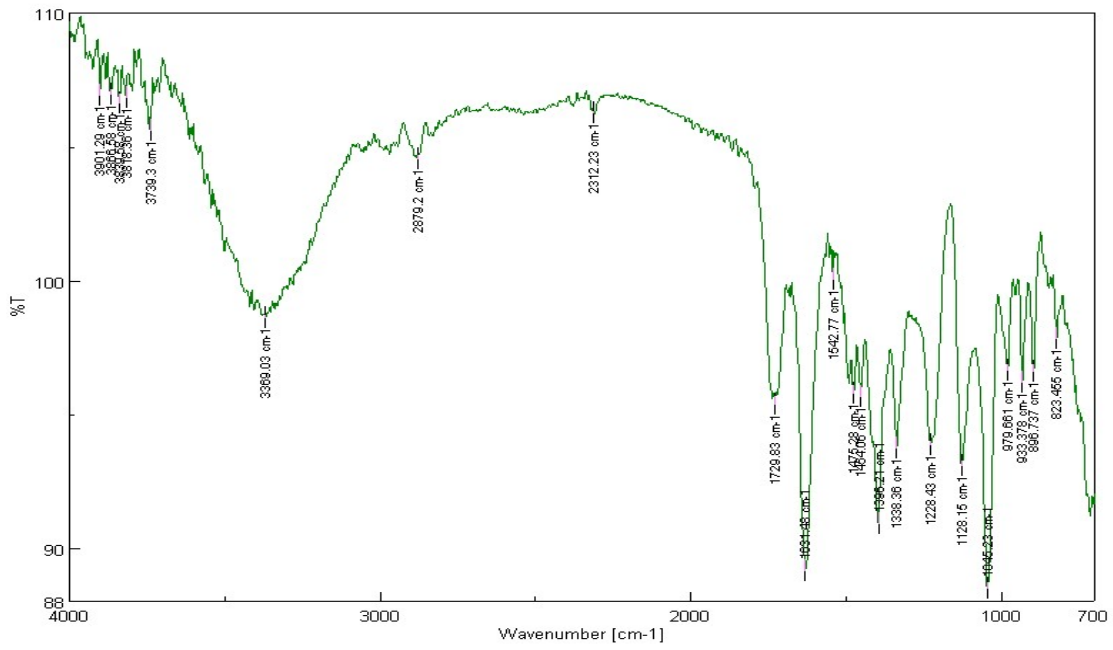
Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR και ^1H NMR των DESs.



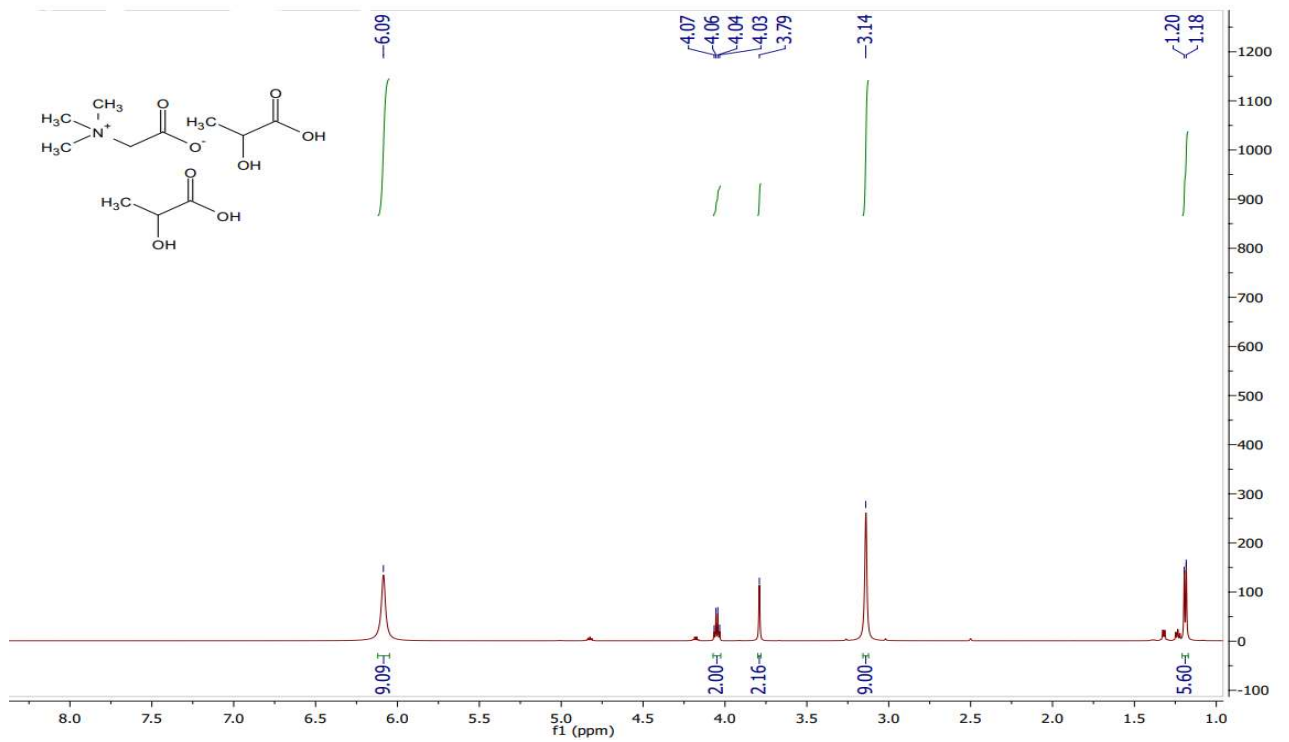
Εικόνα 16: Φάσμα FTIR για το DES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3.



Εικόνα 17: Φάσμα ¹H NMR για το DES βεταΐνη-γλυκερόλη 1:3 (600 MHz, DMSO, d₆).



Εικόνα 18: Φάσμα FTIR για το DES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό 1:2:2,5.



Εικόνα 19: Φάσμα ¹H NMR για το DES βεταΐνη-γαλακτικό οξύ-νερό 1:2:2,5 (600 MHz, DMSO, d₆).