



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, Αθήνα 157 80

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***Ανάπτυξη πράσινης διεργασίας εκχύλισης καρπών  
άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.) και  
αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των  
εκχυλισμάτων.***

**Δέσποινα Μπόμπουλου**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

**Αναστασία Δέτση**

*Καθηγήτρια ΕΜΠ*

**ΑΘΗΝΑ 2022**

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του θέματος αυτής της εργασίας καθώς και την καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της καθώς και με όλη την ομάδα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας συμμετέχοντας στο συγκεκριμένο project. Εξίσου θερμά θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη εκτίμησή και ευγνωμοσύνη μου για την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ανδρομάχη Τζάνη. Χάρη στην πολύτιμη της βοήθεια, καθοδήγηση και χρόνο που αφιέρωσε, η εν λόγω εργασία εκπονήθηκε επιτυχώς. Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπόλοιπη ομάδα του Εργαστηρίου της Οργανικής Χημείας για την άψογη συνεργασία και ηθική υποστήριξη.

## Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το υπάνθιο του καρπού του φαρμακευτικού φυτού *Rosa Canina* L., με χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (Natural Deep Eutectic Solvents - NADES) ως εναλλακτικών πράσινων εκχυλιστικών μέσων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υπό θέρμανση και ανάδευση και στη συνέχεια, το προκύπτον εκχύλισμα χαρακτηρίστηκε ως προς το ολικό του περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content; TPC, Μέθοδος Folin-Ciocalteu) και φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content; TFC, Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου), καθώς και την αντιοξειδωτική του δράση με χρήση της μεθόδου προσδιορισμού δέσμευσης της ρίζας DPPH.

Για την επιλογή του κατάλληλου NADES, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση και στοχευμένη επιλογή των αρχικών συστατικών που απαρτίζουν τον διαλύτη με κριτήρια τη φυσική προέλευση, τη διαθεσιμότητά τους, το χαμηλό κόστος καθώς επίσης και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικά παρασκευασμένου NADES όπως π.χ. το μειωμένο ιξώδες και υψηλή εκχυλιστική ικανότητα. Από τους δύο διαλυτές που παρασκευάστηκαν τελικά επιτυχώς, τον NADES Βεταΐνη- Ουρία-Νερό 1:1:3 (BUW113) και τον NADES Φρουκτόζη-Γλυκερόλη-Νερό 1:1:5 (FGW115), κρίθηκε καταλληλότερος ο FGW115, ο οποίος και εξετάστηκε περαιτέρω στη συνέχεια για τη διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης χρησιμοποιώντας πειραματικό σχεδιασμό. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε η διεξαγωγή εκχύλισεων με χρήση συμβατικών διαλυτών όπως το νερό και το σύστημα αιθανόλης/ νερού, με στόχο την σύγκριση και την επιβεβαίωση της υψηλότερης εκχυλιστικής ικανότητας επιλεγμένων NADES έναντι συμβατικών διαλυτών.

Πριν την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα με μεταβολές στις παραμέτρους του χρόνου, του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη στο εκχυλιστικό μέσο και της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, υπέδειξαν τα όρια των παραμέτρων που θα εφαρμοστούν στον πειραματικό σχεδιασμό (30 και 240 min, 0 και 50% νερό ως συνδιαλύτη, 25 και 135 mg rosehip/ g διαλύτη).

Συνεχίζοντας, με χρήση του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken καθώς και του λογισμικού Design Expert (trial version), μελετήθηκε η επίδραση των προαναφερόμενων παραμέτρων στις μεταβλητές απόκρισης TPC, TFC, αντιοξειδωτική δράση. Από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε έντονη επίδραση της παραμέτρου της μάζας της πρώτης ύλης προς τη μάζα του διαλύτη στις μεταβλητές TPC, αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ σημειώθηκε μεγάλη επίδραση του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη στην περίπτωση του TFC. Συγκεκριμένα, υψηλή αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη φάνηκε να ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση ενώ παράλληλα να μειώνει την τιμή της μεταβλητής TPC. Αντίστοιχα, υψηλό ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη αποδείχτηκε ευεργετικό για την αύξηση της τιμής της μεταβλητής TFC.

Αξιοποιώντας το εν λόγω λογισμικό, εντοπίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ως προς την κάθε μεταβλητή ξεχωριστά αλλά και ως προς το σύνολο. Ως ολικό βέλτιστο (για ταυτόχρονη βελτιστοποίηση και των τριών υπό διερεύνηση παραμέτρων) επιλέχθηκε εκείνο με συνθήκες εκχύλισης: 189,24 min, 50% νερό ως συνδιαλύτη και 96,99 mg rosehip/ g διαλύτη. Τέλος, η εγκυρότητα του εφαρμοσμένου μοντέλου επιβεβαιώθηκε με την διεξαγωγή δύο πειραμάτων ελέγχου.

**Λέξεις-κλειδιά:** *Rosa Canina* L., Πράσινη Χημεία, Εκχύλιση, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES), Πειραματικός Σχεδιασμός, Box-Behnken, Ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), Ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC), Βιοδραστικότητα, Αντιοξειδωτική δράση.

## Abstract

In the present study, the development and optimization of a process for the extraction of bioactive compounds from the hypanthium of the fruit of the medicinal plant *Rosa Canina* L. was examined, using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as alternative green extraction media. Specifically, an extraction was carried out under heating and stirring method and then, the resulting extract was characterized in terms of its total content in phenolic compounds (Total Phenolic Content; TPC, Folin-Ciocalteu Method) and flavonoids (Total Flavonoid Content; TFC, Aluminium Chloride Method) as well as its antioxidant activity using the DPPH scavenging assay method.

For the selection of the appropriate NADES, an investigation and targeted selection of the initial components that make up the solvent was carried out with criteria of natural origin, their availability, low cost as well as the desired characteristics of the finally prepared NADES such as e.g. the reduced viscosity and high extractability. Of the two solvents that were successfully prepared, NADES Betaine-Urea-Water 1:1:3 (BUW113) and NADES Fructose-Glycerol-Water 1:1:5 (FGW115), FGW115 was deemed more suitable and was tested in order to investigate the optimal extraction conditions using an experimental design. Additionally, extractions were performed using conventional solvents such as water and the ethanol/ water system, in order to compare and confirm the higher extractive capacity of selected NADES against conventional solvents.

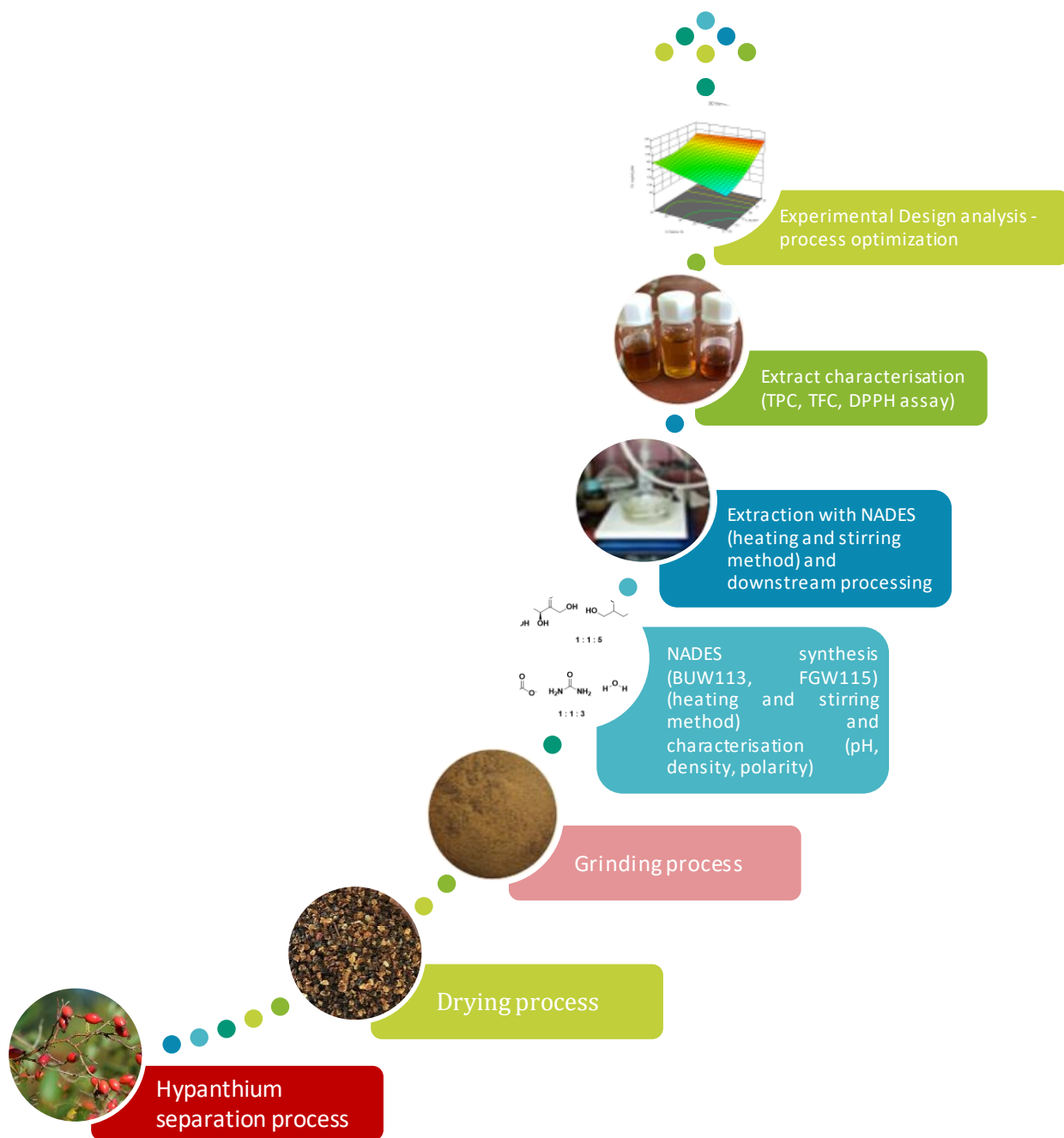
Prior to the implementation of the experimental design, some preliminary experiments were carried out with changes in the parameters of time, the percentage of water as a co-solvent in the extraction medium and the raw material to solvent mass ratio. The results of this study indicated the limits of the parameters which would later be applied in the experimental design (30 and 240 min, 0 and 50% water as co-solvent, 25 and 135 mg rosehip/g solvent).

Continuing, using the Box-Behnken experimental design model as well as the Design Expert software (trial version), the effect of the aforementioned parameters on the response variables TPC, TFC and antioxidant activity was studied. From the results, a strong effect of the raw material mass to solvent mass ratio was observed on the TPC and antioxidant activity variables, while a large effect of water as a co-solvent was noted in the case of TFC. Specifically, a high raw material to solvent mass ratio appeared to favour antioxidant activity while decreasing the value of the TPC variable. Accordingly, a high percentage of water as a co-solvent proved to be beneficial for increasing the value of the TFC variable.

Utilizing the software in question, the optimal conditions for conducting the experiment were identified in terms of each variable as well as in terms of the whole model. The extraction with conditions: 189.24 min, 50% water as a co-solvent and 96.99 mg rosehip/g solvent was chosen as the overall optimum (for simultaneous optimization of all three parameters under investigation). Finally, the validity of the applied model was confirmed by conducting two control experiments.

**Key-words:** *Rosa Canina* L., Green Chemistry, Extraction, Natural Deep Eutectic Solvents (NADES), Experimental Design, Box-Behnken, Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), Bioactivity, Antioxidant activity.

# Graphical Abstract



## Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος .....	16
1.1 Πράσινη Χημεία .....	16
1.2 Άγριο Τριαντάφυλλο.....	17
1.2.1 Φαρμακευτική δράση.....	18
1.2.2 Βιοδραστικές ενώσεις στο φυτό <i>Rosa Canina L.</i> .....	20
1.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης και αξιολόγησης βιοδραστικών ενώσεων .	28
1.2.4 Μέθοδος αξιολόγησης αντιοξειδωτικής δράσης .....	29
1.3 Διεργασία εκχύλισης.....	31
1.3.1 Εκχύλιση καρπών <i>Rosa canina L.</i> .....	31
1.4 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτητες (DESS).....	33
1.5 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADESS).....	35
1.5.1 Μέθοδοι παρασκευής NADES .....	36
1.5.2 Ιδιότητες NADES.....	37
1.5.3 Πλεονεκτήματα NADES.....	41
1.5.4 Περιορισμοί σχετικά με τους NADES και αντιμετώπιση τους.....	42
1.5.5 Εφαρμογές NADES.....	43
1.6 Πειραματικός Σχεδιασμός σε διεργασίες εκχύλισης .....	47
1.6.1 Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (RSM) .....	47
1.6.2 Σχέδιο Box-Behnken.....	48
1.6.3 Παράμετροι εκχύλισης προς μελέτη .....	49
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος .....	50
2.1 Σκοπός.....	50
2.2 Όργανα και συσκευές .....	50
2.3 Αντιδραστήρια και πρώτες ύλες .....	51
2.4 Πειραματική διαδικασία.....	52
2.4.1 Προκατεργασία πρώτης ύλης .....	53
2.4.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός διαλύτη .....	53
2.5 Εκχύλιση υπαινθίου <i>Rosa Canina L.</i> με τη μέθοδο θέρμανσης και ανάδευσης .....	55
2.5.1 Εκχύλιση με σύστημα NADES-νερού ως εκχυλιστικό μέσο .....	55
2.5.2 Εκχύλιση με σύστημα αιθανόλης-νερού ως εκχυλιστικό μέσο .....	55
2.5.3 Εκχύλιση με νερό ως εκχυλιστικό μέσο .....	55



2.6 Χαρακτηρισμός εκχυλίσματος ως προς τη βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση .....	56
2.6.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content; mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος, GAE/ g πρώτης ύλης).....	56
2.6.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC; mg ισοδύναμων κατεχίνης, CATE/ g πρώτης ύλης).58	
2.6.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης.....	60
2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός .....	62
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και συζήτηση .....	64
3.1 Φυσιικοί Βαθέος Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES).....	64
3.1.1 Σύνθεση NADES.....	66
3.1.2 Χαρακτηρισμός διαλυτών BUW113 και FGW115 .....	68
3.2 Προκαταρκτικά πειράματα εκχύλισης με χρήση NADES ως εκχυλιστικό διαλύτη.....	71
3.3 Επιλογή διαλύτη .....	74
3.4 Σύγκριση πράσινης εκχύλισης με χρήση NADES και εκχύλισης με χρήση συμβατικών διαλυτών .....	75
3.5 Πειραματικός Σχεδιασμός .....	77
3.5.1 Οριοθέτηση επιπέδων Box-Behnken .....	77
3.5.2 Ανάλυση ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων (TPC (mg GAE/ g rosehip)).....	86
3.5.3 Ανάλυση ολικής συγκέντρωσης φλαβονοειδών (TFC (mg CATE/ g rosehip)).....	91
3.5.4 Ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης [IC <sub>50</sub> (DPPH) (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)].....	97
3.5.5 Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης.....	105
3.5.6 Επιβεβαίωση μοντέλου.....	107
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα .....	108
4.1 Φυσιικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES).....	108
4.2 Εκχύλιση του υπανθίου του καρπού <i>Rosa Canina L.</i> .....	109
4.3 Πειραματικός Σχεδιασμός .....	109
4.3.1 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων .....	109
4.3.2 Βελτιστοποίηση διεργασίας.....	110
Κεφάλαιο 5: Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	111
Βιβλιογραφία.....	112

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 (αριστερά) Απεικόνιση φυτού Rosa Canina L. [4] Εικόνα 2 (δεξιά) Βοτανική ανατομία του Rosa Canina L. [4] .....	18
Εικόνα 3 Διαχωρισμός σπόρου και υπανθίου από τον καρπό του Rosa Canina L. [4] .....	18
Εικόνα 4 Γενικευμένη δομή φλαβονοειδών .....	24
Εικόνα 5 Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών .....	25
Εικόνα 6 Αντίδραση χλωριούχου αργιλίου με κερσετίνη παρουσία $\text{NaNO}_2$ [20] .....	29
Εικόνα 7 Μηχανισμός αντίδρασης ρίζας DPPH [15] .....	30
Εικόνα 8 Διάγραμμα φάσης δύο συστατικών που εκπροσωπεί το ευτηκτικό σημείο [30] .....	37
Εικόνα 9 Απεικόνιση ευτηκτογένεσης ενός NADES [29] .....	39
Εικόνα 10 Απεικόνιση διάλυσης φαινολικής ένωσης κερσετίνης σε DES αποτελούμενο από χολίνη και γαλακτικό οξύ (Ch-DES) [35] .....	40
Εικόνα 11 Αναπαράσταση ενός κλασσικού σχεδίου Box-Behnken για 3 παράγοντες [39] .....	48
Εικόνα 12 Αποξηραμένο υπάνθιο του R.Canina Εικόνα 13 Υπάνθιο του R. Canina σε μορφή πούδρας .....	53
Εικόνα 14 Πλακέτα φασματομετρικής μεθόδου δέσμευσης ρίζας DPPH; Σειρά A: τυφλό δείγμα αποτελούμενο από το αντιδραστήριο DPPH (A1-3) καθώς και DPPH/ Νερό (50-50) (A4-6). Σειρές C-E: stock εκχυλισμάτων .....	61

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1 Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας .....	16
Σχήμα 2 Μίγματα χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης .....	34
Σχήμα 3 Χρονική εξέλιξη των πράσινων διαλυτών .....	36
Σχήμα 4 Πλεονεκτήματα NADES .....	42
Σχήμα 5 Μοριακή δομή συστατικών του BUW113 .....	53
Σχήμα 6 Μοριακή δομή συστατικών του FGW115 .....	54

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.....	57
Διάγραμμα 2 Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.....	59
Διάγραμμα 3 Διάγραμμα ποσοστού NADES στο σύστημα NADES-νερό συναρτήσει του pH για τον διαλύτη BUW113 .....	69
Διάγραμμα 4 Διάγραμμα ποσοστού NADES στο σύστημα NADES-νερό συναρτήσει του pH για τον διαλύτη FGW115.....	70
Διάγραμμα 5 Διάγραμμα TPC συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	78
Διάγραμμα 6 Διάγραμμα TFC συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	78
Διάγραμμα 7 Διάγραμμα IC <sub>50</sub> συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	79
Διάγραμμα 8 Διάγραμμα TPC συναρτήσει του ποσοστού το νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	80
Διάγραμμα 9 Διάγραμμα TFC συναρτήσει του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	81
Διάγραμμα 10 Διάγραμμα IC <sub>50</sub> συναρτήσει του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	81
Διάγραμμα 11 Διάγραμμα TPC συναρτήσει της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	83
Διάγραμμα 12 Διάγραμμα TFC συναρτήσει της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	83
Διάγραμμα 13 Διάγραμμα IC <sub>50</sub> (DPPH, 15 min) συναρτήσει της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσσεις.....	84
Διάγραμμα 14 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών TPC για κάθε πείραμα που διεξήχθη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.....	86
Διάγραμμα 15 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στην μεταβλητή TPC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους B, C.....	89
Διάγραμμα 16 Τρισδιάστατο διάγραμμα της επίδρασης των παραμέτρων %νερού ως συνδιαλύτη και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης/μάζα διαλύτη στην μεταβλητή TPC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για την παράμετρο A.....	90
Διάγραμμα 17 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα των τιμών TFC για κάθε πείραμα που διεξήχθη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.....	91
Διάγραμμα 18 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του χρόνου στην μεταβλητή απόκρισης TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους B, C.....	94
Διάγραμμα 19 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη στην μεταβλητή TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους A, C.....	95

Διάγραμμα 20 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στη μεταβλητή TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις μεταβλητές A, B.....	96
Διάγραμμα 21 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών μεταβλητής IC <sub>50</sub> (DPPH) για το κάθε πείραμα σε χρόνους 15, 30 και 60 λεπτά επώασης των εκχυλισμάτων .....	98
Διάγραμμα 22 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών της μεταβλητής IC <sub>50</sub> κατά τον πειραματικό σχεδιασμό για χρόνο επώασης εκχυλίσματος ίσο με 15 min.....	100
Διάγραμμα 23 Τρισδιάστατο διάγραμμα επίδρασης των παραμέτρων χρόνου και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στο μηδενικό σημείο της παραμέτρου B.....	103
Διάγραμμα 24 Τρισδιάστατο διάγραμμα επίδρασης των παραμέτρων %νερού ως συνδιαλύτη και αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στο μηδενικό σημείο της παραμέτρου A.....	104

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Ιστορικά καταγεγραμμένες θεραπευτικές χρήσεις του φυτού <i>Rosa Canina</i> L. [4] .....	19
Πίνακας 2 Θεραπευτική σύνθεση σπόρων και ελαίων του τριανταφύλλου <i>Rosa Canina</i> L. [4].....	21
Πίνακας 3 Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων στα φυτά [11] .....	23
Πίνακας 4 Ενδεικτική σύσταση <i>Rosa Canina</i> L. σε φαινολικές ενώσεις [14,17] .....	27
Πίνακας 5 Παραδείγματα αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	29
Πίνακας 6 Παραδείγματα συμβατικών και μη εκχυλίσεων .....	31
Πίνακας 7 Κύριες κατηγορίες DES [30,31].....	34
Πίνακας 8 Περιορισμοί σχετικά με τους NADES και επίλυση τους .....	43
Πίνακας 9 Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων .....	50
Πίνακας 10 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων .....	51
Πίνακας 11 Πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ...	52
Πίνακας 12 Ορισμός παραμέτρων προς μελέτη και μεταβλητών απόκρισης κατά τον πειραματικό σχεδιασμό.....	62
Πίνακας 13 Ορισμός επιπέδων πειραματικού σχεδιασμού.....	62
Πίνακας 14 Συνοπτικός πίνακας πειραμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού σε κωδικοποιημένη και μη μορφή .....	63
Πίνακας 15 Παρασκευές NADES .....	65
Πίνακας 16 Συστατικά του διαλύτη BUW113 .....	66
Πίνακας 17 Συστατικά του διαλύτη FGW115 .....	68
Πίνακας 18 Χαρακτηρισμός διαλυτών BHW113 & FGW115 στους 25 ° C.....	68
Πίνακας 19 Πίνακας τιμών pH για διάφορα ποσοστά του NADES στο σύστημα NADES-νερό για τον διαλύτη BUW113.....	69
Πίνακας 20 Πίνακας τιμών pH για διάφορα ποσοστά του NADES στο σύστημα NADES-νερό για τον διαλύτη FGW115 .....	70
Πίνακας 21 Σύγκριση διαλυτοχρωμικών μεθόδων Reichardt και Ερυθρού του Νείλου για τους διαλύτες αιθανόλη και FGW115 .....	71
Πίνακας 22 Τιμές TFC, TPC των προκαταρκτικών εκχυλίσεων με διαλύτη το BUW113	72
Πίνακας 23 Τιμές TFC, TPC των προκαταρκτικών εκχυλίσεων με διαλύτη το FGW115	72
Πίνακας 24 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθήκες εκχύλισης 0%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης και 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη.....	73
Πίνακας 25 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθήκες εκχύλισης 25%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης, 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη.....	73
Πίνακας 26 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθηκές εκχύλισης 25%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης, 75 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη.....	74

Πίνακας 27 Σύγκριση συμβατικών διαλυτών και NADES ως προς την βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων .....	75
Πίνακας 28 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115 .....	77
Πίνακας 29 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές του ποσοστού νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115 .....	80
Πίνακας 30 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115 .....	82
Πίνακας 31 Αποτελέσματα των 17 οριοθετημένων πειραμάτων σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό.....	85
Πίνακας 32 Επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC.....	87
Πίνακας 33 Πίνακας ANOVA του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC.....	87
Πίνακας 34 Πίνακας προσαρμογής μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC .....	88
Πίνακας 35 Επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC.....	92
Πίνακας 36 Πίνακας ANOVA του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC.....	92
Πίνακας 37 Πίνακας προσαρμογής του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC.....	92
Πίνακας 38 Αποτελέσματα της τιμής IC <sub>50</sub> (DPPH) κατά τον πειραματικό σχεδιασμό 15, 30 και 60 min αντίστοιχα μετά την προσθήκη της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα.....	97
Πίνακας 39 Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων εκχύλισης με FGW115, 15 λεπτά μετά την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH.....	99
Πίνακας 40 Επιλογή του κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής απόκρισης IC <sub>50</sub> (15 min).....	101
Πίνακας 41 Πίνακας ANOVA του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής IC <sub>50</sub> (DPPH, 15 min).....	101
Πίνακας 42 Πίνακας προσαρμογής του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής IC <sub>50</sub> (DPPH, 15 min).....	102
Πίνακας 43 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης TPC.....	105
Πίνακας 44 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης TFC.....	105
Πίνακας 45 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης IC <sub>50</sub> (DPPH, 15 min) .....	106
Πίνακας 46 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για ολική βελτιστοποίηση του συστήματος.....	107
Πίνακας 47 Επιβεβαίωση μοντέλου από το λογισμικό Design Expert .....	107

## Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Ονομασία	Μεταφρασμένη ονομασία
DES	Deep Eutectic Solvent	Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
ILs	Ionic liquids	Ιοντικά Υγρά
NADES	Natural Deep Eutectic Solvent	Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
EtOH	Ethanol	Εθανόλη
BUW113	Betaine: Urea: Water (1:1:3)	Βεταΐνη: Ουρία: Νερό (1:1:3)
FGW115	Fructose: Glycerol: Water (1:1:5)	Φρουκτόζη: Γλυκερόλη: Νερό (1:1:5)
HBA	Hydrogen Bond Acceptor	Δέκτης Δεσμών Υδρογόνου
HBD	Hydrogen Bond Donnor	Δότης Δεσμών Υδρογόνου
GRAS	Generally Regarded as Safe	Γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές
PUFAs	Polyunsaturated fatty acid	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
HBAs	Hydroxybenzoic acids	Υδροβενζοϊκά οξέα
HCAs	Hydroxycinnamic acids	Υδροκυανικά οξέα
TPC	Total Phenolic Content	Ολική περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις
TFC	Total Flavonoid Content	Ολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή
IC <sub>50</sub>	Half maximal Inhibitory Concentration	Μισή μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση
GAE	Gallic Acid Equivalents	Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος
CATE	Catechin Equivalents	Ισοδύναμα Κατεχίνης
BDE	Bond Dissociation Energy	Ενέργεια διάστασης δεσμού
IP	Ionization Potential	Δυναμικό Ιοντισμού
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography with UV detection methods	Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με μεθόδους Ανίχνευσης Υπεριώδους
DCS	Differential Calorimetry Scanning	Ανάλυση Θερμιδομετρίας Διαφορικής Σάρωσης
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζα
F-C	Folin - Ciocalteu	-
TAC	Total Antioxidant Capacity	Συνολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα
SET	Single-Electron Transfer	Μεταφορά Ενός Ηλεκτρονίου
HAT	Hydrogen Atom Transfer	Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου



DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ
SFE	Supercritical fluid extraction	Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού
RSM	Response Surface Methodology	Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης
DE	Design Expert	-
stdev	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση

# Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Πράσινη Χημεία

Η Πράσινη Χημεία, γνωστή και ως Βιώσιμη Χημεία, αποτελεί έναν νέο και πολλά υποσχόμενο κλάδο στον τομέα της χημείας και χημικής μηχανικής. Ο όρος αυτός προέκυψε από έναν συνδυασμό ήδη διαμορφωμένων ιδεών και ερευνών κοντά στη δεκαετία του 1990, χάρη στην αναρριχόμενη ανησυχία σχετικά με τη χημική ρύπανση και εξάντληση των πόρων. Πρόκειται για έναν κλάδο που επικεντρώνεται στο περιβαλλοντικό αντίκτυπο που μπορεί να έχει η χημεία όπως για παράδειγμα την κατανάλωση μη ανανεώσιμων πηγών πρώτων υλών καθώς και την αυξανόμενη ρύπανση. Στοχεύοντας την ελαχιστοποίηση των εν λόγω επιπτώσεων, η Πράσινη Χημεία εστιάζει στο σχεδιασμό νέων προϊόντων, διαλυτών και διεργασιών που περιορίζουν τις ρυπογόνες απεκκρίσεις, το κόστος παραγωγής και ενέργειας καθώς και τον κίνδυνο διαχείρισης άστατων χημικών. Το 1998, οι P. Anastas και J. C. Warner δημοσίευσαν ένα σύνολο αρχών το οποίο πρεσβεύει τους προαναφερόμενους στόχους, γνωστό και ως οι Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας. Στο Σχήμα 1, συγκεντρώνονται συνοπτικά οι 12 αυτοί πυλώνες, οι οποίοι καθοδηγούν πλέον ένα μεγάλο εύρος σύγχρονων χημικών διεργασιών [1].

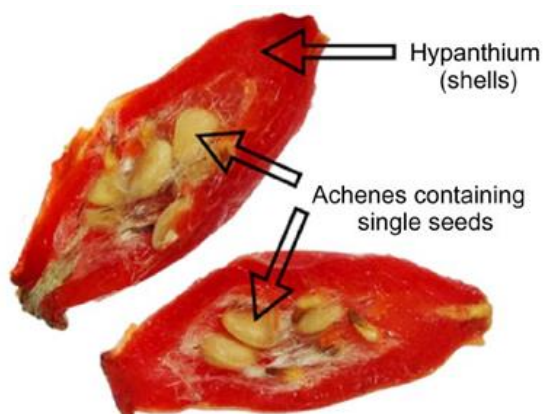


Σχήμα 1 Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας

## 1.2 Άγριο Τριαντάφυλλο

Τα τελευταία χρόνια, έχει εμφανιστεί αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση ασυνήθιστων φυτικών ελαίων στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών [2]. Συγκεκριμένα, πολλές βιομηχανίες πλέον επικεντρώνονται σε έλαια ψυχρής έκθλιψης (cold pressed oils), χαρακτηριζόμενα από την υψηλή διατροφική τους αξία και τα οφέλη για την υγεία φυτοχημικά συστατικά τους. Πρόκειται για έλαια πλούσια σε πολύτιμα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, τοκοφερόλες, στερόλες, καροτενοειδή και αντιοξειδωτικές φαινολικές ενώσεις [2].

Ανεκμετάλλευτη πηγή ενός τέτοιου ελαίου αποτελούν οι σπόροι τριανταφυλλιάς. Πρόκειται για απόβλητα κατά τις διεργασίες παραγωγής τσαγιού, μαρμελάδας, χυμών και φαρμακευτικών προϊόντων από τριανταφυλλιές [2]. Μεταξύ των διαφόρων ειδών τριανταφυλλιών, πιο ευρέως διαδεδομένα στην αγορά είναι τα έλαια αντλούμενα από τους σπόρους των *Rosa canina* L. και *R. rubiginosa* L., τα οποία συνιστώνται για φαρμακευτικούς, καλλυντικούς και διατροφικούς σκοπούς [2]. Αναφορικά με το *Rosa canina* L., γνωστό και ως «ψευδοφρούτο» ή «τριαντάφυλλο σκύλου» ("*Cynosbati fructus*"), αποτελεί έναν άγριο θάμνο που εντοπίζεται στην Ευρώπη, τη βορειοδυτική Αφρική και τη δυτική Ασία [3,4,5]. Θεωρείται ότι εξελίχθηκε την τελευταία ευρωπαϊκή μεταπαγετώδη περίοδο από ένα διαφορετικό γένος ανάπτυξης αγριοτριανταφυλλιάς *Rosa spp.* και ένα εξαφανισμένο προγονικό "*Protocaninae*" [4]. Το φυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά ως φαρμακευτικό μέσον από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (23–79 π.Χ.), ο οποίος το χρησιμοποίησε σε γαλλικές φυλές ως θεραπεία σε τραύματα έπειτα από δάγκωμα σκύλου. Από αυτή την χρήση προέκυψε στη συνέχεια και το όνομα του είδους (*R. canina*) [4]. Οι τριανταφυλλιές *R. canina* αποτελούν φαρμακευτικό φυτό με βάρος που κυμαίνεται από 1,25 έως 3,25 g, εκ των οποίων το 71% αποτελεί το περικάρπιο ενώ περίπου το 29% τον σπόρο [6]. Πρόκειται για καρπούς αποτελούμενους από πολλά αχαιίνια, τα οποία με τη σειρά τους περικλείονται από το υπάνθιο. Συγκεκριμένα, τα αχαιίνια χαρακτηρίζονται ως οι πραγματικοί βοτανικοί καρποί των τριαντάφυλλων, στις λεπτές μεμβράνες των οποίων εμπεριέχονται μεμονωμένοι οι σπόροι τριανταφυλλιάς. Αντιθέτως, το υπάνθιο είναι ένα διευρυμένο, κόκκινο, σαρκώδες κέλυφος το οποίο στην πραγματικότητα δεν αποτελεί μέρος του βοτανικού φρούτου. Το συνολικό φρούτο, συμπεριλαμβανομένων του υπανθίου και των αχαινιών, χαρακτηρίζεται ως «ψευδοφρούτο» [4]. Στα παρακάτω παραρτήματα απεικονίζεται το εν λόγω φυτό ως σύνολο αλλά και σε αναλυτική περιγραφή της δομής του.



Εικόνα 1 (αριστερά) Απεικόνιση φυτού *Rosa Canina* L. [4] Εικόνα 2 (δεξιά) Βοτανική ανατομία του *Rosa Canina* L. [4]



Seeds

Shells

Εικόνα 3 Διαχωρισμός σπόρου και υπανθίου από τον καρπό του *Rosa Canina* L. [4]

### 1.2.1 Φαρμακευτική δράση

Οι τριανταφυλλίες *R. Canina* L. εμφανίζουν προληπτική και θεραπευτική δράση ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το κοινό κρυολόγημα, οι λοιμώδεις νόσοι, οι γαστρεντερικές διαταραχές, οι παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος καθώς και οι φλεγμονώδεις ασθένειες [3]. Τα χαρακτηριστικότερα θεραπευτικά συστατικά που βρίσκονται στο έλαιο του άγριου τριαντάφυλλου είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (κυρίως λινολεϊκό (ωμέγα-6) και  $\alpha$ -λινολενικό (ωμέγα-3)), καροτενοειδή και βιταμίνη A, τα οποία το καθιστούν πολύτιμη πρώτη ύλη για τη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών [2]. Χάρη στην περιεκτικότητά του στα προαναφερόμενα συστατικά, το έλαιο από σπόρους του τριαντάφυλλου λειτουργεί ως μια φυσική φροντίδα του δέρματος, με ενυδατική και αντιγηραντική δράση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί χρήσιμο κατά την επούλωση ουλών, προσδίδοντας απαλότητα στο δέρμα. Εφαρμόζεται επίσης κατά την θεραπεία δερματικών διαταραχών, όπως έκζεμα, τροφικά έλκη του δέρματος και χειλίτιδα [2]. Όσον αφορά την διατροφική του αξία, τα λιπίδια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα ωμέγα 3, παρέχουν ευεργετική επίδραση για την υγεία. Συγκεκριμένα, οι χημικές αυτές ουσίες

ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες του σώματος, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης, του ιξώδους του αίματος, του ανοσοποιητικού και των φλεγμονωδών αποκρίσεων [2]. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι χαρακτηριστικότερες φαρμακευτικές εφαρμογές του φυτού.

Πίνακας 1 Ιστορικά καταγεγραμμένες θεραπευτικές χρήσεις του φυτού *Rosa Canina* L. [4]

Μέρος του φυτού	Είδος θεραπείας	Θεραπεία σε συμπτώματα και παθήσεις
Ρίζες	Ενδογενής δράση	Αιμορροΐδες, δυσουρία, βήχας, ρευματισμός
Φύλλα	Ενδογενής δράση	Κρυολόγημα, γρίπη, βήχας, φαγούρα, έκζεμα
Κλαδιά	Ενδογενής δράση	Πέτρες στο νεφρό
	Εξωγενής δράση	Έκζεμα
Φρούτο (κέλυφος)	Ενδογενής δράση	Κρυολόγημα, γρίπη, βήχας, βρογχίτιδα, άσθμα, μόλυνση, ανοσολογική νεφρίτιδα, παθήσεις ουροδόχου κύστεως, εγκαύματα, έλλειψη βιταμίνης C, κολικός, διαταραχές του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος (διουρητικό), αρθρίτιδα, ρευματικές διαταραχές, διάρροια, εντερικές καταρροές (καθαρτικό), διαβήτη, ανεπαρκή περιφερειακή κυκλοφορία
Φρούτο (καρπός)	Ενδογενής δράση	διαταραχές του νεφρού και κατώτερου ουροποιητικού συστήματος (διουρητικό), αρθρίτιδα, ρευματισμό, ισχιαλγία, κρυολόγημα, πυρετογόνες ασθένειες, καθαρισμός του αίματος (στυπτικό), καθαρτικό, για έλλειψη βιταμίνης C
	Εξωγενής δράση	Ρευματισμός, αιμορροΐδες, διάρροια, καρδιακές παθήσεις, υπογλυκαιμία, μόλυνση

Μέχρι στιγμής, από τις προαναφερόμενες παθήσεις, μόνο η ευεργετικότητα του φυτού στην οστεοαρθρίτιδα έχει αποδειχθεί κλινικά [4]. Ταυτόχρονα, νέες έρευνες υποδηλώνουν την συνεισφορά του φυτού στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους K. Nipomiya *et al*, ένα παράγωγο καμπερόλης (τιλιοζίτη) στο *R. Canina*, το οποίο συναντάται μόνο στους σπόρους της τριανταφυλλιάς, μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση της παχυσαρκίας [7]. Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται από τους N. Akifumi *et al* ότι η ημερήσια πρόσληψη εκχυλίσματος από *R. Canina* μειώνει το κοιλιακό σπλαχνικό λίπος σε προπαχύσαρκα άτομα [8].

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω φαρμακευτικές εφαρμογές, το φυτό αυτό χαρακτηρίζεται από τον Blumenthal M. στο βιβλίο «*The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*» ως φαρμακευτικό φυτό, προτείνοντας τη χρήση των σπόρων του (σπόρος των αχαιών) και των κελυφών (το υπάνθιο που περιβάλλει τα αχαιία του ψευδόκαρπου) για θεραπεία παθήσεων, όπως αρθρικές καταστάσεις, ουρική αρθρίτιδα, ισχιαλγία, παθήσεις των νεφρών και του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος [9].

### 1.2.2 Βιοδραστικές ενώσεις στο φυτό *Rosa Canina* L.

Ως βιοδραστικές ενώσεις χαρακτηρίζονται οι μεταβολίτες που συντίθενται από τα φυτά και συμβάλλουν στην άμυνα και ευδοκιμία τους [10]. Τα φυτά συνθέτουν πολλούς κύριους και δευτερογενείς μεταβολίτες, ευεργετικούς για την ανθρώπινη υγεία. Οι κύριοι μεταβολίτες είναι κυρίως λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και υδατάνθρακες απαραίτητα για την συντήρηση των κυττάρων. Αντίθετα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν μικρότερη σημασία καθώς δεν συμμετέχουν απευθείας στον φωτοσυνθετικό ή αναπνευστικό μεταβολισμό αλλά είναι ωστόσο απαραίτητοι για την επιβίωση και άμυνα του φυτού [10,11]. Η ταξινόμηση τους γίνεται σύμφωνα με τις βιοσυνθετικές οδούς και τη δομή τους [35]. Συγκεκριμένα, χωρίζονται σε τρεις βασικές ομάδες [10,11]:

- 1) Φλαβονοειδή, φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις,
- 2) Τερπενοειδή
- 3) Αλκαλοειδή

Σημειώνεται ότι στην παρούσα μελέτη θα εξεταστεί το περιεχόμενο του φυτού σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις.

Οι φαρμακευτικές χρήσεις της τριανταφυλλιάς *R.canina* που αναφέρθηκαν στην Ενότητα 1.2.1, αποδίδονται στην παρουσία βιοδραστικών ενώσεων όπως το ασκορβικό οξύ, τα καρτενοειδή, φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις και λιπαρά οξέα [3,4]. Συγκεκριμένα, το *Rosa canina* L. είναι γνωστό για την υψηλή του περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Πρόκειται για ενώσεις με αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές επιδράσεις. Σημειώνεται ότι οι ενώσεις πολυφαινόλης θεωρούνται πιθανές αντιοξειδωτικές ουσίες και προστατευτικοί παράγοντες έναντι της ανάπτυξης ανθρώπινων ασθενειών [5].

Παράλληλα, τα γνωστότερα συστατικά υπεύθυνα για αντιφλεγμονώδη δράση είναι τα [4]:

- 1) γαλακτολιπίδιο ((2S)-1,2-δι-O-[(9Z,12Z,15Z)-οκταδεκα-9-12-15-τριενούλ]-3-O-β-d-γαλακτοπυρανοσυλ γλυκερόλη),
- 2) λινελαϊκό οξύ (ω-6 PUFA), και
- 3) α-λινολενικό οξύ (ω-3 PUFA).

Σημειώνεται ότι το γαλακτολιπίδιο παρέχει επίσης χονδροπροστατευτική ικανότητα *in vitro* [4]. Ταυτόχρονα, χαρακτηριστικά λιπαρά οξέα του *R. Canina* πέρα από το λινολεϊκό οξύ είναι το ελαϊκό, το λινολενικό, το παλμιτικό, το στεατικό και το αραχιδονικό οξύ [5]. Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι στο συγκεκριμένο είδος τριανταφυλλιάς εντοπίζεται το υψηλότερο επίπεδο ασκορβικού οξέος (30–1300 mg/100 g) μεταξύ των φρούτων και των λαχανικών [3,4,5]. Παρόλο που το ίδιο το *Rosa canina* δεν περιέχει βιταμίνη Α, τα καροτενοειδή που εντοπίζονται λειτουργούν ως υποκατάστατα, δεδομένου ότι είναι πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης Α [4]. Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται τα θεραπευτικά συστατικά του φαρμακευτικού φυτού.

Πίνακας 2 Θεραπευτική σύνθεση σπόρων και ελαίων του τριανταφύλλου *Rosa Canina* L. [4]

Χημική ένωση	Ονομασία	Συστηματική ονοματολογία και λιπιδικός αριθμός
Τριτερπενικό οξύ	ουρσολικό οξύ	
	ολεανολικό οξύ	
	βετουλικό οξύ	
Πολυακόρεστα οξέα (PUFAs)	λαυρινικό οξύ (lauric)	δωδεκανοϊκό οξύ (C 12:0)
	μυριστικό οξύ	τετραδεκανοειδές οξύ (C 14:0)
	παλμιτικό οξύ	εξαδεκανοειδές οξύ (C 16:0)
	παλμιτολετικό οξύ	(C 16:1 ω-7)
	στεαρικό οξύ	οκταδεκανοειδές οξύ (C 18:0)
	ολεϊκό οξύ	(C 18:1 ω-9)
	λινολεϊκό οξύ	Ολο (All)-cis-13,16-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ, (cis-C 22:2 ω-6)
	α-λινολενικό οξύ	Ολο (All)-cis-9,12,15-οκταδεκατριενοϊκό οξύ, (cis-C 18:3 ω-3)
	αραχιδικό οξύ	εικοσανοϊκό οξύ (C 20:0)



	βεχενικό οξύ	δοκοσανοϊκό οξύ (C 22:0)
	δοκοσαδιενοϊκό οξύ	Ολο (All)-cis-9,12,15-δοκοσαδιενοϊκό οξύ, (cis-C 18:3 ω-3)
Γαλακτολιπίδια	GOPO	(2S)-1,2-δι-O-[(9Z,12Z,15Z)-οκταδεκα-9-12-15-τριενοϋλ]-3-O-β-d-γαλακτοπυρανοσυλ γλυκερόλη

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα παραπάνω βασικά συστατικά που ευθύνονται για την ευεργετική επίδραση στην υγεία είναι ασταθή και αποσυντίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, ο βρασμός που εμπλέκεται στην παρασκευή σούπας και μαρμελάδας αδρανοποιεί τα βιοενεργά συστατικά του φυτικού υλικού [4,11].

Αναφορικά με τον προσδιορισμό των εμπεριεχομένων ενώσεων του φυτού, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες έρευνες όπου χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, διαδοχική φασματομετρία μάζας, αέρια χρωματογραφία και ανίχνευση διάταξης δίοδων [4].

### 1.2.2.1 Φαινολικές ενώσεις

Ως φαινολικές ενώσεις ορίζονται οι φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται βιογενετικά από το σικιμικό ή φαινυλοπροπανοειδές μονοπάτι, το οποίο παρέχει άμεσα φαινυλοπροπανοειδή. Πρόκειται για ενώσεις με σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών, οι οποίες παρέχουν προστασία από παθογόνα και αρπακτικά. Επιπλέον, συμβάλλουν σε χρωματικά και αισθητικά χαρακτηριστικά των λαχανικών και των φρούτων [11].

Η δομή τους αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος περιέχει έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες και κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως εξαιρετικά πολυμερισμένες ενώσεις [11]. Η εν λόγω δομή συσχετίζεται με τη δράση δέσμευσης ριζών, χηλοποίησης μετάλλων και κατ'επέκταση την αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες, οι οποίες τους επιτρέπουν να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, καταστολείς (suppressor) οξυγόνου ή χηλικοποιητές μετάλλων, καταστέλλοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών που καταλύονται από μέταλλα [5,11,12]. Ταυτόχρονα, υποστηρίζεται ότι ο αριθμός των υδροξυλομάδων και η θέση τους σε σχέση με την καρβοξυλική λειτουργική ομάδα μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αυτών [5,11]. Χάρη στην ποικιλομορφία της δομής τους, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων που εμφανίζονται στη φύση. Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 δομές φαινολικών ενώσεων [11]. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα φαινολικών ενώσεων στα φυτά.



Πίνακας 3 Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων στα φυτά [11]

Παραδείγματα	Ανθρακική αλυσίδα
Απλά φαινολικά, βενζοκινόνες	C <sub>6</sub>
Υδροξυ-βενζοϊκά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Υδροξυκιναμικά οξέα, , φαινυλοπροπανοειδή	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Ακετοφαινόνες, φαινυλοξεϊκά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Ξανθόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Στιλβένια, ανθρακινόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Λιγνάνες, νεολιγνάνες	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Λιγνίνες	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανιδίνες ή φλαβολάνες)	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Χαρακτηριστικότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων αποτελούν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι τανίνες [11].

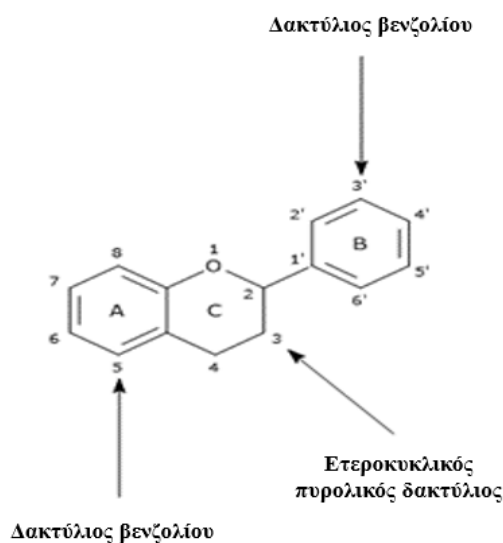
### Φαινολικά οξέα

Ως φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται οι φαινολικές ενώσεις με τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο όπου τουλάχιστον ένα υδρογόνο αντικαθίσταται από μια ομάδα υδροξυλίου. Κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες: τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (HBAs) και τα υδροξυκιναμικά οξέα (HCAs), τα οποία προέρχονται από μη φαινολικά μόρια βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος, αντίστοιχα [11]. Η σύνθεση τους πραγματοποιείται μέσω της σικιμικού οδού, κατά την οποία η 1-φαινυλαλανίνη ή η 1-τυροσίνη είναι η πρόδρομη ουσία [11]. Τα HBA έχουν ανθρακική αλυσίδα C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, με κάποιες παραλλαγές στη βασική τους δομή όπως π.χ υδροξυλιώσεις και μεθοξυλιώσεις των αρωματικών δακτυλίων [11]. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα HBA είναι το σαλικυλικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, γεντισικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγικό οξύ, γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ και εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (ελλαγικό οξύ διλακτόνη) [11]. Αντίστοιχα, τα HCA έχουν ανθρακική αλυσίδα C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, με διπλό δεσμό στην πλευρική αλυσίδα η οποία μπορεί να έχει cis ή trans κατεύθυνση. Εμφανίζονται συνήθως τρόφιμα ως μονομερή, διμερή ή πολυμερή ενώ παράλληλα μπορούν να εντοπιστούν ως συμπυκνώματα με αλκοόλες, υδροξυοξέα ή μονο/δισακχαρίτες που παράγουν εστέρες ή μπορεί να είναι αμίδια από συμπύκνωση με αμίνες [11].

### Φλαβονοειδή

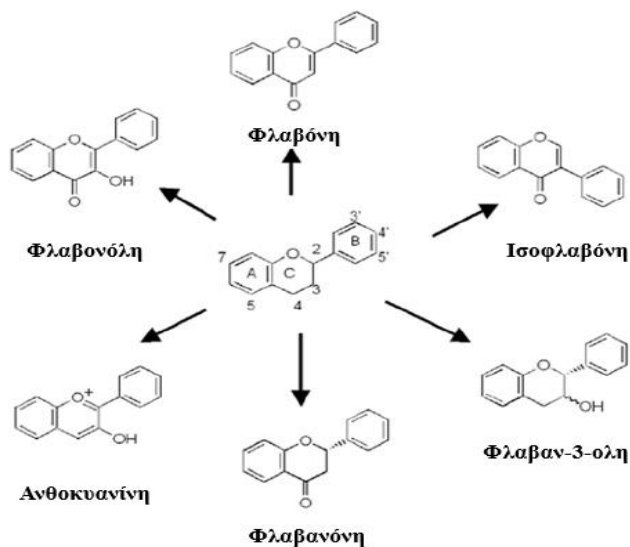
Τα φλαβονοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων που συναντώνται φυσικά σε φρούτα, λαχανικά, ή δημητριακά [11,13,14]. Ως φλαβονοειδή ορίζονται οι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες που ανήκουν στην ομάδα των ενώσεων των φαινυλοπροπανοειδών [4,12]. Πρόκειται για υδροξυλιωμένες φαινολικές ουσίες οι οποίες συντίθενται από τα φυτά ως απόκριση σε μικροβιακή μόλυνση (12). Έχουν ως βασική δομή την βενζο-γ-πυρόνη, η οποία αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα τριών ανθράκων. Εμφανίζονται ως αγλυκόνες, γλυκοσίδες και μεθυλιωμένα παράγωγα [4,12]. Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (A, B) που συνδέονται στη μία πλευρά με έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο (C), ο οποίος

φέρει ένα άτομο οξυγόνου αντί για άνθρακα δίπλα στην κοινή πλευρά [11,13]. Στην Εικόνα 4 αναπαρίσταται η γενικευμένη δομή των φλαβονοειδών.



Εικόνα 4 Γενικευμένη δομή φλαβονοειδών

Όλα τα φλαβονοειδή προέρχονται από τον κύριο σκελετό της Εικόνας 4, ενώ διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς τους υποκαταστάτες που συνδέονται σε οποιοδήποτε μέρος της δομής [11,13]. Αναλυτικότερα, ανάλογα με τον υποκαταστάτη του δακτυλίου C και το επίπεδο οξείδωσης, τα φλαβονοειδή μπορούν να διακριθούν σε έξι βασικές υποκατηγορίες: 1) ανθοκυανίνες, 2) φλαβόνες, 3) φλαβονόλες, 4) ισοφλαβόνες, 5) φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και 6) φλαβανόνες [4,11,12]. Η πιο διαδεδομένη ομάδα των έγχρωμων φλαβονοειδών είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι βήτα-γλυκοσίδες με σάκχαρα στη θέση 3 [4].



Εικόνα 5 Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή, ως ομάδα, περιλαμβάνουν πάνω από 8000 διαφορετικές ταυτοποιημένες ενώσεις, υπεύθυνες για μια σειρά από λειτουργίες μέσα στα φυτά, όπως ο χρωματισμός των διαφορετικών τμημάτων των φρούτων ή λαχανικών (φύλλα, λουλούδια, φλούδες), καθώς και προστασία έναντι των ακτίνων UV ή εξωτερικών απειλών, όπως ως παθογόνα [11,13]. Συγκεκριμένα, ένα μεγάλο μέρος των φλαβονοειδών έχει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο έως κόκκινο χρώμα, το οποίο οφείλεται στα συζευγμένα χρωμοφόρα που βρίσκονται στα μόρια, και είναι υπεύθυνα για τη χρωματική γκάμα των λουλουδιών, των σπόρων και φρούτων [11]. Χαρακτηριστική λειτουργία των φλαβονοειδών είναι η δυνατότητα παραγωγής ανθρώπινων προστατευτικών ενζυμικών συστημάτων και η προφύλαξη έναντι πολλών μολυσματικών (βακτηριακών και ιογενών ασθενειών) και εκφυλιστικών ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο [11,12]. Μια ακόμη βασική λειτουργία τους αποτελεί η προστασία των κυττάρων από την υπερϊώδη ακτινοβολία B (UV-B) [4]. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή συσσωρεύονται στα επιδερμικά στρώματα και αξιοποιούν την καταστροφική ακτινοβολία UV-B, ενώ παράλληλα επιτρέπουν στα ορατά μήκη κύματος να περάσουν [4]. Για αυτό το λόγο, σε πολλές χώρες το πλούσιο σε φλαβονοειδή έλαιο από σπόρους τριαντάφυλλου, χρησιμοποιείται ως προστασία του δέρματος από τα ηλιακά εγκαύματα [4].

## Τανίνες

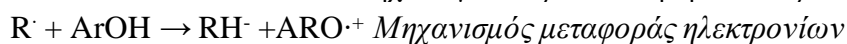
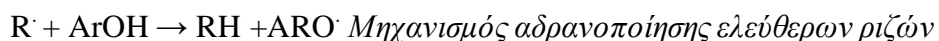
Ως τανίνες ορίζονται οι φαινολικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που κυμαίνεται από 500 Da έως 3000 Da [10,11]. Περιέχουν μεγάλο αριθμό υδροξυλίων ή άλλων λειτουργικών ομάδων και ως εκ τούτου βρίσκονται σε μορφή εστέρων ή ετερώσεων [11]. Συναντώνται στα φύλλα, φλοιούς, φρούτα, και ρίζες των φυτών και εντοπίζονται κυρίως στους ιστούς των κενοτόπιων [10]. Οι τανίνες, οι οποίες συνήθως αναφέρονται ως τανικό οξύ, έχουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών και οικοσυστήματος τους. Για παράδειγμα, μπορούν να δράσουν κατά των φυτοφάγων ή να εμφανίσουν αντιμικροβιακή δράση [11].

Παρόλο που οι σχετικές φαινολικές ενώσεις όπως απλές φαινολικές ενώσεις, νεολιγάνες και φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται και ταξινομούνται σύμφωνα με χημική δομή, οι τανίνες σχετίζονται κυρίως με την ικανότητά τους να συμπλέκονται με πρωτεΐνες [10]. Συγκεκριμένα,

ταξινομούνται χημικά σε δύο ομάδες: υδρολυόμενες και μη υδρολυόμενες ή αλλιώς συμπυκνωμένες τανίνες. Οι υδρολυόμενες τανίνες (γαλλοτανίνες και ελλαγιτανίνες) είναι μόρια υδατανθράκων με την D-γλυκόζη ως κεντρικό πυρήνα [10]. Προκύπτουν από την εστεροποίηση φαινολικών ομάδων όπως το γαλλικό και ελλαγικό οξύ και υποδιαιρούνται σε ταραγγαλλοτανίνες (γαλλικό και κινικό οξύ) και καφετανίνες (καφεϊκό και κινικό οξύ) [10,11]. Μετά την υδρόλυση από ορισμένα ένζυμα, οξέα, βάσεις και εστέρες γαλλικού οξέος, παράγονται γλυκόζη και γαλλικά οξέα [10,11]. Παράλληλα, οι ελλαγιτανίνες υφίστανται λακτονοποίηση για να παράγουν ελλαγικό οξύ [10]. Αντίθετα, οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι δομικά πιο σύνθετες και ομοιόμορφες από τις υδρολυόμενες τανίνες. Αποτελούνται από μονάδες φλαβονοειδών (φλαβαν-3-όλες) που συνδέονται με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα, η δομή των οποίων διαφέρει στα φυτά ως προς τη στερεοχημεία, τον τύπο των ενδομοριακών δεσμών φλαβάνης, τον βαθμό πολυμερισμού και την υδροξυλίωσή τους [10,11]. Χαρακτηριστικότερα παραδείγματα συμπυκνωμένων τανινών αποτελούν οι προκυανιδίνες και οι προδελφινιδίνες οι οποίες συνδέονται αντίστοιχα μέσω μονομερούς φλαβαν-3-όλης (C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>), αλλά διαφέρουν στον δακτύλιο B των φλαβονοειδών ως προς τον βαθμό υδροξυλίωσης [11]. Σημειώνεται ότι οι μη υδατοδιαλυόμενες τανίνες συναντώνται συχνότερα σε σύγκριση με τις υδατοδιαλυόμενες σε φυτά όπως φρούτα, λαχανικά, κόκκινο κρασί, κακάο, μερικά δημητριακά (σόργο και κεχρί) και όσπρια [10,11].

### 1.2.2.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα φαινολικών ενώσεων

Οι φαινόλες θεωρείται πως είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, δηλαδή έχουν την ικανότητα να αποτρέπουν τα βιομόρια (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, πολυακόρεστα λιπίδια και σάκχαρα) από οξειδωτική βλάβη μέσω αντιδράσεων που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες [11,15]. Κατά συνέπεια, η αντιοξειδωτική αυτή δράση παραπέμπει σε αντιφλεγμονώδες, αντιδιαβητικό, καρδιοπροστατευτικό, νευροπροστατευτικό, αντικαρκινικό και αντιγηραντικό ρόλο [11]. Ο προστατευτικός αυτός ρόλος των φαινολικών ενώσεων μπορεί να εκτελεστεί μέσω δύο δίοδων: μέσω αδρανοποίησης ελεύθερων ριζών και μεταφοράς ηλεκτρονίων (15,16). Κατά τον πρώτο μηχανισμό, η ελεύθερη ρίζα (R<sup>\*</sup>) μπορεί να αφαιρέσει ένα άτομο υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό (ArOH) με αποτέλεσμα να γίνεται ριζικό. Όσο πιο ασθενής είναι η ενέργεια διάστασης δεσμού (BDE) των δεσμών O-H, τόσο πιο εύκολη είναι η αντίδραση της αδρανοποίησης της ελεύθερης ρίζας και κατ'επέκταση τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση [11]. Αναφορικά με τον δεύτερο μηχανισμό, το αντιοξειδωτικό καλείται να δώσει ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα, η οποία μετατρέπεται σε κατιούσα ρίζα. Όσο χαμηλότερο είναι το δυναμικό ιοντισμού (IP), τόσο πιο εύκολη θα είναι και η απόσπαση ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση [11].



### 1.2.2.3 Φαινολικές ενώσεις στο *Rosa Canina* L.

Το φυτό *Rosa canina* L. είναι γνωστό για την υψηλή του περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά [5]. Με βάση διάφορες έρευνες που διεξάχθηκαν με στόχο την ταυτοποίηση των συνηθέστερων φαινολικών ενώσεων στο συγκεκριμένο γένος άγριας τριανταφυλλίας, προκύπτει ο Πίνακας 4 με μια σύνοψη τους.

Πίνακας 4 Ενδεικτική σύσταση *Rosa Canina* L. σε φαινολικές ενώσεις [14,17]

Φαινολική ένωση	Κατηγορία φαινολικής ένωσης
(+)-Κατεχίνη	Φλαβανόλη
(-)-Επικατεχίνη	Φλαβανόλη
Απιγενίνη	Φλαβόνη
Κερσετίνη	Φλαβονόλη
Καμφερόλη	Φλαβονόλη
Εσπεριδίνη	Φλαβανόνη
Ταξιφολίνη	Φλαβανόνη
Εριοδικτυόλη	Φλαβανόλη
Ρουτίνη	Φλαβονολ-γλυκοζιδάση
Κερσιτρίνη	Φλαβονολ-γλυκοζιδάση
Φλοριζίνη	Διυδροχαλκόν-γλυκοζιδάση
Γαλλικό οξύ	Φαινολικό οξύ
Καφεϊκό οξύ	Φαινολικό οξύ
Χλωρογενικό οξύ	Φαινολικό οξύ
p-κουμαρικό οξύ	Φαινολικό οξύ
Φερουλικό οξύ	Φαινολικό οξύ
Γαλλικός μεθυλεστέρας	Φαινολικό οξύ
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	Φαινολικό οξύ
Ρεσβερατρόλη	Πολυφαινόλη
Φλωρογλυκινόλη	Πολυφαινόλη

Σημειώνεται ότι οι παραπάνω φαινολικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν σε ομογενοποιημένη μορφή του φυτού με χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με μεθόδους ανίχνευσης υπεριώδους (HPLC-UV) και αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε από τους S. Fetni *et al* και I. Roman *et al* [14,17].

Κλείνοντας, επισημαίνεται ότι η βιοχημική σύσταση του φυτού επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται (π.χ. αριθμός ωρών με ήλιο, υψόμετρο, έδαφος και ποσότητα βροχής) [4]. Επιπλέον, η ποιότητα του παραγόμενου εκχυλίσματος μπορεί να επηρεαστεί, πέρα από τα προαναφερόμενα, και από το υποείδος του *R. canina* που χρησιμοποιείται, τη μέθοδο παραγωγής και χρόνο συγκομιδής καθώς και το μέρος του καρπού που εκχυλίζεται [4].

## 1.2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης και αξιολόγησης βιοδραστικών ενώσεων

### 1.2.3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων

Η μέθοδος ανάλυσης Folin-Ciocalteu (F-C) θεωρείται ως η απλούστερη διαθέσιμη μέθοδος για τη μέτρηση της περιεκτικότητας ενός εκχυλίσματος σε φαινολικά προϊόντα [18]. Η αποτελεσματικότητα του αντιδραστήριου F-C αποδείχτηκε πρώτη φορά το 1927 από τους Folin και Vintila Ciocalteu, οι οποίοι πρότειναν τη χρήση του σε αλκαλικές συνθήκες για τον προσδιορισμό της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης σε πρωτεΐνες [18,19]. Το εν λόγω αντιδραστήριο, αποτελεί ένα μείγμα φωσφοβολφραμικού οξέος ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) και φωσφομολυβδικού οξέος ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) το οποίο αντιδρά με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες για τον σχηματισμό χρωμογόνων [18,19]. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι πολύ σταθερό με προϋπόθεση την προστασία του από αναγωγικούς παράγοντες και φως, ακόμη και όταν αραιώνεται [19].

$Na_2WO_4/Na_2MO_4$  κίτρινο  $\Rightarrow$  (Phenol-MoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>-4</sup> μπλε (Αντίδραση 1)

$Mo^{+6}$  (κίτρινο) +  $e^{-1}$   $\Rightarrow$   $Mo^{+5}$  (μπλε) (Αντίδραση 2)

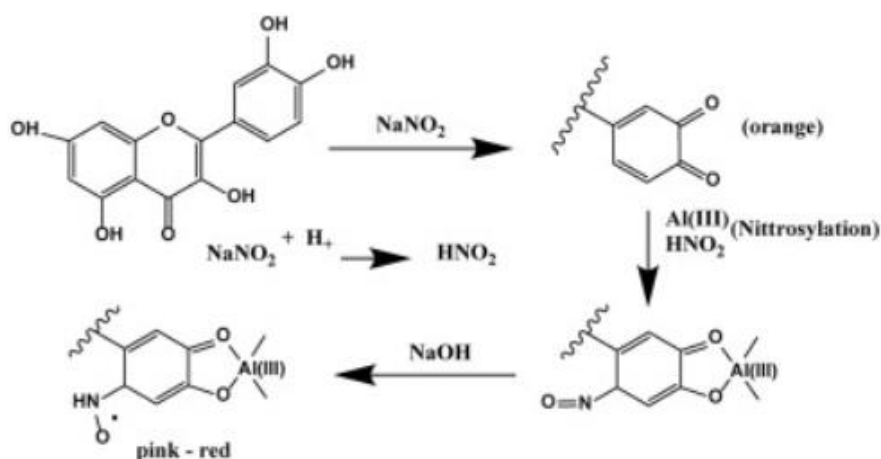
$Mo^{+5}$  +  $e^{-1}$   $\Rightarrow$   $Mo^{+4}$  (μπλε) (Αντίδραση 3)

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω αντιδράσεις, το βολφράμιο και μολυβδάνιο βρίσκονται σε κατάσταση οξειδωσης 6+. Κατά την αντίδραση με ένα αναγωγικό, προκύπτει το μπλε χρώμα του μολυβδαινίου και το μπλε του βολφραμίου αντίστοιχα, ενώ η μέση κατάσταση οξειδωσης των μετάλλων είναι μεταξύ 5 και 6 [18]. Οι αντιδράσεις αυτές είναι αργές σε όξινο pH και γρηγορότερες σε βασικό. Μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω βελτίωση τους με την προσθήκη ενός αντιδραστήριου μολυβδοβολφορικού ετεροπολυανίου το οποίο μειώνει τις πολυφαινόλες με το  $\lambda_{max}$  στα 765 nm [18]. Η βελτιωμένη αυτή μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος αντιοξειδωτικών ενώσεων σε μια μεγάλη ποικιλία φυτών, τροφίμων και ποτών φυτικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο F-C έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό φαινολικών αντιοξειδωτικών σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, χυμούς φρούτων, ποτά με καφεΐνη, αλκοολικά ποτά, σοκολάτα, βότανα, μπαχαρικά και φυτικά εκχυλίσματα [18]. Σημειώνεται ότι παραδοσιακά, η διαδικασία ποσοτικοποίησης της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις βασίζεται στη σύγκριση της απορρόφησης με μια τυπική καμπύλη γαλλικού οξέος.

### 1.2.4.2 Μέθοδος χλωριούχου αργιλίου για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών ενώσεων

Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content; TFC) στα φυτά συνήθως προσδιορίζεται χρωματομετρικά μετά την εκχύλιση με διαλύτη. Μία από τις πιο χαρακτηριστικές μεθόδους προσδιορισμού του TFC σε φυτικά εκχυλίσματα είναι η χρωματομετρική ανάλυση χλωριούχου αργιλίου, κατά την οποία το  $Al_{(III)}$  χρησιμοποιείται ως συμπλοκοποιητικός παράγοντας [20]. Η μέθοδος αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά το 1960

από τους Christ και Muller με στόχο τον προσδιορισμό των παραγώγων φλαβονόλης σε φάρμακα και βασίζεται στον σχηματισμό χηλικών ενώσεων μεταξύ  $Al(III)$  και φλαβονοειδών [20]. Χάρη στις πολλαπλές υδροξυλικές τους ομάδες, τα φλαβονοειδή έχουν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης μεταλλικών ιόντων όπως το  $Al(III)$  κυρίως σε αναλογία 1:1, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα το pH [20]. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με χρήση της μεθόδου  $AlCl_3$  με ή χωρίς την προσθήκη  $NaNO_2$  σε μήκος κύματος απορρόφησης μεταξύ 400 και 550 nm, ανάλογα με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα, το TFC ποσοτικοποιείται με βάση καμπύλες βαθμονόμησης που αναφέρονται σε ένα πρότυπο φλαβονοειδές αναφοράς το οποίο μετράται στις ίδιες πειραματικές συνθήκες και μήκος κύματος με τα εν λόγω φλαβονοειδή. Χαρακτηριστικότερα φλαβονοειδή αναφοράς είναι η κερσιτίνη, η κατεχίνη και η ρουτίνη [20]. Επισημαίνεται ότι εξαιτίας των ποικίλων χημικών δομών των φλαβονοειδών, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα φάσματα απορρόφησης τους καθιστώντας την ορθή ποσοτικοποίηση τους μια πρόκληση [20].



Εικόνα 6 Αντίδραση χλωριούχου αργιλίου με κερσετίνη παρουσία  $NaNO_2$  [20]

#### 1.2.4 Μέθοδος αξιολόγησης αντιοξειδωτικής δράσης

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος. Οι τεχνικές αυτές κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: φασματομετρία, ηλεκτροχημική τεχνική και χρωματογραφία. Στον Πίνακα 5 παρατίθενται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα των κατηγοριών αυτών.

Πίνακας 5 Παραδείγματα αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Τεχνική	Παραδείγματα
Φασματομετρία	DPPH, ABTS
Ηλεκτροχημική τεχνική	Αμπερομετρία, Διαμπερομετρία
Χρωματογραφία	HPLC, TLC

Οι παραπάνω τεχνικές βασίζονται σε μια έννοια γνωστή ως συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Το TAC ερμηνεύεται ως η ποσότητα των ελεύθερων ριζών που καταστέλλονται από ένα δοκιμαστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος [15]. Ανάλογα με τον μηχανισμό των χημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται, οι προσδιορισμοί TAC μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής [15]:

- (i) μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (SET),
- (ii) προσδιορισμοί με βάση την αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT),
- (iii) χηλίωση μετάλλων μετάπτωσης

### Φασματομετρική τεχνική μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση ρίζας DPPH

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε αντιοξειδωτική δοκιμασία χρωματογραφίας καθώς είναι πιο προσιτή και κοινώς χρησιμοποιούμενη. Συγκεκριμένα, αξιοποιήθηκε η ρίζα DPPH• ως μέτρο αντιοξειδωτικής δράσης. Πρόκειται για ένα αντιδραστήριο το οποίο ανακαλύφθηκε από τους Goldschmidt και Renn τη δεκαετία του 1920 και αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Blois το 1958 [15]. Η ένωση αυτή αφορά μια εμπορικά διαθέσιμη ρίζα, η οποία απορροφά στο ορατό και υπεριώδες μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με μέγιστο μήκος κύματος τα 515 nm. Η ρίζα DPPH είναι γνωστή για την αξιοσημείωτη σταθερότητά της λόγω της μετεγκατάστασης της σε αρωματικούς δακτυλίους [15].

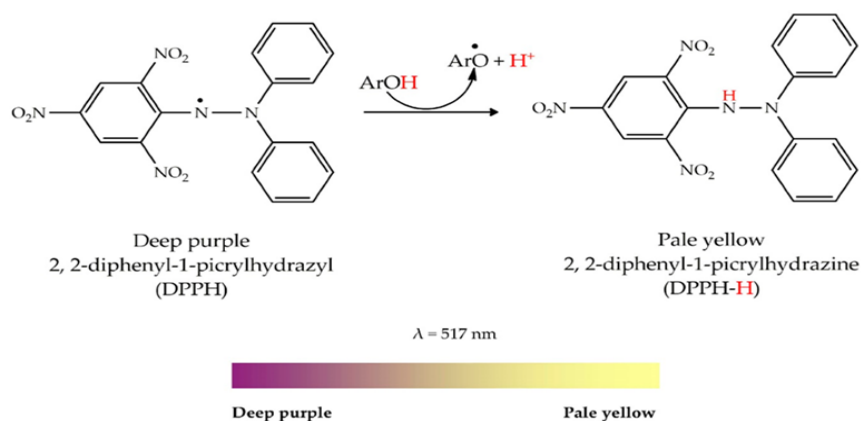
Αναφορικά με την λειτουργία του DPPH, πραγματοποιείται εξουδετέρωση της κατά την αποδοχή είτε ενός ατόμου υδρογόνου είτε ενός ηλεκτρονίου από ένα αντιοξειδωτικό είδος. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, η ρίζα μετατρέπεται σε ανηγμένη μορφή (DPPH ή DPPH-H). Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ρίζας DPPH• απορροφάται έντονα στα 515 nm, εμφανίζοντας ένα βαθύ μωβ χρώμα. Ωστόσο, όταν πραγματοποιεί σύζευξη με ένα περιττό ηλεκτρόνιο, παρατηρείται σταδιακή αλλαγή του αρχικού χρώματος μέχρις ότου να αποχρωματιστεί σε ανοιχτό κίτρινο [15,21].

Chemical reactions:



where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT



Εικόνα 7 Μηχανισμός αντίδρασης ρίζας DPPH [15]



## 1.3 Διεργασία εκχύλισης

Βασικό βήμα για την παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από φυτά αποτελεί η διεργασία της εκχύλισης. Ως εκχύλιση, χαρακτηρίζεται μια φυσική διεργασία διαχωρισμού μιγμάτων κατά την οποία πραγματοποιείται επιλεκτική απομάκρυνση μιας ένωσης ενδιαφέροντος από ένα μείγμα με χρήση διαλύτη. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι εκχυλίσεων είναι υγρού/ υγρού και υγρού/στερεού. Κατά την εκχύλιση υγρού/ υγρού, ένα μείγμα δύο μη αναμίξιμων υγρών τροφοδοτείται με διαλύτη με σκοπό τον διαχωρισμό μίας ή περισσότερων ενώσεων. Αντιθέτως, κατά την εκχύλιση υγρού/ στερεού οι διαλυτές ενώσεις μιας στερεής ύλης εκχυλίζονται από έναν διαλύτη.

Οι διεργασίες της εκχύλισης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τομείς: συμβατικές και μη εκχυλίσεις. Βασικότερα παραδείγματα των δύο κατηγοριών εντοπίζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6 Παραδείγματα συμβατικών και μη εκχυλίσεων

Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης
Διαβροχή, διήθηση, Soxhlet	με εναλλακτικούς διαλύτες, με μικροκύματα, με υπερήχους, με υπό/υπερ-κρίσιμα ρευστά

### 1.3.1 Εκχύλιση καρπών *Rosa canina* L.

Από τον σπόρο του τριαντάφυλλου, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε είναι απόβλητο υλικό, μπορεί να ληφθεί πολύτιμο έλαιο για ιατρική χρήση μέσω της διεργασίας της εκχύλισης [6]. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια εκχύλιση υγρού/ στερεού η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Μερικές τεχνικές που έχουν ήδη δοκιμαστεί είναι: (α) συμβατική εκχύλιση Soxhlet, καθώς και (β) μη συμβατική εκχύλιση με εξαγωγή υπερήχων, μικροκυμάτων, υπο- και υπερκρίσιμου υγρού (SFE) [6].

#### 1.3.1.1 Συμβατική εκχύλιση καρπών *Rosa Canina* L.

##### Εκχύλιση Soxhlet

Αναφορικά με την εκχύλιση Soxhlet, αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για τη συνεχή εκχύλιση ενός στερεού με θερμό διαλύτη. Ωστόσο, δεν συνιστάται για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων ενώσεων [22]. Πραγματοποιείται εκχύλιση των σπόρων της τριανταφυλλίας με καθορισμένη ποσότητα εξανίου για τρεις ώρες και επακόλουθη εξάτμιση του διαλύτη για παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος [6].

### 1.3.1.2 Μη συμβατική εκχύλιση καρπών *Rosa Canina* L.

#### Εκχύλιση με εξαγωγή υπερήχων

Η εκχύλιση με εξαγωγή υπερήχων λαμβάνει χώρα σε λουτρό νερού καθορισμένης θερμοκρασίας (80°C) όπου οι σπόροι της τριανταφυλλιάς υποβάλλονται σε μηχανική ενέργεια από υπερηχητικά κύματα, σε καθορισμένη ποσότητα διαλύτη για μια ώρα. Μετά από διήθηση ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη για παραλαβή του εκχυλίσματος [6]. Σημειώνεται ότι τα υπερηχητικά κύματα επιταχύνουν τη διαδικασία εξαγωγής μέσω των φαινομένων σπηλαίωσης, κατά τα οποία δημιουργούνται φυσαλίδες που προκαλούν κατακερματισμό και αποσταθεροποίηση της βιολογικής μήτρας, βελτιώνοντας έτσι τη διαδικασία μεταφοράς μάζας [23].

#### Εκχύλιση με εξαγωγή μικροκυμάτων

Αναφορικά με την εκχύλιση με μικροκύματα, πρόκειται για μια διεργασία χρήσης της ενέργειας μικροκυμάτων για τη θέρμανση των διαλυτών που έρχονται σε επαφή με ένα δείγμα. Στόχος είναι η κατανομή των αναλυόμενων ουσιών από τη μήτρα του δείγματος στον διαλύτη [24]. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα μικροκύματα βλάπτουν τα κυτταρικά τοιχώματα θρυμματίζοντας τα απότομα με αύξηση της θερμοκρασίας και της εσωτερικής πίεσης [23]. Η διεργασία αυτή πραγματοποιείται σε εξειδικευμένο εξοπλισμό με καθορισμένη θερμοκρασία, ενέργεια και χρόνο (40°C, 300 W, 30 min), όπου οι σπόροι εκχυλίζονται με επιλεγμένο διαλύτη το εξάνιο το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται με διήθηση και εξάτμιση [6].

#### Εκχύλιση με υπο/υπέρ-κρίσιμα ρευστά

Τέλος, μια καλή εναλλακτική λύση στη συμβατική οργανική εκχύλιση και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων αποτελεί η εκχύλιση υπο- και υπερκρίσιμων ρευστών (SFE). Πρόκειται για μια τεχνική που αξιοποιεί έναν διαλύτη στην υπο ή υπερκρίσιμη κατάστασή του. Συνηθέστερη είναι η χρήση κυρίως υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, όπου οι υψηλότεροι συντελεστές διάχυσης και το χαμηλότερο ιξώδες παρέχουν υπερκρίσιμα ρευστά και ανώτερα χαρακτηριστικά μεταφοράς μάζας έναντι των συμβατικών υγρών [6].

Σύμφωνα με την έρευνα των K. Szentmihályi *et al*, για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από τους καρπούς του *Rosa canina* L., χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές και μη μέθοδοι εκχύλισης, με συνηθέστερους διαλύτες το εξάνιο, προπάνιο, νερό, αιθανόλη (EtOH), μεθανόλη (MeOH) και υδατικά μείγματα (50%, v/v) [6]. Μεταξύ των προαναφερόμενων τεχνικών, αξιολογήθηκε από τους ερευνητές η απόδοση των εκχυλισμάτων [6]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στις μη συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (εκχύλιση μικροκυμάτων, υπερ- και υποκρίσιμο FE) προκύπτει υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με εκείνη της συμβατικής εκχύλισης Soxhlet. Ειδικότερα, η εκχύλιση υποκρίσιμων ρευστών με CO<sub>2</sub> υπερτερεί όσον αφορά την ανάκτηση ελαίου από το φυτό *Rosa canina* L. χάρη στις υψηλές τιμές απόδοσης και περιεκτικότητας σε καροτίνη και λινολεϊκό οξύ. Επιπλέον, χαρακτηριστικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι το προκύπτον εκχύλισμα είναι ελεύθερο από διαλύτες ενώ στην περίπτωση των άλλων εκχυλίσεων απαιτείται εξάτμιση του διαλύτη [6]. Αναφορικά με την συγκέντρωση των στοιχείων του εκχυλίσματος, σημειώθηκε ότι σε εκχυλίσεις χαμηλότερων

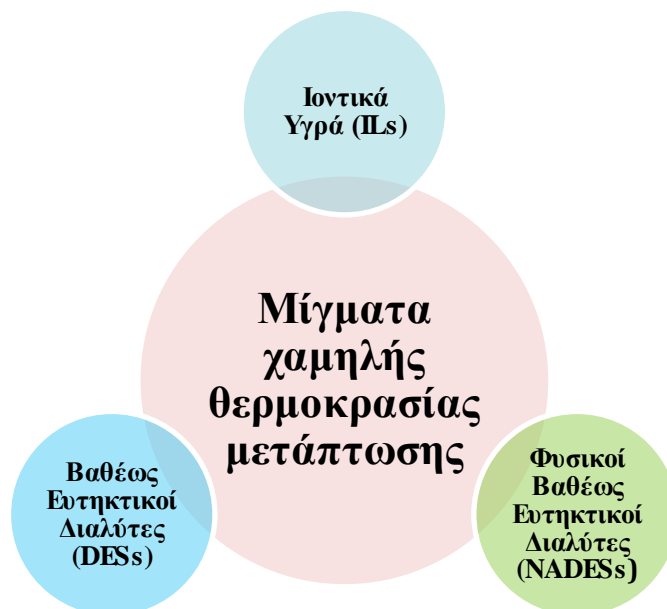
θερμοκρασιών (μικροκύματα και SFE) είναι ευνοϊκότερη η σύνθεση λιπαρών οξέων [6]. Επιπρόσθετα, κατά την εκχύλιση με εξαγωγή μικροκυμάτων εντοπίστηκε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα μεταλλικά στοιχεία Ca, Cr, Fe, K, P, Mg, Mn, Na. Ωστόσο, η παρουσία του σιδήρου στο έλαιο είναι ανεπιθύμητη όταν η συγκέντρωση του ξεπερνάει τα 2-6 mg/ g, διότι προκαλεί ταγγισμό και κατ' επέκταση μακροχρόνια διαταραχή της σταθερότητας του εκχυλίσματος [6]. Συνεπώς, συμπεραίνεται πως η εκχύλιση υπό, υπέρ-κρίσιμων ρευστών με διοξείδιο του άνθρακα και προπάνιο είναι ευνοϊκή για την εκχύλιση βιολογικά δραστικών ουσιών από τους σπόρους της τριανταφυλλιάς. Βασικό πλεονέκτημα αποτελεί η σύνθεση λιπαρών οξέων και η παραγωγή ενός εκχυλίσματος φυσικών ουσιών απουσία διαλύτη.

Κλείνοντας, είναι εμφανές ότι η παραλαβή και αξιοποίηση βιοδραστικών ενώσεων από το άγριο τριαντάφυλλο αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική που έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Για αυτό το λόγο, κρίνεται σημαντική η μετατροπή της σε μια πιο «πράσινη» διεργασία, η οποία θα μπορέσει να αναχθεί σε βιομηχανική κλίμακα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας μετάβασης είναι η αναζήτηση εναλλακτικών διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκχυλιστικά μέσα.

## 1.4 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DESs)

Την τελευταία δεκαετία, με την αυξανόμενη περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση και την εκπαίδευση των καταναλωτών χάρη στις ψηφιακές τεχνολογίες, η ζήτηση για φυσικά προϊόντα έχει αυξηθεί [25]. Κατά συνέπεια, οι νέες αυτές τάσεις αγοράς πυροδότησαν μια στροφή των βιομηχανιών στην πράσινη χημεία έτσι ώστε να αναπτυχθούν φιλικά προς το περιβάλλον, ακίνδυνα βιοενεργά συστατικά [25]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της μετάβασης αυτής σε πράσινες και βιώσιμες παραγωγικές διαδικασίες αποτελεί η χρήση εναλλακτικών λύσεων σε διαλύτες από πετροχημικά ή νερό [23].

Μια από τις πρώτες εναλλακτικές που ανακαλύφθηκαν αποτελούν τα Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids; ILs), τα οποία προκύπτουν από συστήματα αποτελούμενα κυρίως από έναν τύπο διακριτών ανιόντων και κατιόντων [27]. Ωστόσο, τα Ιοντικά Υγρά παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων της υψηλής τοξικότητας, της μη βιοαποικοδομησιμότητας, της σύνθετης σύνθεσης που απαιτεί καθαρισμό και του υψηλού κόστους των πρώτων υλών [13,23,28].



Σχήμα 2 Μίγματα χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης

Ως ανταπάντηση στα προαναφερόμενα μειονεκτήματα των Ιοντικών Υγρών, δημιουργήθηκε το 2003 από τους A. P. Abbot *et al* μια νέα γενιά διαλυτών, με πολλά κοινά χαρακτηριστικά και ιδιότητες με τα ILs, γνωστή και ως Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents; DESs) [13,23,27,28,29]. Τα υγρά αυτά ονομάστηκαν έτσι για να διαφοροποιηθούν από τα ιοντικά υγρά τα οποία περιέχουν μόνο διακριτά ανιόντα [27]. Πρόκειται λοιπόν για διαλύματα οξέων και βάσεων Lewis ή Brønsted που σχηματίζουν ένα ευτηκτικό μείγμα αλάτων και οργανικών ενώσεων, εκ των οποίων η μία ένωση είναι δότης δεσμού υδρογόνου (HBD), ενώ η άλλη δέκτης (HBA), σε συγκεκριμένη γραμμομοριακή αναλογία [13,25,27,30]. Η μετεγκατάσταση του φορτίου επιτυγχάνεται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ενώσεων [25,27]. Ως αποτέλεσμα, τα μείγματα έχουν χαμηλότερο σημείο τήξης από εκείνο των μεμονωμένων συστατικών, οδηγώντας σε μια σταθερή υγρή φάση σε θερμοκρασία δωματίου [13,25,27,30]. Για τον λόγο αυτό, οι DES συγκαταλέγονται στην κατηγορία των μειγμάτων χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης, μαζί με τα ιοντικά υγρά και τους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (Σχήμα 2).

Ανάλογα με την φύση των δοτών δεσμών υδρογόνων, οι DES μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε βασικές κατηγορίες:

Πίνακας 7 Κύριες κατηγορίες DES [30,31]

Τύπος DES	Αντίδραση	Όροι
I	$R^+A^- + cMCl_x$	M=In, Zn, Fe, Al, Sn
II	$R^+A^- + cMCl_x \cdot cH_2O$	M= Ni, Cr, Fe, Cu
III	$R^+A^- + cRW$	W= OH, CONH <sub>2</sub> , COOH
IV	$MCl_x + cRW$	M= Al, Zn & W= CONH <sub>2</sub> , OH
V	HBD + HBA	HBD= δότης, HBA= δέκτης δεσμών υδρογόνου

- **DES τύπου I:** Παρασκευάζονται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και χλωριούχο μέταλλο. Ωστόσο, τα μη ένυδρα αλογονίδια μετάλλων που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό τους είναι πολύ λίγα. Κατά συνέπεια, οι συνδυασμοί που διατίθενται για τον συγκεκριμένο τύπο DES είναι περιορισμένοι [30,31].
- **DES τύπου II:** Αποτελούνται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και άνυδρο ή ένυδρο χλωριούχο μέταλλο [30,31].
- **DES τύπου III:** Παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου ως HBA και HBD. Αυτά τα DES αποτελούνται κυρίως από χλωριούχο χολίνη και HBDs (καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες, αμίδια και υδατάνθρακες κ.λπ.) [30]. Πρόκειται για μια σημαντική κατηγορία διαλυτών χάρη στην ικανότητα τους να διαλύουν ένα ευρύ φάσμα μετάλλων μετάπτωσης [30,31].
- **DES τύπου IV:** Αποτελούνται από αλογονίδια μετάλλων (συνήθως χλωριούχο μέταλλο μεταπτώσεως) και HBD. Σε μη υδατικούς διαλύτες, αυτά τα μεταλλικά άλατα συνήθως δεν ιονίζονται αλλά σχηματίζουν ένα DES με αιθυλενογλυκόλη, ακεταμίδιο και 1,6-εξανοδιόλη [30,31].
- **DES τύπου V:** Αυτοί οι τύποι DES είναι ένα σχετικά νέο μείγμα μη ιοντικών ενώσεων HBA και HBD για την παρασκευή μιγμάτων με μειωμένα σημεία πήξης. Ο δεσμός υδρογόνου θεωρείται ιδιαίτερα κυρίαρχος σε αυτήν την κατηγορία DES [30,31].

## 1.5 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADESs)

Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DESs) που προκύπτουν από φυσικά συστατικά όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα και οργανικές βάσεις σε διάφορους συνδυασμούς, ονομάζονται NADES (Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες) [32]. Οι NADES αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Y. H. Choi *et al.* το 2011 και έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τους DESs [23,32]. Υπερτερούν των συνθετικών Ιοντικών Υγρών και Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών χάρη στη φυσική τους προέλευση (π.χ πρωτογενείς μεταβολίτες των φυτών που λαμβάνονται καθημερινά από λαχανικά ή φρούτα), η οποία τα καθιστά λιγότερο τοξικά και περιβαλλοντικά φιλικά [32]. Στο Σχήμα 3 αναπαρίσταται η χρονική εξέλιξη των πράσινων διαλυτών που οδήγησε στην ανακάλυψη των NADES.



Σχήμα 3 Χρονική εξέλιξη των πράσινων διαλυτών

### 1.5.1 Μέθοδοι παρασκευής NADES

Η παρασκευή NADES μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Οι πιο χαρακτηριστικές μέθοδοι είναι: i) ανάδευση υπό θέρμανση, ii) λυοφιλοποίηση, iii) με μικροκύματα και iv) με υπερήχους.

#### *Ανάδευση υπό θέρμανση*

Συνηθέστερη μέθοδο παρασκευής NADES αποτελεί η συμβατική θέρμανση σε συνδυασμό με μέτρια ανάδευση μέχρις ότου να δημιουργηθεί σταθερό διαυγές υγρό, καθώς πρόκειται για μια διεργασία χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας [16,25]. Συγκεκριμένα, η θέρμανση γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες δωματίου, ανάλογα με την θερμοευαισθησία των συστατικών.

#### *Λυοφιλοποίηση*

Αναφορικά με τη λυοφιλοποίηση, πραγματοποιείται κατάψυξη και ξήρανση του διαλύματος, λαμβάνοντας ένα διαυγές παχύρρευστο υγρό [16].

#### *Μικροκύματα*

Κατά την σύνθεση NADES με τη βοήθεια μικροκυμάτων, σε ένα κλειστό σύστημα ελεγχόμενης ισχύος και θερμοκρασίας πραγματοποιείται ακτινοβολήση των ουσιών με στόχο την δημιουργία συγκρούσεων μεταξύ μορίων, μεταξύ δότη με δέκτη δεσμών υδρογόνου και κατ'επέκταση την διηλεκτρική θέρμανση [16].

#### *Υπερήχοι*

Τέλος, κατά την μέθοδο σύνθεσης με υπερήχους, προκαλείται σπηλαίωση χάρη στα ηχητικά κύματα όπου σχηματίζονται φυσαλίδες που καταρρέουν. Συγκεκριμένα, όταν η φυσαλίδα φτάσει σε σημείο έκρηξης, πραγματοποιείται απότομη απελευθέρωση πολύ υψηλής θερμότητας και πίεσης. Η εκλυόμενη ενέργεια βοηθά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών HBD και HBA, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό των NADES [16].

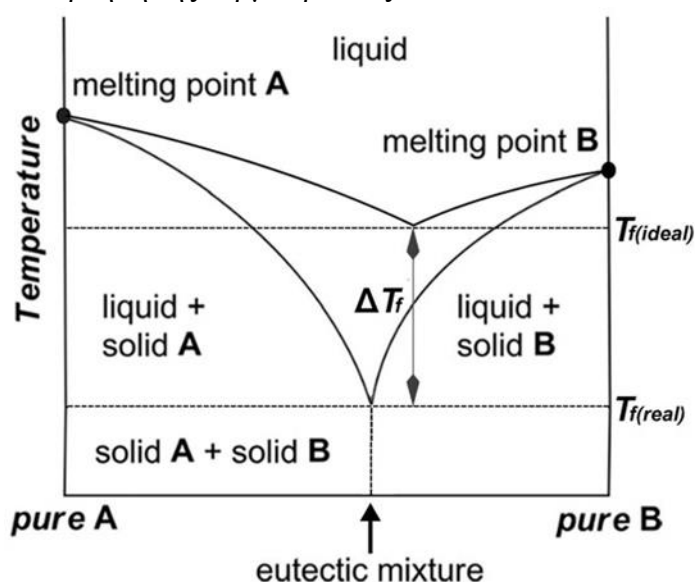
Η επιλογή της μεθόδου σύνθεσης διαφέρει για κάθε διεργασία και μπορεί να βασιστεί σε πολλαπλούς γνώμονες. Συγκεκριμένα, όταν δίνεται προτεραιότητα στο κόστος της διεργασίας, προτιμάται μια μέθοδος σύνθεσης όπου επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες. Αντιθέτως, όταν ευνοείται η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα, ελκυστικότερες είναι οι μέθοδοι όπου συναντώνται υψηλότερες θερμοκρασίες καθώς και η βοήθεια υπερήχων. Τέλος, πρέπει να ληφθούν υπόψη τυχόν περιορισμοί προκαλούμενοι από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών κατά την αντίδραση. Για παράδειγμα, οι θερμοευαίσθητες ουσίες, εξαιτίας της θερμικής τους αστάθειας, ενδέχεται να απαιτούν λυοφιλοποίηση έναντι της θέρμανσης υπό ανάδευση [13].

## 1.5.2 Ιδιότητες NADES

Κατά την μελέτη καταλληλότητας ενός NADES για μια διεργασία, λαμβάνονται υπόψη διάφορες φυσικές ιδιότητες όπως το διάγραμμα φάσης, η πολικότητα του διαλύτη, το ιξώδες, η πυκνότητα, η διαλυτότητα και η υδροφιλία/υδροφοβία [23].

### 1.5.2.1 Διάγραμμα φάσης/ ευτηκτικό σημείο

Δεδομένου ότι οι NADES προκύπτουν από ένα μείγμα δύο ή περισσότερων ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές καταστάσεις (στερεό-στερεό, στερεό-υγρό ή υγρό-υγρό), το διάγραμμα φάσης του συστήματος NADES κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί [23]. Συγκεκριμένα, η μελέτη του είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του ευτηκτικού σημείου, δηλαδή την χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία στο σύστημα που επικρατεί μπορεί να υπάρχει υγρό (Εικόνα 8). Για τον εντοπισμό του σημείου αυτού, πραγματοποιείται συνήθως θερμιδομετρική μέτρηση, συγκεκριμένα Ανάλυση Θερμιδομετρίας Διαφορικής Σάρωσης (DSC) [23]. Κατά τη μέθοδο αυτή, η διαφορά στην ποσότητα της θερμότητας που απαιτείται για την αύξηση της θερμοκρασίας ενός δείγματος και ενός δείγματος αναφοράς μετράται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.



Εικόνα 8 Διάγραμμα φάσης δύο συστατικών που εκπροσωπεί το ευτηκτικό σημείο [30]

### 1.5.2.2 Πολικότητα

Η επιλογή ενός διαλύτη βασίζεται συχνά στην ομοιότητα μεταξύ της πολικότητας του και εκείνης των στοχευμένων μορίων [13,25]. Τα περισσότερα NADES χαρακτηρίζονται από υψηλή πολικότητα και υδροφιλία. Παρόλα αυτά, διαθέτουν διαλυτική ικανότητα για ένα ευρύ φάσμα πολικότητας [25]. Η πολικότητα των NADES σχετίζεται με τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ δεκτών και δοτών δεσμών υδρογόνου [26]. Γενικά, όσο μεγαλύτερες είναι οι διαμοριακές έλξεις, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η πολικότητα. Για τον προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής, πραγματοποιούνται διαλυτοχρωμικές μελέτες χρησιμοποιώντας τους οργανικούς δείκτες του Reichardt καθώς και το Ερυθρό του Νείλου, οι οποίες βασίζονται σε σολβατοχρωματικούς ανιχνευτές φθορισμού καθώς και φασματική μικροσκοπία [25,33].

### 1.5.2.3 Ιξώδες

Το ιξώδες αποτελεί μια από τις βασικότερες ιδιότητες ενός διαλύτη, η οποία δυσχεραίνει την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του αλλά και της διαλυτικής του ικανότητας, αφού εμποδίζει τη διείσδυση του στη μήτρα εκχύλισης [34]. Σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες, πολλά είδη NADES είναι σχετικά ιξώδη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος [33]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δεσμοί υδρογόνου είναι ισχυροί και καθιστούν τον διαλύτη παχύρρευστο, με χαμηλότερη ικανότητα διαλυτοποίησης [23]. Ο περιορισμός αυτός τις περισσότερες φορές αντιμετωπίζεται αυτός με τη προσθήκη νερού ή με θέρμανση του διαλύτη, έτσι ώστε να μειωθεί το ιξώδες [13,23,25]. Προτιμότερη είναι η προσθήκη του νερού ως μια πιο πράσινη αντιμετώπιση, δεδομένου ότι η θέρμανση είναι μια ενεργοβόρα διαδικασία και πιθανώς επιβλαβής για θερμοευαίσθητες ουσίες [13]. Η προσθήκη αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την σύνθεση του NADES, με το νερό ως το τρίτο συστατικό του διαλύτη. Ωστόσο, ενδείκνυται προσοχή έτσι ώστε το προστιθέμενο νερό να μην υπερβαίνει το 50% κατ' όγκο (μερικές φορές 40%) της ποσότητας του διαλύτη [13,23]. Η επισήμανση αυτή αναφέρεται διότι σε αυτές τις περιπτώσεις, υπάρχει κίνδυνος πλήρους διάσπασης του δικτύου δεσμών υδρογόνου με συνέπεια την ολική καταστροφή του NADES και μείωση της αποτελεσματικότητας του [13,23]. Κάτω από αυτή την αναλογία, το νερό είναι αναπόσπαστο μέρος του NADES και λειτουργεί ως τρίτο συστατικό, συμβάλλοντας στον έλεγχο του συστήματος [23]. Ορισμένες φορές, το ιξώδες μπορεί να οφείλεται επίσης στη σύσταση και την αναλογία δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνων στο μίγμα, προτού πραγματοποιηθεί διαλυτοποίηση. Συγκεκριμένα, αύξηση στην περιεκτικότητα HBD μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ιξώδους του NADES [13]. Σημειώνεται επίσης, ότι πολλοί NADES αποτελούνται από υδροσκοπικό υλικό, ιδίως η χλωριούχος χολίνη, που σημαίνει ότι, κατά την αποθήκευση, η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να αυξηθεί στον διαλύτη ή στο προκύπτον εκχύλισμα [23]. Για ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε νερό και τον έλεγχο του κρίσιμου σημείου καταστροφής του NADES, πραγματοποιούνται έλεγχοι μέσω της Φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier ή του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού [23].



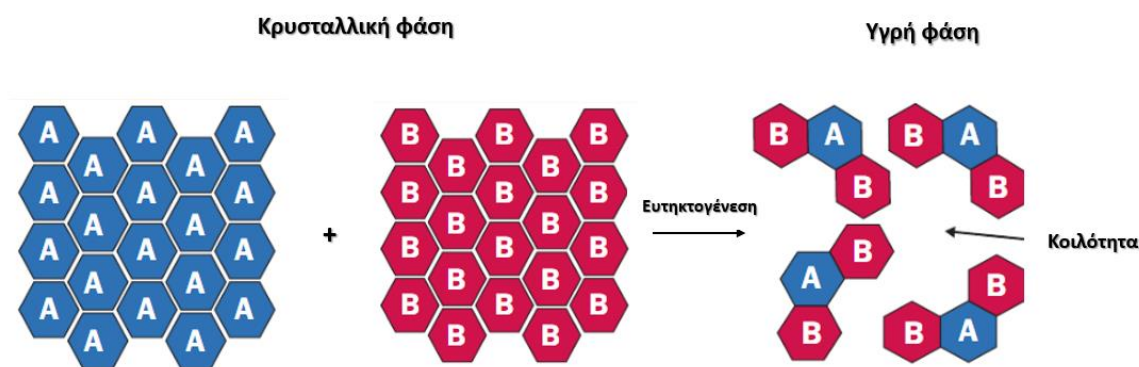
### 1.5.2.3 Πυκνότητα

Η πυκνότητα αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό ενός διαλύτη και επηρεάζει το ιξώδες του. Πρόκειται για μια ιδιότητα που εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μείωση της πυκνότητας του διαλύτη [23]. Η σχέση αυτή να οφείλεται στον χώρο που δημιουργείται εξαιτίας της κίνησης των μορίων σε υψηλές θερμοκρασίες [23]. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών πιθανό να επηρεάσουν την πυκνότητα ενός NADES. Για παράδειγμα, όσο πιο πλούσιο σε αλληλεπιδράσεις Van der Waals και σε δεσμούς υδρογόνου είναι ένα σύστημα, τόσο πιο πυκνός και παχύρρευστος θα είναι ο διαλύτης [23]. Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να μεταβάλλει την πυκνότητα είναι η προσθήκη νερού. Όταν είναι επιθυμητή η αύξηση της, πραγματοποιείται προσθήκη νερού με στόχο τη δημιουργία περισσότερων δεσμών υδρογόνου [23]. Όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη αυτή πρέπει να γίνει ελεγχόμενα, έτσι ώστε να μην καταστραφεί ο διαλύτης (<50%) [13,23].

### 1.5.2.4 Διαλυτική ικανότητα

Οι ειδικές ιδιότητες ενός NADES μπορούν να αποδοθούν στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ή διατάξεις της μήτρας του [33]. Για παράδειγμα, η παρουσία ομάδων υδροξυλίου σε οποιοδήποτε συστατικό του NADES προωθεί τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός σταθερότερου διαλύτη [13]. Μέχρι στιγμής, έχουν προταθεί δύο βασικές θεωρίες για να εξηγήσουν την διαλυτική ικανότητα των NADES: η θεωρία των κενών ή των υγρών κρυστάλλων και η θεωρία δέσμευσης.

Σύμφωνα με τη θεωρία των κενών, η εσωτερική δομή ενός NADES σχηματίζει μια μήτρα που μοιάζει με πολυμερές και η διαλυμένη ουσία μπορεί να διαλυθεί στο χώρο (ή τις οπές) αυτού του μοριακού δικτύου. Καθώς η αναλογία των συστατικών αλλάζει, η εσωτερική διάταξη όπως το μέγεθος και το σχήμα της οπής μήτρας του διαλύτη μπορεί να τροποποιηθεί σημαντικά [29,33]. Για παράδειγμα, καθώς η περιεκτικότητα σε νερό σε μια μήτρα NADES αλλάζει, το μέγεθος της οπής της μήτρας μπορεί να μεταβληθεί από επίπεδα μικρομέτρων σε νανόμετρα [33].

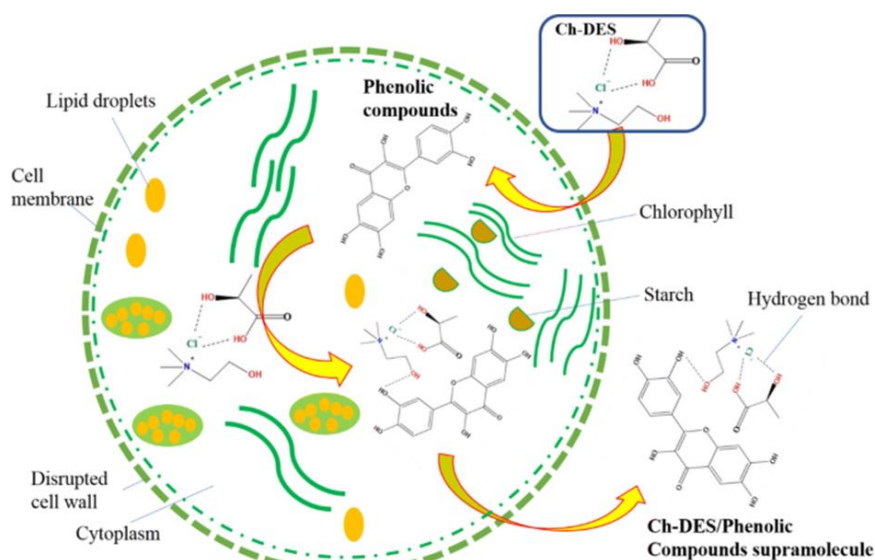


Εικόνα 9 Απεικόνιση ευτηκτογένεσης ενός NADES [29]

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9, τα μόρια του NADES κινούνται μόνο όταν υπάρχει επαρκές κενό κοντά τους. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση των μορίων σε ένα στερεό Α είναι αρκετά συμπαγής για να επιτρέψει κίνηση, γεγονός που σημαίνει ότι το κενό μεταξύ των μορίων είναι πολύ μικρό. Η κατανομή αυτή μπορεί να αποδυναμωθεί με την προσθήκη νέων μορίων (Β), τα οποία αλληλοεπιδρώντας με τα ήδη υπάρχοντα (Α) θα συμβάλλουν στη δημιουργία ενός λιγότερο συμπαγούς συστήματος [29]. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται κοιλότητες κοντά και στα δύο μόρια, επιτρέποντας την κίνηση τους με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός υγρού μείγματος [29].

Αναφορικά με τη θεωρία δέσμησης, οι διαλυμένες ουσίες-στόχοι γίνονται τμήματα της μήτρας NADES μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.

Στην Εικόνα 10 αναπαρίσταται ένα παράδειγμα μηχανισμού διάλυσης φαινολικών ενώσεων από NADES. Σημειώνεται ότι οι DESs με χολίνη παρουσιάζουν μια ιδιαίτερα ισχυρή διαλυτική ικανότητα για την φαινολική ένωση κερσετίνη χάρη στις ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται [33].



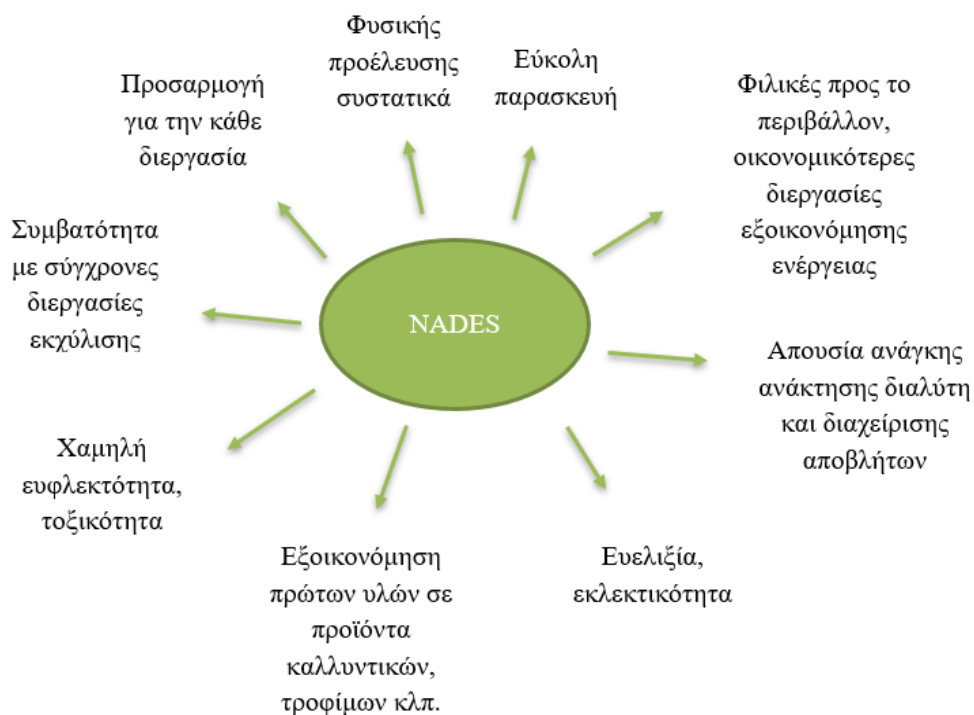
Εικόνα 10 Απεικόνιση διάλυσης φαινολικής ένωσης κερσετίνης σε DES αποτελούμενο από χολίνη και γαλακτικό οξύ (Ch-DES) [35]

### 1.5.2.5 Υδροφιλία/ Λιποφιλία

Τα συστήματα NADES περιλαμβάνουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα συστατικά. Τα υδρόφιλα συστατικά με άκρως ηλεκτραρνητικές ομάδες μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να εξηγήσει την τάση των υδρόφιλων μορίων NADES να αναμιγνύονται με πολικούς διαλύτες όπως το νερό και η MeOH [33]. Αντίθετα, οι λιπόφιλες ενώσεις διαφέρουν στην ικανότητα τους να δεσμεύουν υδρογόνο μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Για αυτό το λόγο, παραμένουν παθητικοί συμμετέχοντες στο φαινόμενο της ισορροπίας υδροφιλία/ λιποφιλικότητας [33]. Ωστόσο, εντοπίζονται ορισμένοι NADES οι οποίοι παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα δυαδικότητα λιποφιλικότητας και υδροφιλικότητας [33].

### 1.5.3 Πλεονεκτήματα NADES

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των NADES έναντι των ILs & DESs βασίζονται στον ανανεώσιμο, βιοδιασπώμενο και εύκολα συντονίσιμο χαρακτήρα τους [23]. Συγκεκριμένα, χάρη στην φυσική τους προέλευση και εύκολη παρασκευή, κρίνονται οικονομικά αποδοτικοί, χαρακτηριστικό εξαιρετικά σημαντικό για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπλέον, οι διαλύτες είναι στοχευμένα σχεδιασμένοι και η επιλογή των συστατικών γίνεται με κριτήριο την διεργασία στην οποία θα εφαρμοστούν. Πρόκειται για διαλύτες συμβατούς με σύγχρονες διεργασίες εκχύλισης (π.χ υπερήχους, μικροκύματα) οι οποίοι παρουσιάζουν μηδενική τάση ατμών [23,32]. Η χαρακτηριστικά χαμηλή ευφλεκτικότητα και τοξικότητα τους, καθιστά τους NADES φιλικούς προς το περιβάλλον και ιδανικούς για εφαρμογές σε τρόφιμα, καλλυντικά, αγροχημικά και φάρμακα [23,32,50]. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι τα περισσότερα προαναφερόμενα προϊόντα περιέχουν ήδη ορισμένα από τα συστατικά των NADES, με την προτίμηση αυτών των διαλυτών επιτυγχάνεται εξοικονόμηση πρώτων υλών. Ωστόσο, για λόγους ασφαλείας, πρώτου ενταχθούν σε οποιαδήποτε παραγωγική διαδικασία, είναι απαραίτητη η αξιολόγηση του μίγματος των συστατικών [32]. Ένα ακόμη αξιοσημείωτο προτέρημα των NADES είναι η ευελιξία και εκλεκτικότητα τους ως διαλύτες για όλα τα είδη ενώσεων [32]. Συγκεκριμένα, τα συστατικά τους μπορεί να είναι πολικές ή μη πολικές, υδρόφιλες ή υδρόφοβες ενώσεις και μπορούν να προσαρμοστούν για οποιαδήποτε περίπτωση, παρέχοντας έτσι νέες δυνατότητες για στοχευμένες τεχνικές εκχύλισης και νέα φυτικά εκχυλίσματα [13,23]. Τέλος, σε αντίθεση με τους συμβατικούς διαλύτες, δεν απαιτείται ανάκτηση των NADES μετά το πέρας της διεργασίας. Ταυτόχρονα, σε αντίθεση με τους οργανικούς διαλύτες, δεν απαιτείται διαχείριση των παραγομένων αποβλήτων, με αποτέλεσμα την μείωση δύο κοστοβόρων και ενεργοβόρων σταδίων διεργασίας [13,23]. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα προαναφερόμενα πλεονεκτήματα.



Σχήμα 4 Πλεονεκτήματα NADES

#### 1.5.4 Περιορισμοί σχετικά με τους NADES και αντιμετώπιση τους

Η ένταξη των NADES σε όλο και περισσότερες διεργασίες έχει γεννήσει κάποιες εύλογες ανησυχίες. Αρχικά, η χρήση NADES στη θέση ενός συμβατικού διαλύτη οδηγεί σε αύξηση των λειτουργιών μιας μονάδας, λόγω του πρόσθετου βήματος προετοιμασίας του διαλύτη. Ωστόσο, η αύξηση αυτή ισοσταθμίζεται με την απουσία ανάγκης απομάκρυνσης του διαλύτη καθώς και διαχείριση αποβλήτων [13,23]. Παράλληλα, ένα πιθανό περιορισμό ορισμένων NADES αποτελεί το υψηλό ιξώδες τους. Συγκεκριμένα, για βιομηχανικές διεργασίες μεγάλης κλίμακας, η αντιμετώπιση εξαιρετικά παχύρρευστων μη πτητικών διαλυμάτων καθαρών ενώσεων ή εκχυλισμάτων αποτελεί μια πρόκληση [23,32]. Ωστόσο, η ιξώδης σύσταση αυτών τους μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ελεγχόμενη προσθήκη νερού, εξοικονομώντας ταυτόχρονα ποσότητα διαλύτη. Επιπλέον, για την πλήρη ανάκτηση της αναλύομενης ουσίας, κρίνεται σημαντική η εύρεση μεθόδων για την εξάλειψη του NADES, καθώς δεν μπορεί να εξατμιστεί. Πιθανή απάντηση σε αυτό το πρόβλημα αποτελεί ο συνδυασμός της διεργασίας με υπερκρίσιμη εκχύλιση καθώς και χρωματογραφική επεξεργασία [32,33]. Μια ακόμη πιθανή λύση αποτελεί η χρήση ενός αντιδραστήριου που λειτουργεί ως αντιδιαλύτης, δηλαδή διαλύει το NADES και όχι την αναλύομενη ένωση. Τέλος, είναι περιορισμένα τα συστήματα NADES τα οποία είναι αφιερωμένα σε μη πολικούς μεταβολίτες, παρά την επείγουσα ανάγκη για πιο πράσινες εναλλακτικές έναντι των αλκανίων [23]. Ωστόσο, η απάντηση στους προαναφερόμενους φραγμούς μπορεί να βρεθεί στον επανασχεδιασμό των διαλυτών ή στην αναζήτηση νέων τεχνολογιών [23]. Στον Πίνακα 8 συγκεντρώνονται συνοπτικά οι παραπάνω παρατηρήσεις.

Πίνακας 8 Περιορισμοί σχετικά με τους NADES και επίλυση τους

Περιορισμοί	Επίλυση
Αύξηση λειτουργιών μονάδας για Παρασκευή NADES	Αντιστάθμιση χάρη στην απουσία ανάγκης ανάκτησης διαλύτη και διαχείρισης αποβλήτων
Ύπαρξη NADES με μεγάλο ιξώδες	Προσθήκη νερού, θέρμανση
Αδυναμία πλήρους ανάκτησης αναλυόμενης ουσίας λόγω αδυναμίας εξάτμισης NADES	Συνδυασμός με υπερκρίσιμη εκχύλιση, χρωματογραφική επεξεργασία, χρήση αντιδιαλύτη
Ελλιπή μη πολικά συστήματα NADES	Επανασχεδιασμός διαλυτών, αναζήτηση νέων τεχνολογιών

### 1.5.5 Εφαρμογές NADES

Χάρη στην εύκολη σύνθεση τους, ισχυρή διαλυτική ικανότητα και έλλειψη τοξικότητας, οι NADES βρίσκουν πλέον εφαρμογή σε όλο και περισσότερες διεργασίες, λειτουργώντας για παράδειγμα ως χρωματογραφικά ή εκχυλιστικά μέσα [32,33]. Ορισμένες χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι η συμμετοχή τους σε ποικίλες ενζυμικές και χημικές διεργασίες, όπως την εκχύλιση φυσικών συστατικών, τη διαλυτοποίηση μακρομορίων και την χορήγηση καλλυντικών, φαρμακευτικών και αγροχημικών συστατικών [32,33].

#### 1.5.5.1 Εκχύλιση με χρήση NADES

Μια από τις βασικότερες και πιο συνηθισμένες εφαρμογές των NADES είναι η ένταξη τους σε διεργασίες εκχύλισης. Στην προσπάθεια αντικατάστασης του νερού αλλά και πετροχημικών διαλυτών όπως αιθανόλης, ακετόνης, οι NADES αναδεικνύονται για την μοναδική φυτοχημική τους υπογραφή και βιοαποικοδομησιμότητα. Χαρακτηριστική ιδιότητα τους είναι η υψηλή ικανότητα εκχύλισης φυσικών προϊόντων καθώς και η διαλυτοποίηση ενός ευρέως φάσματος οργανικών και ανόργανων ενώσεων [23] Όσο υψηλότερη είναι η συγγένεια των φυτοχημικών του διαλύτη με την πρώτη ύλη, τόσο καλύτερη αναμένεται να είναι και η μεταφορά τους σε αυτόν [25]. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω ιδιότητες αλλά και τα προτερήματα που αναφέρθηκαν στην Ενότητα 1.5.3, οι NADES μπορούν να χαρακτηριστούν ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική διαλυτών στις σύγχρονες βιομηχανίες.

### 1.5.5.1.1 Παράμετροι εκχύλισης

#### *Θερμοκρασία*

Όπως προαναφέρθηκε στις ιδιότητες των NADES, η θερμοκρασία αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει το ιξώδες και την πυκνότητα του διαλύτη. Συγκεκριμένα, με υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνεται μείωση της ιξώδους σύστασης με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της εκχύλισης. Επιπλέον, χάρη στις υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνεται η μοριακή κινητικότητα έτσι ώστε τα εκχυλισμένα μόρια να διαχέονται στον διαλύτη πιο γρήγορα [13]. Το επιθυμητό εύρος θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση κυμαίνεται συνήθως από 25°C έως περίπου 60°C. Ενδείκνυται προσοχή έτσι ώστε η θερμοκρασία να μην υπερβαίνει αυτό το όριο για αποφυγή μια ενεργοβόρας διεργασίας καθώς και καταστροφής θερμοευαίσθητων ουσιών που πιθανό να περιέχονται στο σύστημα [13].

#### *Χρόνος*

Ο χρόνος στον οποίο πραγματοποιείται η εκχύλιση ποικίλει ανάλογα με το κόστος και την αποτελεσματικότητα της διεργασίας. Συγκεκριμένα, μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης σχετίζονται με αύξηση του κόστους, ενώ κατά τις βραχυπρόθεσμες εκχυλίσεις είναι πιθανή η ατελής μεταφορά των δραστικών ουσιών από το δείγμα στον διαλύτη, καθιστώντας τη διαδικασία αναποτελεσματική [13].

#### *Αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη*

Εξίσου σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την διεργασία της εκχύλισης είναι η αναλογία του δείγματος για εκχύλιση προς το διαλύτη. Μικρές ποσότητες πρώτης ύλης συμβαδίζουν με μικρή παραγωγικότητα ενώ μεγάλες ποσότητες ενισχύουν τον κίνδυνο κατάπνιξης του διαλύτη και πολύ αργής διασποράς του στο δείγμα [13]. Και οι δύο περιπτώσεις σε ακραίες συνθήκες δυσχεραίνουν την εφαρμογή της διεργασίας σε μεγαλύτερη κλίμακα.

#### *Ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη*

Ορισμένες φορές, για λόγους κόστους ή υποβοήθησης του NADES, προστίθεται νερό ως συνδιαλύτης κατά την διεργασία της εκχύλισης. Δεδομένου ότι ορισμένα NADES έχουν αυξημένο ιξώδες, η προσθήκη νερού ενδείκνυται με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.5.2, το ποσοστό νερού που προστίθενται πρέπει να είναι ελεγχόμενο έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας ενός συστήματος εκχύλισης ρευστού και της διατήρησης του πλέγματος δεσμών υδρογόνου του DES, χωρίς να προκληθεί καταστροφή του διαλύτη [13].

### 1.5.5.2 Χρήση των NADES σε καλλυντικές εφαρμογές

Οι σύγχρονες βιομηχανίες σχετιζόμενες φαρμακευτική, διατροφική και καλλυντική παραγωγή, εξερευνούν πλέον πράσινες εναλλακτικές για να εφαρμόσουν στις διεργασίες τους, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την χρήση NADES. Χάρη στην συμβατότητα τους με μόρια όπως DNA και ένζυμα, οι NADES κρίνονται αρκετά ελκυστικοί για διεργασίες βιομετασχηματισμού, επεξεργασίας βιομάζας, εκχύλισης κ.ά. [36]. Συγκεκριμένα, η τεχνολογία εκχύλισης τους μπορεί να μιμηθεί τις διαδικασίες που χρησιμοποιούν τα φυτά για να διαλυτοποιήσουν τα βασικά τους μόρια (φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες και πολυμερή) [36]. Αντίστοιχα, εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως διαλύτες καλλυντικής χρήσης καθώς προσφέρουν τρία ισχυρά πλεονεκτήματα σε βιομηχανικές εφαρμογές [25]:

- είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου,
- μπορούν να βασίζονται σε βιολογικά προϊόντα
- είναι διαθέσιμα σε μεγάλη κλίμακα, σε λογική τιμή

Λαμβάνοντας υπόψη το ευρύ φάσμα συστατικών που απαιτούνται για τη σύνθεση καλλυντικών (έλαια, μαλακτικά, επιφανειοδραστικά, συντηρητικά, παράγοντες υφής, δραστικά και βοηθητικά, χρωστικές ουσίες, άρωμα), κρίνεται αναγκαία μια πράσινη παρέμβαση προσδίδοντας έναν ασφαλή, βιοαποικοδομήσιμο και ανακυκλώσιμο χαρακτήρα στα προκύπτοντα προϊόντα [25].

#### 1.5.5.2.1 Προϋποθέσεις ένταξης συστατικών σε καλλυντικά προϊόντα

Μερικές από τις βασικές προϋποθέσεις για την εισαγωγή ενός NADES σε καλλυντική παραγωγή είναι οι εξής [25]:

- 1) Τα συστατικά του πρέπει να μην περιλαμβάνονται στο Παράρτημα II του Ευρωπαϊκού Κανονισμού Καλλυντικών ΕΚ αριθμ. 1223/2009,
- 2) Θα πρέπει να είναι βιολογικά και διαθέσιμα σε λογικό κόστος, σε βιομηχανική κλίμακα,
- 3) Οι διαλύτες που προκύπτουν θα πρέπει να δείχνουν χαρακτηριστικά γνωρίσματα των NADES, συγκεκριμένα την υπερμοριακή τους δομή,
- 4) Οι διαλύτες θα πρέπει να έχουν χαμηλό ή ρυθμιζόμενο ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να επιτρέπεται η ομοιογενής διασπορά του φυτικού υλικού καθώς και ο εύκολος διαχωρισμός στερεού/ υγρού,
- 5) Τα μείγματα είναι απαραίτητο να επιδεικνύουν μακροπρόθεσμη σταθερότητα, συμπεριλαμβανομένης της μικροβιακής σταθερότητας, μόνα τους ή σε συνδυασμό με συστήματα πράσινων συντηρητικών,
- 6) Οι διαλύτες θα πρέπει να είναι συμβατοί με κλασσικές συνθέσεις καλλυντικών όπως π.χ λοσιόν, κρέμες ή γέλες,
- 7) Οι διαλύτες προς χρήση πρέπει να επιδεικνύουν εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας.



#### 1.5.5.2 Βασικότερες ιδιότητες καλλυντικών συστατικών

##### *pH διαλυτών*

Το pH του δέρματος έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας για την επιδερμίδα και εξακολουθεί να ερευνάται από την επιστημονική κοινότητα. Σήμερα, είναι αποδεκτό ότι το επιδερμικό pH κυμαίνεται από 4,1 έως 5,8, ανάλογα με το μέρος του σώματος [37]. Το όξινο αυτό pH έχει αναγνωριστεί ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη διατήρηση της ομοιόστασης της στιβάδας κεράτινης και της διαπερατότητας του δέρματος. Οι πιο σημαντικές λειτουργίες του φαίνεται να σχετίζονται με τη διαδικασία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, το σχηματισμό και τη λειτουργία των επιδερμικών λιπιδίων και του περιβλήματος των λιπιδίων του κερατοκυττάρου, τη διατήρηση του μικροβιώματος του δέρματος και, κατά συνέπεια, δερματικές διαταραχές και ασθένειες [37]. Για αυτό τον λόγο, είναι κοινώς αποδεκτό ότι τα τοπικά προϊόντα που προορίζονται για επιδερμική χρήση πρέπει να έχουν pH στην περιοχή από 4 έως 6 [37]. Συνεπώς, ένας ελαφρώς όξινος διαλύτης αποτελεί μια ελκυστική επιλογή για καλλυντικές διεργασίες.

##### *Τοξικότητα*

Μια από τις βασικότερες προϋποθέσεις για την έγκριση ενός καλλυντικού προϊόντος αποτελεί η απουσία τοξικότητας. Πρόκειται για μια ιδιότητα η οποία εξετάζεται πάντα στα συστατικά που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν αλλά και στο προκύπτον προϊόν με τεστ κυτταροτοξικότητας. Παρόλο που πολλοί διαλύτες μπορεί να θεωρούνται αποδοτικοί ή «πράσινοι», δεν είναι πάντα σίγουρο ότι θα καταφέρουν να ενταχθούν σε μια καλλυντική παραγωγή. Για παράδειγμα, λόγω της ξηραντικής της φύσης, η αιθανόλη μπορεί να διαταράξει το υδρολιπιδικό φιλμ του δέρματος και να προκαλέσει αισθήσεις δυσφορίας σε ανθρώπους με ευαίσθητο δέρμα [25]. Αντίστοιχα, η χλωριούχος χολίνη θεωρείται ως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ένωση για τη σύνθεση NADES. Ωστόσο, η ίδια και τα παράγωγά της απαγορεύονται στα καλλυντικά στην Ευρώπη (Ευρωπαϊκός κανονισμός για τα καλλυντικά ΕΚ αριθ.1223/2009, παράρτημα II) [25]. Για αυτό τον λόγο, κρίνεται απαραίτητη η χρήση ήπιων συστατικών των οποίων είναι χαρακτηριστική η απουσία τοξικότητας.

##### *Μικροβιακή ασφάλεια*

Η μικροβιολογική ασφάλεια κρίνεται απαραίτητη για τα συστατικά των καλλυντικών. Συγκεκριμένα, τα καλλυντικά προϊόντα δεν πρέπει περιέχουν περισσότερα από 100–1000 CFU/mL ολικού βιώσιμου αερόβιου μεσόφιλου μικροοργανισμών και παθογόνοι όπως *Staphylococcus aureus* ή *Escherichia coli* θα πρέπει να απουσιάζουν [25]. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι το νερό και θρεπτικά συστατικά όπως τα σάκχαρα ευνοούν την ανάπτυξη βακτηρίων. Για αυτό το λόγο, στα καλλυντικά συστατικά εφαρμόζονται πάντα έλεγχοι για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μικροβιακής διατήρησης [25].

Κλείνοντας, είναι προφανές ότι τα κριτήρια για την ένταξη ενός διαλύτη σε ένα καλλυντικό προϊόν είναι πολυάριθμα και αυστηρά. Ο εν λόγω διαλύτης πρέπει να είναι παρουσιάζει καλή μικροβιακή ασφάλεια και να είναι παράλληλα απόλυτα συμβατός με τα τυπικά καλλυντικά σκευάσματα. Τέλος, κρίνεται απαραίτητη η ανοχή του από τα ανθρώπινα κύτταρα του δέρματος [25].



## 1.6 Πειραματικός Σχεδιασμός σε διεργασίες εκχύλισης

Βασικό εργαλείο κατά την μελέτη των βέλτιστων συνθηκών μιας διεργασίας εκχύλισης αποτελεί η μέθοδος του πειραματικού σχεδιασμού. Πρόκειται για μια διαδικασία διεξαγωγής έρευνας με στόχο τον ακριβή προσδιορισμό της επίδρασης ενός παράγοντα ή ανεξάρτητης μεταβλητής σε μια εξαρτημένη μεταβλητή.

### 1.6.1 Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης (RSM)

Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή εκφράζεται συχνά μέσω της Μεθοδολογίας Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology; RSM). Πρόκειται για μια αρχή που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Box και Wilson (1951) [38]. Αφορά μια συλλογή στατιστικών και μαθηματικών μεθόδων, χρήσιμων για τη μοντελοποίηση και ανάλυση μηχανικών προβλημάτων [39]. Στην εν λόγω τεχνική, βασικό στόχο αποτελεί η βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης, η οποία επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους της διαδικασίας [39]. Παράλληλα, η RSM ποσοτικοποιεί τη σχέση μεταξύ των ελεγχόμενων παραμέτρων εισόδου και των λαμβανόμενων επιφανειών απόκρισης [39]. Υποθέτοντας ότι όλες οι μεταβλητές είναι μετρήσιμες, η επιφάνεια απόκρισης μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) \text{ (Εξίσωση 1)}$$

όπου  $y$  είναι η απάντηση του συστήματος και  $x_i$  οι μεταβλητές δράσης που ονομάζονται παράγοντες [39].

Συνήθως, χρησιμοποιείται εξίσωση μοντέλου πολυωνυμικής παλινδρόμησης δεύτερης τάξης για να εκφράσει τη σχέση μεταξύ της προβλεπόμενης απόκρισης και των παραμέτρων της διαδικασίας, της μορφής:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{(Εξίσωση 2) [40] όπου:}$$

- $Y$  = η προβλεπόμενη απόκριση
- $\beta_0$  = ο σταθερός όρος
- $\beta_i$  = ο γραμμικός συντελεστής
- $\beta_{ii}$  = ο τετραγωνικός συντελεστής
- $\beta_{ij}$  = ο συντελεστής αλληλεπίδρασης

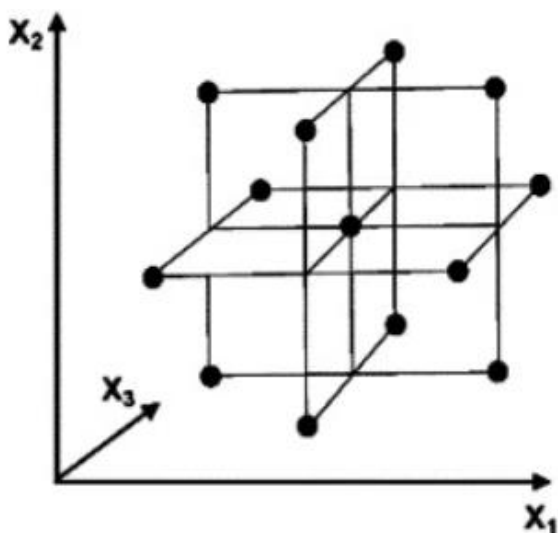
Μια τυπική μελέτη RSM ξεκινά με έναν ορισμό του προβλήματος (τι πρόκειται να μετρηθεί, πώς πρέπει να μετρηθεί, ποιες μεταβλητές πρέπει να μελετηθούν, σε ποιες περιοχές πρόκειται να διερευνηθούν, κ.λπ.) [38]. Τα βασικότερα στάδια της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης είναι [38,39]:

- 1) Στατιστικός σχεδιασμός μιας σειράς πειραμάτων που στοχεύουν στην επαρκή και αξιόπιστη μέτρηση της απόκρισης ενδιαφέροντος.
- 2) Ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου επιφάνειας απόκρισης συναρτήσει των παραμέτρων εισόδου.
- 3) Εύρεση του βέλτιστου συνόλου πειραματικών παραμέτρων που παράγουν μια μέγιστη ή ελάχιστη τιμή απόκρισης.
- 4) Αναπαράσταση των άμεσων και διαδραστικών επιδράσεων των παραμέτρων διεργασίας μέσω δισδιάστατων και τρισδιάστατων γραφημάτων καθώς και μελέτη της επιφάνειας απόκρισης στην περιοχή ενδιαφέροντος.
- 5) Έλεγχος επάρκειας της εξίσωσης.

### 1.6.2 Σχέδιο Box-Behnken

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με μεθόδους παραγοντικού σχεδιασμού όπως το σχέδιο Box-Behnken, μειώνοντας τον αριθμό των πειραματικών συνόλων χωρίς να υποβαθμίζεται η ακρίβεια της βελτιστοποίησης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους σχεδιασμού [41].

Το εργαλείο Box-Behnken επινοήθηκε από τους G. E. P. Box και D. Behnken το 1960 και αποτελείται από περιστρεφόμενα σχέδια δεύτερης τάξης βασιζόμενα σε ημιτελή σχέδια παραγόντων τριών επιπέδων [39]. Για παράδειγμα, για τρεις παράγοντες, το σχέδιο απεικονίζεται παρακάτω ως ένας πολυδιάστατος κύβος αποτελούμενος από ένα κεντρικό σημείο και τα μεσαία σημεία των ακμών:



Εικόνα 11 Αναπαράσταση ενός κλασσικού σχεδίου Box-Behnken για 3 παράγοντες [39]

Ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτείται να πραγματοποιηθούν κατά το σχέδιο Box-Behnken, υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$N = 2k(k-1) + C_0$  (Εξίσωση 3) όπου:

- $k$  = ο αριθμός των παραγόντων
- $C_0$  = ο αριθμός των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου

Μια τυπική κωδικοποίηση του σχεδίου Box-Behnken περιλαμβάνει τρία βασικά επίπεδα: το -1 ως το κατώτερο επίπεδο ενός παράγοντα, το +1 ως το ανώτερο επίπεδο και το 0 ως το μεσαίο (κεντρικό) επίπεδο. Κατά την διεξαγωγή της μεθόδου αυτής, συνηθίζεται να πραγματοποιούνται επαναλήψεις ορισμένων σημείων του σχεδιασμού με στόχο την εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος, δηλαδή του αναμενόμενου σφάλματος στην απόκριση εάν το πείραμα επαναληφθεί ξεκινώντας από την αρχή. Συνήθως, βασικότερο σημείο πολλαπλών επαναλήψεων αποτελεί το κεντρικό σημείο, στοχεύοντας σε μια επαρκή εκτίμηση της διακύμανσης της απόκρισης και παρέχοντας τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας που απαιτούνται για μια επαρκή στατιστική δοκιμή του μοντέλου.

### 1.6.3 Παράμετροι εκχύλισης προς μελέτη

Σε μια διεργασία εκχύλισης, υπάρχουν πολλαπλοί παράγοντες που πιθανό να επηρεάσουν τη βιοδραστικότητα και ποιότητα των εκχυλισμάτων. Μερικά παραδείγματα αποτελούν η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης καθώς και η ποσότητα πρώτης ύλης και νερού στο διαλυτικό μέσο. Στοχεύοντας πάντα σε πράσινες, λιγότερο ενεργοβόρες διεργασίες, μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στις παρακάτω παραμέτρους:

#### *Χρόνος εκχύλισης*

Κατά την διεξαγωγή μιας διεργασίας εκχύλισης, πολύ σημαντική παράμετρο για την ποιότητα του εκχυλίσματος αποτελεί ο χρόνος στον οποίο η πρώτη ύλη θα εκχυλιστεί. Για κάθε πρώτη ύλη, η επιρροή του χρόνου είναι διαφορετική, ωστόσο αποφεύγεται πάντα η επιλογή χρονικά ακραίων εκχυλίσεων.

#### *Ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη*

Όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενες ενότητες, η παρουσία του νερού σε έναν διαλύτη επηρεάζει εξίσου σημαντικά την διεργασία της εκχύλισης. Για αυτό το λόγο, κρίνεται αναγκαία η προσθήκη ποσότητας νερού τέτοιας ώστε να εξοικονομείται διαλύτης ενώ ταυτόχρονα να διευκολύνεται η εκχύλιση, αποφεύγοντας όμως την αλλοίωση του.

#### *Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη*

Έναν εξίσου σημαντικό παράγοντα προς μελέτη αποτελεί η αναλογία της μάζας πρώτης ύλης προς εκείνη του διαλύτη. Πρόκειται για μια παράμετρο που μπορεί να ορίσει το όριο της διαλυτικής ικανότητας ενός διαλύτη και κατά συνέπεια το όριο στο οποίο μια εκχύλιση είναι αποδοτική. Συνήθως, επιδιώκεται μια ισορροπία μεταξύ πρώτης ύλης και διαλύτη.

## Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανάπτυξη μιας εναλλακτικής, φιλικότερης προς το περιβάλλον, αποδοτικής και βιώσιμης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το υπάνθιο του καρπού του φυτού *Rosa Canina* L.. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η χρήση στοχευμένα σχεδιασμένων πράσινων διαλυτών όπως είναι οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί διαλύτες (NADESs). Επιπρόσθετο στόχο αποτελεί η βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με χρήση πειραματικού σχεδιασμού αξιοποιώντας ως παραμέτρους απόκρισης το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή (TPC, TFC) καθώς και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (IC<sub>50</sub>, DPPH). Αντίστοιχα, ως παράμετροι προς μελέτη χαρακτηρίζονται ο χρόνος της εκχύλισης, το ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη και η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη.

### 2.2 Όργανα και συσκευές

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης αναγράφονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Όργανο	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακρίβειας (g)	TechnoLab	KERN adj
Ζυγός ακρίβειας (mg)	Sartorius	PRO 11
Μαγνητικός αναδευτήρας με Θερμαινόμενο μάτι	Radleys Discovery Technologies	RR98072
Αναδευτήρας Vortex	Ibx instruments	VO5 series
Φυγόκεντρος	MSE	-
Φασματοφωτόμετρο Uv-vis	BioTek	EPOCH2
Περιστροφικός εξατμιστής	Büchi	Büchi Rotavapor R-144
Πεχάμετρο	Metrohm	-

## 2.3 Αντιδραστήρια και πρώτες ύλες

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Αντιδραστήριο	Μοριακός Τύπος	Προμηθευτής
Φρουκτόζη	$C_6H_{12}O_6$	Ζωγράφος
D-γλυκερόλη	$C_3H_8O_3$	Penta
Βεταΐνη	$C_5H_{11}NO_2$	Fluorochem
Ουρία	$CH_4N_2O$	PENTA
Γλυκίνη	$C_2H_5NO_2$	Sigma Aldrich
D-Γλυκόζη	$C_6H_{12}O_6$	Sigma Aldrich
L-Προλίνη	$C_5H_9NO_2$	Sigma Aldrich
Απιονισμένο νερό	$H_2O$	-
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	-	Carlo Erba Reagents
Ανθρακικό νάτριο	$Na_2CO_3$	Fluka
Καυστικό νάτριο	$NaOH$	PENTA
Νιτρικό νάτριο 5% w/v	$NaNO_2$	Fluka
Χλωριούχο αργίλιο 10% w/v (ένυδρο)	$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	Fluka
Κατεχίνη	$C_{15}H_{14}O_6$	Sigma Aldrich
Γαλλικό οξύ	$C_7H_6O_5$	Merck Millipore
DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	TGI
Ασκορβικό οξύ	$C_6H_8O_6$	Sigma Aldrich
Αιθανόλη	$C_2H_5OH$	Fisher Scientific
Ερυθρό του Νείλου	$C_{20}H_{18}N_2O_2$	Glenthams Life Sciences

Γένος φυτού	Μέρος φυτού	Προμηθευτής
<i>Rosa Canina</i> L.	Υπάνθιο	KORRES Natural Production S.A.

## 2.4 Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιείται η πράσινη διεργασία εκχύλισης του υπάνθιου των καρπών του φαρμακευτικού φυτού *Rosa Canina* L. Συγκεκριμένα, από τους καρπούς του φυτού αντλείται το υπάνθιο το οποίο, μετά από απαραίτητη προκατεργασία, υποστεί εκχύλιση με χρήση NADES και συστημάτων NADES-Νερού ως εκχυλιστικό μέσο. Για τη συγκεκριμένη διεργασία εξετάζονται δύο NADES οι οποίοι πληρούν προϋποθέσεις όπως: να προχέρχονται από φυσικά, βιοσυμβατά και μη τοξικά συστατικά καθώς επίσης το κόστος σύνθεσης να είναι χαμηλό. Ως διαλύτες αναφοράς, μελετώνται το νερό καθώς και το σύστημα αιθανόλης/ νερού, δεδομένου ότι πρόκειται για δύο από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους συμβατικούς διαλύτες σε διεργασίες εκχύλισης [42].

Όλα τα εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται ως προς την βιοδραστικότητά τους, χρησιμοποιώντας τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους (α) για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φαινολικές και (β) φλαβονοειδής ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC και Total Flavonoid Content, TFC αντιστοίχως) καθώς και την αντιοξειδωτική τους δράση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH.

Για να βελτιστοποιηθεί η διεργασία εκχύλισης, διενεργείτε πειραματικός σχεδιασμός και πραγματοποιείται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ώστε να εξαχθεί το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ικανοποιητικά την κάθε απόκριση (TPC, TFC, αντιοξειδωτική δράση) συναρτήσει των επιλεγμένων παραγόντων (ο χρόνος εκχύλισης, το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη στην εκχύλιση καθώς και η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς τον διαλύτη). Συγκεκριμένα, μέσω του υπολογιστικού εργαλείου Design Expert, (σχέδιο Box-Behnken, trial version) πραγματοποιούνται πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης κατά τις οποίες επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση των επιλεγμένων αποκρίσεων που είναι (i) το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις και (ii) φλαβονοειδή καθώς και η (iii) αντιοξειδωτική δράση. Τέλος, μελετάται η επίδραση της κάθε παραμέτρου στη βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και εξετάστηκε η εγκυρότητα του προκύπτον μοντέλου. Η πειραματική αυτή διαδικασία αναλύεται στις παρακάτω ενότητες.

### 2.4.1 Προκατεργασία πρώτης ύλης

Πρώτο βήμα κατά την προκατεργασία της στερεής πρώτης ύλης είναι η ξήρανση της και στη συνέχεια ο τεμαχισμός της με πολυκόφτη (Εικόνα 12). Μετέπειτα, ακολουθεί περεταίρω κονιοποίηση του δείγματος σε γουδί από το οποίο παραλαμβάνεται η πρώτη ύλη σε μορφή πούδρας (Εικόνα 13).



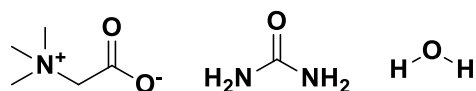
Εικόνα 12 Αποξηραμένο υπάνθιο του *R. Canina*

Εικόνα 13 Υπάνθιο του *R. Canina* σε μορφή πούδρας

### 2.4.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός διαλύτη

#### 2.4.2.1 Σύνθεση Φυσικών Βαθούς Ευτηκτικών Διαλυτών (NADES)

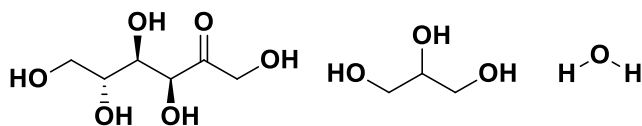
##### *Βεταΐνη: Ουρία: Νερό (BUW113)*



Σχήμα 5 Μοριακή δομή συστατικών του BUW113

Σε σφαιρική φιάλη, πραγματοποιείται ανάμιξη των τριών συστατικών σε μοριακή αναλογία 1:1:3. Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται 51 mmol βεταΐνης (6 g) με 51 mmol ουρίας (3,064 g) και 153 mmol νερού (2,754 g). Το μίγμα θερμαίνεται στους 60°C και μετά από ανάδευση για περίπου 10 λεπτά, παραλαμβάνεται ως ένα ομοιογενές και άχρωμο υγρό.

### Φρουκτόζη: Γλυκερόλη: Νερό (FGW115)



Σχήμα 6 Μοριακή δομή συστατικών του FGW115

Σε σφαιρική φιάλη, πραγματοποιείται ανάμιξη των τριών συστατικών σε μοριακή αναλογία 1:1:5. Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται 33 mmol φρουκτόζης (6 g) με 33 mmol γλυκερόλης (2,43 g) και 167 mmol νερού (3 g). Το μίγμα θερμαίνεται στους 60°C και μετά από ανάδευση για περίπου 10 λεπτά, παραλαμβάνεται ως ένα ομοιογενές και άχρωμο υγρό.

#### 2.4.2.2 Χαρακτηρισμός NADES

##### Προσδιορισμός πολικότητας

Για την ποσοτικοποίηση της πολικότητας του διαλύτη, γίνεται χρήση του δείκτη Ερυθρού του Νείλου ως διαλυτοχρωμικού ανιχνευτή. Σε μια κυψελίδα 1mm προστίθενται περίπου 2 mL του NADES και ακολουθεί φωτομέτρηση του ως τυφλό δείγμα με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-vis) στην περιοχή 400-700 nm. Στη συνέχεια, προστίθενται στην κυψελίδα 30-70  $\mu$ L διαλύματος Ερυθρού του Νείλου και πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση του συστήματος. Τέλος, προσδιορίζεται η μέγιστη απορρόφησή ( $\lambda_{max}$ ) στην περιοχή 400-700 nm [26]. Η ενέργεια μοριακής μετάβασης ENR υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{ENR (kcal}\cdot\text{mol}^{-1}) = 28591/\lambda_{max} \text{ (Εξίσωση 4)}$$

Υψηλές τιμές ENR υποδεικνύουν χαμηλότερη πολικότητα των ελεγχόμενων διαλυτών ενώ χαμηλές τιμές ENR υποδηλώνουν υψηλότερη πολικότητα στην κλίμακα πολικότητας του κόκκινου του Νείλου [26]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η πολικότητα του νερού έχει υπολογιστεί ως  $\text{ENR} = 48,20 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  ενώ της αιθανόλης  $52,17 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

##### Προσδιορισμός pH

Για τον προσδιορισμό του pH του NADES, γίνεται χρήση του ηλεκτρονικού πεχαμέτρου. Επιπλέον, μετράται το pH για αραιώσεις με περιεκτικότητα διαλύτη ίση με 50, 25, 12.5, 6.25% με στόχο την μελέτη επίδρασης του νερού στο pH του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου.



## **2.5 Εκχύλιση υπαινθίου *Rosa Canina L.* με τη μέθοδο θέρμανσης και ανάδευσης**

### **2.5.1 Εκχύλιση με σύστημα NADES-νερού ως εκχυλιστικό μέσο**

Σε μια σφαιρική φιάλη, τοποθετούνται 3g διαλύτη (NADES είτε σύστημα NADES-Νερού, αναλόγως τις απαιτήσεις του πειράματος) και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας της πούδρας του υπανθίου του άγριου τριαντάφυλλου, ανάλογα με την επιθυμητή αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη. Το σύστημα αυτό υποβάλλεται σε θέρμανση υπό ανάδευση με σταθερή θερμοκρασία ίση με 40°C, για καθορισμένο χρόνο. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα παραλαμβάνεται έπειτα από φυγοκέντρηση με απόχυση ή/και διήθηση υπό κενό, όπου κρίνεται απαραίτητο.

### **2.5.2 Εκχύλιση με σύστημα αιθανόλης-νερού ως εκχυλιστικό μέσο**

Σε μια σφαιρική φιάλη τοποθετούνται 4g διαλύτη (αιθανόλης και νερού, σε αναλογία 70:30) και ακολουθεί η προσθήκη 100 mg πούδρας του υπανθίου του άγριου τριανταφύλλου. Το σύστημα αυτό υποβάλλεται σε θέρμανση σε σταθερή θερμοκρασία ίση με 40°C και υπό ανάδευση με χρήση ψυκτήρα με αντιροή νερού, για διάρκεια μιας ώρας. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση και απόχυση του διαλύτη. Τέλος, ο διαλύτης απομακρύνεται οριστικά έπειτα από εξάτμιση υπό κενό σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα.

### **2.5.3 Εκχύλιση με νερό ως εκχυλιστικό μέσο**

Σε μια σφαιρική φιάλη, τοποθετούνται 4g διαλύτη και ακολουθεί η προσθήκη 100 mg πούδρας του υπανθίου. Το σύστημα αυτό υποβάλλεται σε θέρμανση σε σταθερή θερμοκρασία ίση με 40°C και υπό ανάδευση με χρήση ψυκτήρα, για διάρκεια μιας ώρας. Μετά το πέρας της εκχύλισης, το εκχύλισμα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση και ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση υπό κενό, όπου το ξηρό εκχύλισμα παραμένει υπό υψηλό κενό έως πλήρους ξήρανσης του.

## 2.6 Χαρακτηρισμός εκχυλίσματος ως προς τη βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση

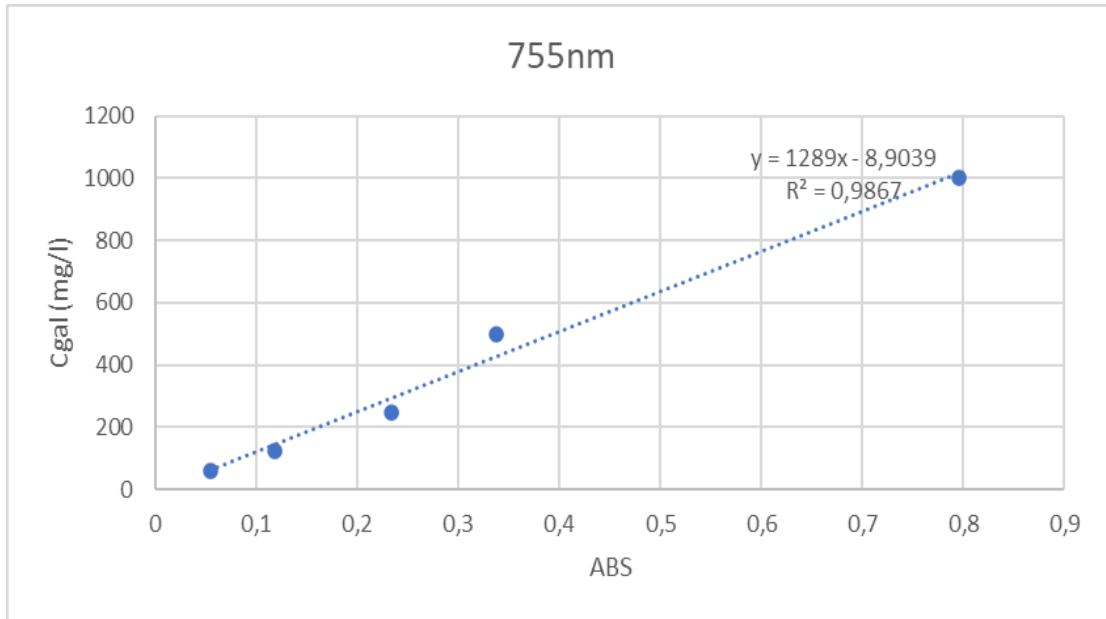
### 2.6.1 Προσδιορισμός ολικού περιεχόμενου φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content; *mg* ισοδύναμων γαλλικού οξέος, GAE/ *g* πρώτης ύλης)

Για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο προκύπτον εκχύλισμα, αξιοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu (O. Folin *et al*).

Ως ένωση αναφοράς, χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς ξεκινώντας από υδατικό διάλυμα γαλλικού οξέος αρχικής συγκέντρωσης 1mg/mL και αραιώσεις με εύρος συγκεντρώσεων 0,5 έως 0,0625 mg/mL. Για την τυφλή μέτρηση χρησιμοποιείται το νερό.. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- 1) Για την μέτρηση της τιμής TPC των εκχυλισμάτων, παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται αρχικά υδατικά διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα με το ιξώδες και την αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη του μίγματος. Για λόγους επαναληψιμότητας, όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν.
- 2) Με χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας, λαμβάνονται 20μL του αρχικού διαλύματος εκχυλίσματος (stock διάλυμα) και εισάγονται σε φιαλίδιο erpendorf.
- 3) Στα τρία erpendorf προστίθενται 1 mL απιονισμένου νερού και το σύστημα αφήνεται για επώαση 6 min, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 4) Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 100 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία για 5 min, απουσία φωτός, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 5) Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη 300 μL κορεσμένου Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 560 μL απιονισμένου νερού και το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία για 60 min, απουσία φωτός, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 6) Μετά το πέρας των 60 min, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 755 nm μέσω του φασματοφωτόμετρου UV-vis.

- 7) Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των διαλυμάτων σε φαινολικές ενώσεις, γίνεται χρήση της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Λαμβάνεται η εξίσωση  $C_{gal} = 1289 \times A_{\text{gallic acid}} + 8,9039$  (Εξίσωση 5) με  $R^2 = 0,9867$ , η οποία θα αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις.

- 8) Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$TPC \text{ (mg γαλλικού οξέος/ g πρώτης ύλης)} = C_{gal} \text{ (mg γαλλικού οξέος/ L)} * V_{εκχ} \text{ (L)} * D / m \text{ πρώτης ύλης (Εξίσωση 6)}.$$

Όπου :

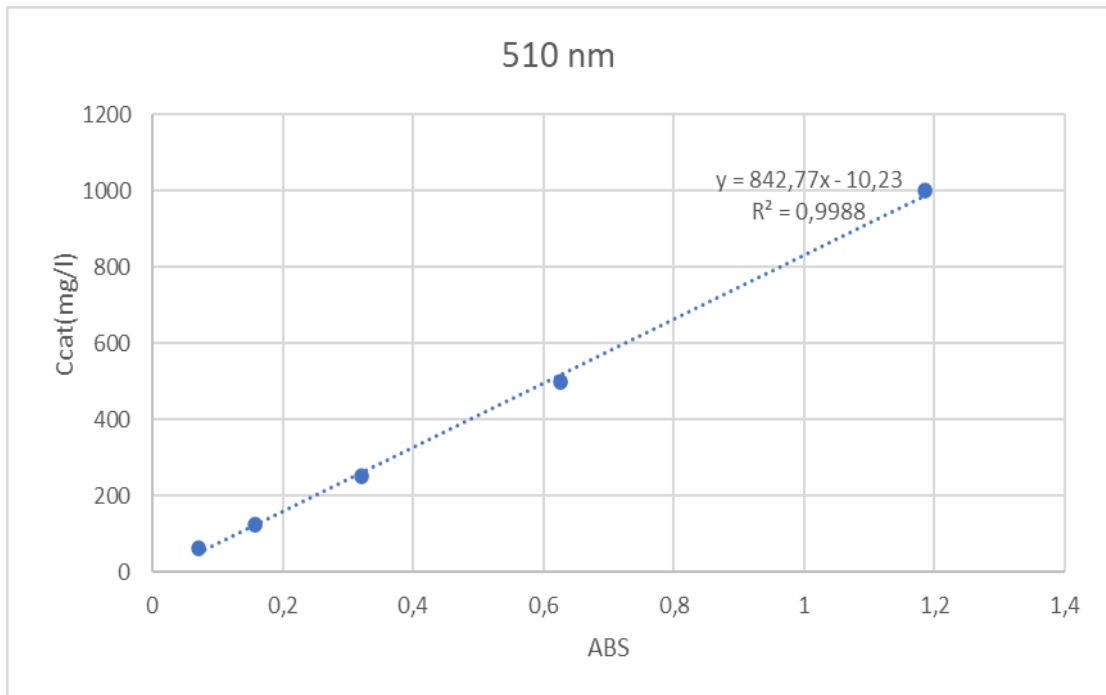
- $C_{gal}$  : συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος/ L
- $V_{εκχ}$ : όγκος εκχυλίσματος σε L
- $m_{\text{πυ}}$ : μάζα πρώτης ύλης σε g
- D: παράγοντας αραίωσης

## 2.6.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC; mg ισοδύναμων κατεχίνης, CATE/ g πρώτης ύλης)

Για τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων στο προκύπτον εκχύλισμα, αξιοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος του χλωριούχου αργιλίου (B. Christ *et al*). Ως ένωση αναφοράς, χρησιμοποιείται η κατεχίνη. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς ξεκινώντας από υδατικό διάλυμα κατεχίνης αρχικής συγκέντρωσης 1 mg/ mL και αραιώσεις με εύρος συγκεντρώσεων 0,5 έως 0,0625 mg/ mL. Για την τυφλή μέτρηση χρησιμοποιείται το νερό. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- 1) Για την μέτρηση της τιμής TFC των εκχυλισμάτων, παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται αρχικά υδατικά διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις, ανάλογα με το ιξώδες και την αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη του μίγματος. Για λόγους επαναληψιμότητας, όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν.
- 2) Με χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας, λαμβάνονται 50 μL του αρχικού διαλύματος εκχυλίσματος (stock διάλυμα) και εισάγονται σε φιαλίδιο erpendorf.
- 3) Στα τρία erpendorf προστίθενται 30 μL υδατικού διαλύματος NaNO<sub>2</sub> 5% w/v και το σύστημα αφήνεται για επώαση 6 min, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 4) Ακολουθεί προσθήκη υδατικού διαλύματος 60 μL AlCl<sub>3</sub> 10% w/v και το σύστημα αφήνεται να επωαστεί για 5 min, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 5) Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη 300 μL NaOH 1M και 560 μL απιονισμένου νερού και το σύστημα αφήνεται για επώαση για 15 min, μετά από ανάδευση στο Vortex.
- 6) Μετά το πέρας των 15 min, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 510 nm μέσω του φασματοφωτόμετρου UV-Vis.

- 7) Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των διαλυμάτων σε φλαβονοειδή, γίνεται χρήση της καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2 Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης

Λαμβάνεται η εξίσωση  $C_{catechin} = 842,77 \times A_{catechin} + 10,23$  (Εξίσωση 7) με  $R^2 = 0,9988$ , η οποία θα αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σε φλαβονοειδή των εκχυλισμάτων.

- 8) Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος σε ολικά φλαβονοειδή υπολογίζεται μέσω της σχέσης:  
 $TFC \text{ (mg κατεχίνης/ g πρώτης ύλης)} = C_{cat} \text{ (mg κατεχίνης/ L)} * V_{εκχ} \text{ (L)} * D / m$   
 πρώτης ύλης (Εξίσωση 8).

Όπου :

- $C_{cat}$  : συγκέντρωση εκχυλίσματος εκφρασμένη σε mg κατεχίνης/ L
- $V_{εκχ}$ : όγκος εκχυλίσματος σε L
- $m_{\pi\upsilon}$ : μάζα πρώτης ύλης σε g
- $D$ : παράγοντας αραίωσης του εκχυλίσματος

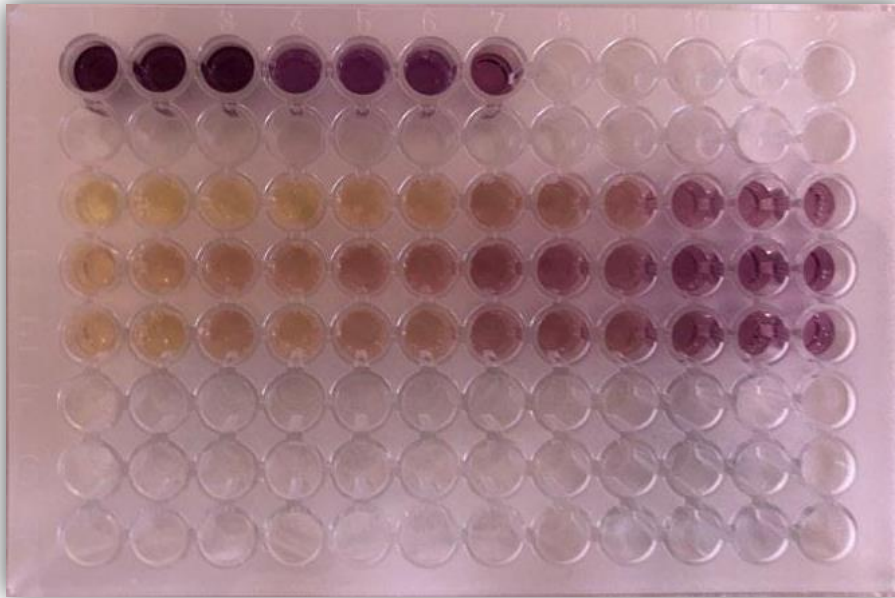
### 2.6.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, γίνεται χρήση της φασματοφωτομετρικής μεθόδου προσδιορισμού δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH (2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πικρυλυδραζίλιο) (Blois *et al*).

Αναφορικά με την πειραματική διαδικασία, πραγματοποιείται διάλυση  $1,268 \cdot 10^{-2}$  mmol αντιδραστήριου DPPH (5 mg) σε 50 mL απόλυτης αιθανόλης, εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 mL. Το προκύπτον σύστημα τίθεται σε ανάδευση μέχρι πλήρη διαλυτοποίηση, σε θερμοκρασία δωματίου και πλήρως προστατευόμενο από πηγές φωτός με χρήση περιτυλίγματος από αλουμινόχαρτο. Μετά την χρήση του, το αντιδραστήριο αποθηκεύεται σε συνθήκες ψύξης, με θερμοκρασία χαμηλότερη από 4°C για όχι περισσότερο από τρεις ημέρες [50].

Ως σύστημα αναφοράς, χρησιμοποιείται το ασκορβικό οξύ, δεδομένου ότι είναι ένα γνωστό φυσικό αντιοξειδωτικό. Συγκεκριμένα,  $3,49 \cdot 10^{-2}$  mmol ασκορβικού οξέος (6 mg) αναμιγνύονται με 3 mL νερού σε μια σφαιρική φιάλη έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση ίση με 2 mg/mL. Από το προκύπτον μίγμα, αντλούνται με χρήση πιπέτας 90 μL τα οποία στη συνέχεια αραιώνονται με προσθήκη 2,910 mL απιονισμένου νερού.

Για την παρασκευή των αρχικών διαλυμάτων εκχυλίσματος (stock διάλυμα), πραγματοποιείται προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας του εκχυλίσματος σε νερό. Ανάλογα με την πυκνότητα του εκχυλίσματος και την αναλογία πρώτης/ύλης διαλύτη, η αραιώση που θα υποστεί διαφέρει κάθε φορά. Συνεχίζοντας, σε ένα πλακίδιο 96 θέσεων, τοποθετούνται σε θέση της πλακέτας 100μL διαλύματος εκχυλίσματος (σε κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα) και 100μL διαλύματος DPPH. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται κατάλληλη κατανομή εκχυλίσματος/νερού στην πλακέτα, έτσι ώστε να υπάρχουν διαλύματα συγκεντρώσεων C, 0,8C, 0,6C, 0,4C και 0,2C σε κάθε σειρά. Για παράδειγμα, μια θέση συγκέντρωσης 0,8C, περιέχει 80 μL του stock, 20 μL νερού και 100 μL διαλύματος DPPH. Όμοια, παρασκευάζονται και δύο τυφλά δείγματα στην πλακέτα, αποτελούμενα από 100 μL νερού και 100 μL διαλύματος DPPH.



Εικόνα 14 Πλακέτα φασματομετρικής μεθόδου δέσμευσης ρίζας DPPH; Σειρά A: τυφλό δείγμα αποτελούμενο από το αντιδραστήριο DPPH (A1-3) καθώς και DPPH/Νερό (50-50) (A4-6). Σειρές C-E: stock εκχυλίσμάτων

Η ολοκληρωμένη πλέον πλακέτα, αποθηκεύεται σε σκοτεινό και ερμητικά κλειστό χώρο και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για χρόνους (α) 15 min (β) 30 min και (γ) 60 min. Μετά το πέρας του κάθε χρονικού διαστήματος, μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο UV-vis στα 515 nm.

Για κάθε εκχύλισμα που μετράται, λαμβάνονται οι τιμές απορρόφησης και σχεδιάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης των διαλυμάτων. Από την εξίσωση που προκύπτει, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος εκχυλίσματος που επιτυγχάνει μείωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50% ( $IC_{50}$ ), με στόχο τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όσο χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$  προκύπτει, τόσο υψηλότερη θα είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος [43].

Για τον υπολογισμό της % αναστολής, γίνεται χρήση του διαγράμματος της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσεως της συγκέντρωσης των δειγμάτων ( $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος/ mL δείγματος) και της Εξίσωσης 9:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \text{ (Εξίσωση 9) [43]}$$

όπου  $A_{\text{control}}$ , η απορρόφηση ενός τυφλού δείγματος.

## 2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την διεξαγωγή της μεθόδου πειραματικού σχεδιασμού, γίνεται χρήση του λογισμικού Design Expert (free trial version) και συγκεκριμένα, της μεθόδου Box-Behnken. Το σχέδιο αυτό διαμορφώνεται με βάση τον Πίνακα 12:

Πίνακας 12 Ορισμός παραμέτρων προς μελέτη και μεταβλητών απόκρισης κατά τον πειραματικό σχεδιασμό

Παράμετροι προς μελέτη (factors; $x_i$ )	Μεταβλητές απόκρισης (response variables; $y_i$ )
Χρόνος εκχύλισης (min)	TPC (total phenolic content; mg gallic acid equivalents, GAE /g rosehip)
Ποσοστού νερού στο διαλύτη (%)	TFC (total flavonoid content; mg catechin equivalents, CATE / g rosehip)
Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g διαλύτη)	IC <sub>50</sub> (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος)

Τα επίπεδα του σχεδιασμού καθορίζονται με βάση τον χαρακτηρισμό εκχυλισμάτων (TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH)) οκτώ (8) προκαταρκτικών εκχυλίσεων με παραλλαγές στις παραμέτρους εκχύλισης.

Δεδομένου ότι εξετάζονται τρεις παράγοντες, ορίζονται τρία επίπεδα για τον κάθε ένα (3<sup>3</sup>) και κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

Πίνακας 13 Ορισμός επιπέδων πειραματικού σχεδιασμού

Παράγοντας	$x_i$	Επίπεδα	
Χρόνος εκχύλισης (min)	$x_1$	-1	30 min
		0	135 min
		1	240 min
Ποσοστό νερού στον διαλύτη (%)	$x_2$	-1	0%
		0	25%
		1	50%



Μάζα πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη (mg/g)	x <sub>3</sub>	-1	25 mg/g
		0	80 mg/g
		1	135 mg/g

Με χρήση της Εξίσωσης 3, προσδιορίζεται από το λογισμικό ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων που πρέπει να διεξαχθούν, ο οποίος περιλαμβάνει δώδεκα (12) παραγοντικά και πέντε (5) κεντρικά σημεία:

$$N = 2k(k-1) + C_0 = 2 * 3(3-1) + 5 = 17 \text{ (Εξίσωση 3)}$$

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα 17 πειράματα που διεξάγονται καθώς και οι συνθήκες εκχύλισης.

Πίνακας 14 Συνοπτικός πίνακας πειραμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού σε κωδικοποιημένη και μη μορφή

Κωδικός πειράματος	std	Κωδικοποιημένη μορφή	Πραγματική μορφή		
		-1,0,+1	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στον διαλύτη (%)	Μάζα πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g solvent)
DEB24	3	-1 +1 0	30	50	80
DEB25	4	+1 +1 0	240	50	80
DEB26*	16	0 0 0	135	25	80
DEB27*	14	0 0 0	135	25	80
DEB28	12	0 +1 +1	135	50	135
DEB29	2	+1 -1 0	240	0	80
DEB30	8	+1 0 0	240	25	135
DEB31	7	-1 0 +1	30	25	135
DEB32	6	+1 0 -1	240	25	25
DEB33	11	0 0 +1	135	0	135
DEB34	1	-1 -1 0	30	0	80
DEB35*	15	0 0 0	135	25	80
DEB36	9	0 -1 -1	135	0	25
DEB41	5	-1 0 -1	30	25	25
DEB38*	17	0 0 0	135	25	80
DEB39*	13	0 0 0	135	25	80
DEB40	10	0 +1 -1	135	50	25

\*=Μηδενικό επίπεδο

Για κάθε ένα από αυτά τα πειράματα, πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων (TPC, TFC) καθώς και την αντιοξειδωτική δράση (IC<sub>50</sub> (DPPH)). Τα πειράματα διεξάγονται σε τυχαία σειρά, με στόχο την ελαχιστοποίηση των πειραματικών σφαλμάτων. Έπειτα από την ολοκλήρωσή τους, πραγματοποιείται σύγκριση στατιστικών μοντέλων που προσαρμόστηκαν στο σύνολο δεδομένων, προκειμένου να προσδιοριστεί το μοντέλο που δίνει την καλύτερη προσαρμογή. Στη συνέχεια, γίνεται χρήση της Εξίσωσης 2 από το λογισμικό, για να εκφραστεί η σχέση μεταξύ της προβλεπόμενης απόκρισης και των παραμέτρων της διεργασίας.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j>1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Εξίσωση 2}) [26]$$

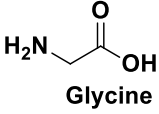
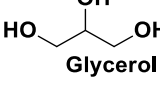

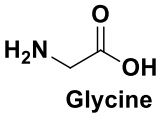
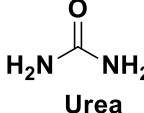

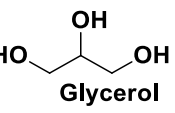
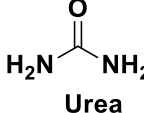
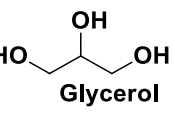
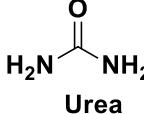

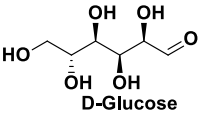
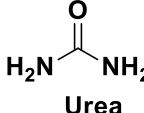
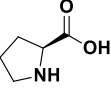
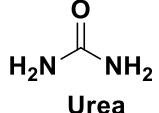
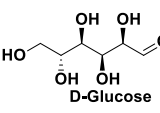
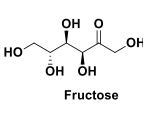
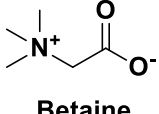
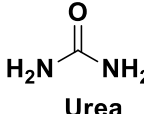

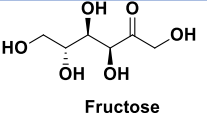
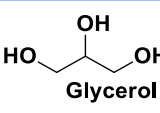

Ακολουθεί ανάλυση διακύμανσης ANOVA για τον προσδιορισμό της σημασίας του κάθε συντελεστή για το μοντέλο. Με αυτό τον τρόπο, εξετάζεται πόσο καλή είναι η προσαρμογή της πολυωνυμικής εξίσωσης. Βασικά εργαλεία για την ανάλυση ANOVA αποτελούν οι παράμετροι τιμής p (p-value) και έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) καθώς και οι συντελεστές προσδιορισμού (R<sup>2</sup>). Η στατιστική σημασία προσδιορίζεται στο 95% του επιπέδου εμπιστοσύνης. Σε συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιείται βελτιστοποίηση του μοντέλου στο πεδίο μέτρησης των παραμέτρων, για κάθε μεταβλητή απόκρισης καθώς και του συνόλου. Επιπλέον, με χρήση του λογισμικού δημιουργούνται τρισδιάστατα διαγράμματα για την κάθε επιφάνεια απόκρισης (TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH)), με στόχο την παρατήρηση της επίδρασης των τριών παραγόντων (x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>) στη διεργασία εκχύλισης. Τέλος, εξετάζεται η εγκυρότητα του μοντέλου με δύο πειράματα ελέγχου.

## Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα και συζήτηση

### 3.1 Φυσικοί Βαθέος Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES)

Για την επιλογή κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, αρχικά πραγματοποιήθηκε στοχευμένος σχεδιασμός των NADES. Στο πλαίσιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρώτες ύλες όπως βεταΐνη, ουρία, γλυκόζη, γλυκερόλη, φρουκτόζη κ.ά., σε διαφορετικές αναλογίες και συνθήκες. Οι προσπάθειες που διενεργήθηκαν για την παρασκευή διαλυτών στο πλαίσιο αυτής της εργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15 Παρασκευές NADES

NADES	Μοριακή αναλογία	Μοριακή Δομή συστατικών			T(°C)
Glycine:Glycerol:Water*	1:2:1	 Glycine	 Glycerol	 H <sub>2</sub> O	90
Glycine:Urea:Water*	1:1:3	 Glycine	 Urea	 H <sub>2</sub> O	60
Glycerol:Urea*	1:1	 Glycerol	 Urea	-	72
Glycerol:Urea:Water*	1:1:1	 Glycerol	 Urea	 H <sub>2</sub> O	60
D-Glucose:Urea:L-Proline*	1:1:1	 D-Glucose	 Urea	 L-Proline	60
Urea:D-Glucose:Fructose*	1:1:1	 Urea	 D-Glucose	 Fructose	60
Betaine:Urea:Water (BUW113)**	1:1:3	 Betaine	 Urea	 H <sub>2</sub> O	64
Fructose:Glycerol:Water (FGW115)**	1:1:5	 Fructose	 Glycerol	 H <sub>2</sub> O	60

\*Κόκκινα κελία: μη επιτυχής σύνθεση NADES

\*\*Πράσινα κελία: επιτυχής σύνθεση NADES

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 15, επιτυχή παρασκευή NADES αποτέλεσε η σύνθεση των BUW113 και FGW115. Στις άλλες περιπτώσεις, οι διαλύτες είτε δεν σταθεροποιήθηκαν ποτέ, είτε μετά την απομάκρυνση τους από πηγή θέρμανσης στερεοποιήθηκαν.

### 3.1.1 Σύνθεση NADES

#### *Betaine: Urea: Water (1:1:3) (BUW113)*

Ένας εκ των δύο διαλυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ο NADES Βεταΐνη: Ουρία: Νερό (BUW). Πρόκειται για έναν διαλύτη αποτελούμενο από φυσικής προέλευσης, μη τοξικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, η βεταΐνη είναι ένας οσμολύτης που εμπλέκεται στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και ενέργειας καθώς και αποτελεί έναν εξαιρετικό σταθεροποιητή πρωτεΐνης σε διάφορους οργανισμούς [44,45]. Χάρη στη βιοαποικοδομησιμότητα της και χαμηλό κόστος, έχει ευρεία βιομηχανική χρήση [45]. Από την άλλη πλευρά, η ουρία είναι ένας μετουσιωτής πρωτεϊνών που παράγεται κυρίως μετά από ηπατική πέψη τους [44,45,46]. Πρόκειται για ένα υγροσκοπικό μόριο που υπάρχει στην επιδερμίδα ως συστατικό του φυσικού ενυδατικού παράγοντα και χρησιμοποιείται συχνά σε επιδερμικές εφαρμογές [46].

Όταν οι δύο αυτές ενώσεις συνυπάρχουν σε ένα μείγμα, σε συνδυασμό με την παρουσία νερού, δημιουργείται μια υπερμοριακή δομή, όπου μεγάλα μόρια προκύπτουν κατά την ομαδοποίηση ή σύνδεση μικρότερων μορίων [44,45]. Αναλυτικότερα, πρόκειται για ένα μεγάλο πλέγμα τριών μορίων συνδεόμενων με δεσμούς υδρογόνου. Το μέγεθος αυτό μπορεί να προσδίδει μεγαλύτερο ιξώδες στον διαλύτη αλλά παράλληλα καθιστά τον NADES πιο σταθερό. Σημειώνεται ότι στο συγκεκριμένο σύστημα, η ουρία και το νερό λειτουργούν ως δότες δεσμών υδρογόνου, ενώ η βεταΐνη ως δέκτης.

Όσον αφορά την αναλογία του διαλύτη, επιλέχθηκε η προσθήκη νερού στο μίγμα βεταΐνης και ουρίας για τον σχηματισμό ενός σταθερού NADES. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τους Nava-Ocampo *et al*, ο συνδυασμός βεταΐνη:ουρία (1:1) σε άνυδρες συνθήκες δίνει ένα ασταθές μίγμα [44]. Επιπλέον, κατά την μελέτη τους παρατηρήθηκε ότι μεταξύ των αναλογιών B:U:W 1:1:2 και 1:1:3, κατά την αναλογία 1:1:3 οι καρβονυλικές ομάδες της βεταΐνης και της ουρίας σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς υδρογόνου με το νερό [44]. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι το νερό είναι ζωτικής σημασίας για την υπερμοριακή δομή και σταθερότητα του NADES με βέλτιστη αναλογία 1:1:3 [44].

Πίνακας 16 Συστατικά του διαλύτη BUW113

Συστατικά δ/τη	HBA/HBD	Μοριακή αναλογία	Μοριακή δομή
Βεταΐνη	HBA	1	 Betaine
Ουρία	HBD	1	 Urea
Νερό	HBD	3	

### ***Fructose: Glycerol: Water (1:1:5) (FGW115)***

Στην αναζήτηση πράσινων έναντι συμβατικών διαλυτών για τη διεργασία της εκχύλισης φυσικών προϊόντων, ο NADES Φρουκτόζη: Γλυκερόλη: Νερό (FGW) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική. Πρόκειται για έναν διαλύτη αποτελούμενο από φυσικής προέλευσης ενώσεις, ελκυστικές για εφαρμογές με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο (π.χ. τρόφιμα, καλλυντικά) [47]. Συγκεκριμένα, βασικό συστατικό αποτελεί η φρουκτόζη, επίσης γνωστή και ως «ζάχαρη φρούτων», η οποία εμφανίζεται κυρίως φυσικά σε πολλά φρούτα. Πρόκειται για ένα γνωστό, βρώσιμο μονοσακχαρίτη χαμηλού κόστους, ο οποίος αξιοποιείται ως ενυδατικός παράγοντας περιποίησης δέρματος καθώς και πρόσθετο γεύσης στα τρόφιμα [47]. Επιπρόσθετα, η γλυκερόλη είναι ένα εξίσου σύνηθες συστατικό που συναντάται σε NADES. Γνωστή και ως γλυκερίνη, έχει την μορφή μιας απλής τριόλης και συναντάται φυσικά τόσο σε ζώα όσο και φυτά, σε συνδυασμένη μορφή γλυκεριδίων σε λίπη και έλαια, προκύπτοντας ως υποπροϊόν της υδρόλυσης τους [48]. Μερικές από τις λειτουργίες της γλυκερόλης είναι η εφαρμογή της ως: συστατικό αρώματος, μαλακτικό μαλλιών, ενυδατικό και προστατευτικό παράγοντας δέρματος καθώς και φάρμακο στοματικής υγιεινής. Ως εκ τούτου, ο προκύπτον NADES μπορεί να χαρακτηριστεί ως εγγενώς μη τοξικός και GRAS (Generally Regarded as Safe) [47,48]. Όσον αφορά τη δομή του διαλύτη, η φρουκτόζη λειτουργεί ως δέκτης δεσμών υδρογόνου, ενώ η γλυκερόλη και το νερό ως δότες.

Ο συνδυασμός των παραπάνω συστατικών έχει επιτευχθεί σε διάφορες αναλογίες. Επιπλέον, για περαιτέρω μείωση του ιξώδους και διευκόλυνση της εκχύλισης, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί προσθήκη νερού. Σύμφωνα με τη μελέτη των B. Carpin *et al*, η αναλογία στην οποία ο NADES είναι αποδοτικότερος, είναι η 1:1:5 [25]. Η παρατήρηση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι απουσία του νερού, η φρουκτόζη με την γλυκερόλη σχηματίζουν ένα ετερογενές σύστημα. Αντιθέτως, για μεγάλες ποσότητες νερού στο σύστημα, οι αλληλεπιδράσεις με το νερό ξεπερνούν άλλες αλληλεπιδράσεις. Κατά συνέπεια, το νερό μετατρέπεται στην κύρια πλατφόρμα δεσμών υδρογόνου με αποτέλεσμα οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της φρουκτόζης και γλυκερόλης να εξαφανίζονται, όπως και στην περίπτωση του διαλύτη FGW 1:1:10 [25]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι χρήση του διαλύτη σε αναλογία 1:1:7, κατά την εκχύλιση ανθών *Calendula officinalis*, που διεξήχθη από τους B. Carpin *et al* [25]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε χαμηλότερη περιεκτικότητα φαινολικών οξέων σε σύγκριση με εκείνη των εκχυλισμάτων από διαλύτη FGW 1:1:5 [25]. Η διαφορά αυτή αποδεικνύει ότι παρά την μείωση του ιξώδους που αναμφισβήτητα ακολούθησε με την προσθήκη νερού στην συγκεκριμένη αναλογία, μειώθηκε εξίσου σημαντικά και η αποδοτικότητα της εκχύλισης. Τέλος, με τον συνδυασμό των τριών αυτών συστατικών, επιτυγχάνεται υπερμοριακή δομή, η οποία όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι επιθυμητή για την σταθερότητα του διαλύτη.

Πίνακας 17 Συστατικά του διαλύτη FGW115

Συστατικά δ/τη	HBA/ HBD	Μοριακή αναλογία	Μοριακή δομή
Φρουκτόζη	HBA	1	 Fructose
Γλυκερόλη	HBD	1	 Glycerol
Νερό	HBD	5	 H <sub>2</sub> O

### 3.1.2 Χαρακτηρισμός διαλυτών BUW113 και FGW115

Για τον χαρακτηρισμό των διαλυτών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις πολικότητας, πυκνότητας και pH. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι προκύπτουσες τιμές των προαναφερόμενων ιδιοτήτων.

Πίνακας 18 Χαρακτηρισμός διαλυτών BHW113 & FGW115 στους 25°C

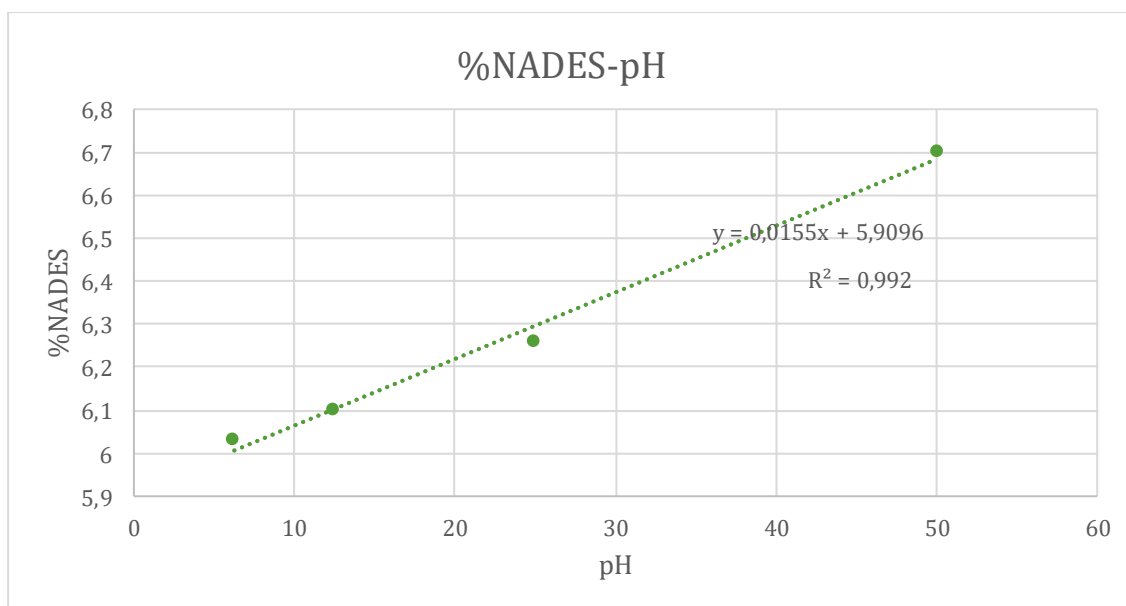
Διαλύτης	pH	Πυκνότητα (g/l)*	Πολικότητα (ENR; kcal/ mol)
BUW113	8,21	1043,29	49,81
FGW115	6,66	1375,83	48,13
Water	7	1000	48,2
EtOH	7,33	789,2	52,17

\*προσδιορίστηκε πειραματικά έπειτα από 10 επαναλαμβανόμενες ζυγίσεις γνωστής ποσότητας διαλύτη.

Από τον Πίνακα 18, σημειώνονται οι εξής παρατηρήσεις:

- το pH του διαλύτη BUW113 είναι αλκαλικό ενώ του FGW115 ελαφρώς όξινο και πολύ κοντά σε εκείνο του νερού.
- ο διαλύτης FGW115 έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από τον BUW113 και κατ'επέκταση μεγαλύτερο ιξώδες.
- δεδομένου ότι όσο μεγαλύτερη είναι η παράμετρος ENR, τόσο μικρότερη είναι η πολικότητα του συστήματος, παρατηρείται ότι ο NADES FGW115 έχει ελαφρώς μεγαλύτερη πολικότητα από εκείνη του νερού. Αντιθέτως, η πολικότητα του διαλύτη BUW113 κυμαίνεται μεταξύ εκείνης της αιθανόλης και του νερού.

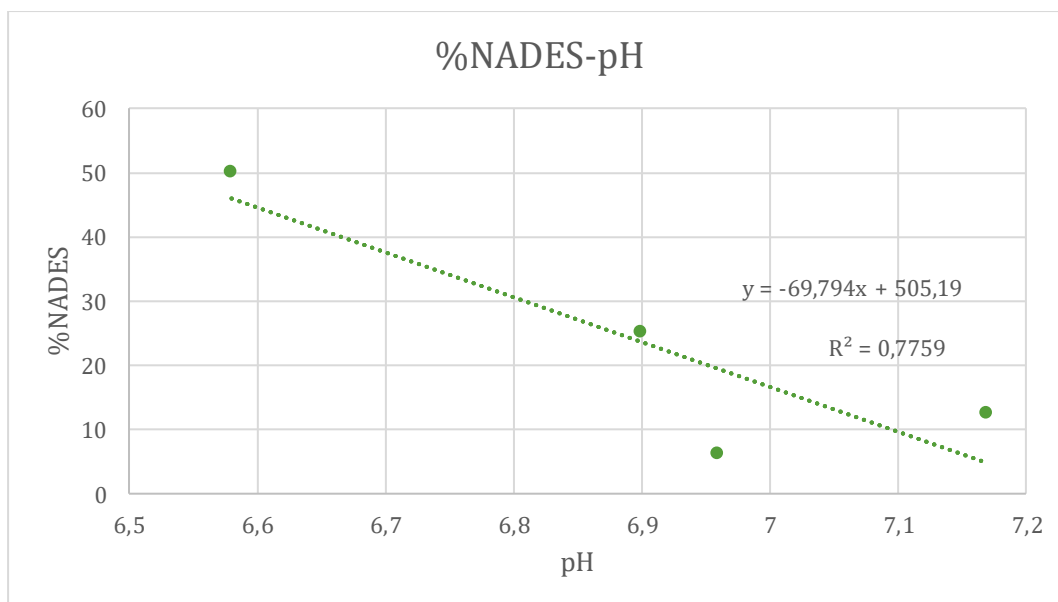
Κατά τον χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων NADES, θεωρήθηκε σκόπιμος ο προσδιορισμός του pH του συστήματος NADES-νερού, αφού κατά τη διεξαγωγή της διεργασίας εκχύλισης, το νερό αξιοποιείται ως συνδιαλύτης. Στα παρακάτω διαγράμματα μελετάται η επίδραση του νερού στο pH του συστήματος αυτού:



Διάγραμμα 3 Διάγραμμα ποσοστού NADES στο σύστημα NADES-νερό συναρτήσει του pH για τον διαλύτη BUW113

Πίνακας 19 Πίνακας τιμών pH για διάφορα ποσοστά του NADES στο σύστημα NADES-νερό για τον διαλύτη BUW113

Betaine:Urea:Water (1:1:3)	
%NADES	pH
50	6,7
25	6,26
12,5	6,1
6,25	6,03



Διάγραμμα 4 Διάγραμμα ποσοστού NADES στο σύστημα NADES-νερό συναρτήσει του pH για τον διαλύτη FGW115

Πίνακας 20 Πίνακας τιμών pH για διάφορα ποσοστά του NADES στο σύστημα NADES-νερό για τον διαλύτη FGW115

Fructose:Glycerol:Water (1:1:5)	
%NADES	pH
50	6,58
25	6,9
12,5	7,17
6,25	6,96

Από τα Διαγράμματα 3,4 παρατηρείται ότι στην περίπτωση του διαλύτη BUW113, η προσθήκη νερού στο σύστημα αυξάνει το pH με μία πολύ καλύτερη προσαρμογή, συγκριτικά με τον FGW115. Συνεπώς, η επίδραση του νερού στο σύστημα NADES-νερού θεωρείται μεγαλύτερη στην περίπτωση του BUW113 από ότι του FGW115.



Τέλος, συγκρίνοντας τις δύο διαλυτοχρωμικές μεθόδους Reichardt και Ερυθρού του Νείλου, παρατηρείται ότι για τον διαλύτη FGW115, η παράμετρος πολικότητας διαφέρει. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη μελέτη που διεξήχθη από τους B. Carpin *et al*, κατά τη μέθοδο Reichardt προκύπτει μεγαλύτερη τιμή ENR ( $59,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) σε σύγκριση με εκείνης του Κόκκινου του Νείλου ( $48,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) για τον συγκεκριμένο NADES. Συνεπώς, ο δείκτης Ερυθρό του Νείλου αποδίδει μεγαλύτερη πολικότητα στον FGW115 [25]. Ωστόσο, σημειώνεται ότι η αιθανόλη παρουσιάζει και στις δύο μεθόδους ίδια τάση με μια πολύ μικρή διαφορά στις δύο τιμές ENR [25].

Πίνακας 21 Σύγκριση διαλυτοχρωμικών μεθόδων Reichardt και Ερυθρού του Νείλου για τους διαλύτες αιθανόλη και FGW115

Διαλύτης	ENR ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	
	Μέθοδος Reichardt [25]	Ερυθρό του Νείλου
Αιθανόλη	$51,17 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$52,17 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
FGW115	$59,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$48,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$

### 3.2 Προκαταρκτικά πειράματα εκχύλισης με χρήση NADES ως εκχυλιστικό διαλύτη.

Προτού εφαρμοστεί η μέθοδος του πειραματικού σχεδιασμού, κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν πειράματα εκχύλισης και με τους δύο διαλύτες για να προσδιοριστούν τα όρια μελέτης του πεδίου που μας ενδιαφέρει, καθώς και να επιλεγεί ο καλύτερος NADES ως προς την εκχυλιστική του ικανότητα. Για να επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν να εξεταστούν είναι (α) ο χρόνος της εκχύλισης, (β) το ποσοστό νερού στο διαλύτη και (γ) η αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ διαλύτη. Παρά τη σημασία της θερμοκρασίας κατά τη διεργασία της εκχύλισης, στην εν λόγω μελέτη κρίθηκε σημαντικό η παράμετρος αυτή να παραμείνει σταθερή και ίση με  $40^\circ\text{C}$ , καθώς στη θερμοκρασία αυτή επιτυγχάνεται η προστασία τυχόν θερμοευαίσθητων ενώσεων στο εκχύλισμα. Επιπλέον, με μια ήπια θέρμανση, επιτυγχάνεται μια διεργασία χαμηλότερης κατανάλωσης ενέργειας και κατά συνέπεια φιλικότερης προς το περιβάλλον.

Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 22, 23. Πιο συγκεκριμένα, στον Πίνακα 22 συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων TFC, TPC για διάφορες παραλλαγές των παραμέτρων χρόνου εκχύλισης, ποσοστού νερού στο διαλύτη και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης/ διαλύτη κατά την εκχύλιση άγριου τριαντάφυλλου με διαλυτικό μέσο το BUW113.

Πίνακας 22 Τιμές TFC, TPC των προκαταρκτικών εκχυλίσεων με διαλύτη το BUW113

Κωδικός πειράματος	T(°C)	t (min)	Συνδ/της H <sub>2</sub> O (%)	m Rosehip/ m Δ/τη (mg/ g)	TFC (mg CATE/ g rosehip)		TPC (mg GAE/ g rosehip)	
					TFC	stdev	TPC	stdev
DEB6	40	60	-	25	25,49	2,32	133,36	1,89
DEB8	40	60	25%	25	60,61	4,61	135,79	3,39
DEB8'	40	60	25%	25	59,72	0,54	131,13	4,52
DEB9	40	60	25%	75	42,85	3,01	111,05	2,79
DEB11	40	60	50%	25	46,86	1,21	127,27	1,93
DEB10	40	60	75%	25	43,44	0,56	100,36	6,21

Μελετώντας τον Πίνακα 22, διεξάγονται τα εξής πορίσματα:

- η προσθήκη του νερού ως συνδιαλύτη διευκολύνει την εκχύλιση με αποτέλεσμα την προσκόμιση περισσότερων φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων στο εκχυλιστικό μέσο,
- η προσθήκη νερού σε ποσοστό 50% του διαλύτη και πάνω προκαλεί μείωση των TFC, TPC,
- η προσθήκη του νερού έχει μεγαλύτερη επίδραση στο περιεχόμενο φλαβονοειδών από ότι φαινολικών ενώσεων,
- η αυξημένη αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη σε ποσοστό νερού 25% στο εκχυλιστικό μέσο παραπέμπει σε μείωση των μεταβλητών TFC, TPC.

Όμοια, εξετάζεται η επίδραση των παραμέτρων προς μελέτη στην εκχύλιση με διαλύτη το FGW115.

Πίνακας 23 Τιμές TFC, TPC των προκαταρκτικών εκχυλίσεων με διαλύτη το FGW115

Κωδικός πειράματος	T(°C)	t (min)	Συνδ/της H <sub>2</sub> O (%)	m Rosehip/ m Δ/τη (mg/g)	TFC (mg CATE/ g rosehip)		TPC (mg GAE/ g rosehip)	
					TFC	stdev	TPC	stdev
DEB15	40	60	-	25	28,54	1,29	87,75	3,31
DEB15'	40	60	-	25	24,84	1,5	79,5	1,67
DEB16	40	60	25%	25	30,65	0,61	129,23	3,41
DEB17	40	360	25%	25	39,22	1,75	121,27	4,02
DEB18	40	180	25%	25	40,76	4,2	113,40	7,04
DEB20	40	60	10%	25	25,41	1,64	91,20	7,12
DEB21	40	60	25%	12,5	36,56	2,5	136,78	6,26
DEB22	40	60	25%	75	45,18	0,25	137,31	4,83

Μελετώντας τον Πίνακα 23, προκύπτουν τα εξής πορίσματα:

- Η παράμετρος του χρόνου δεν επηρεάζει σημαντικά τη μεταβλητή TFC. Αντιθέτως, με αύξηση του χρόνου εκχύλισης, παρατηρείται μια ασταθής μείωση της μεταβλητής TPC. Δεδομένου ότι ένας από τους στόχους της Πράσινης Χημείας είναι η ελαχιστοποίηση του κόστους και της δαπάνης ενέργειας (Σχήμα 1), είναι προτιμότερη η επιλογή ενός μικρότερου χρόνου διεργασίας.
- Η προσθήκη του νερού στο διαλυτικό μέσο είναι σημαντική για τη μείωση του ιξώδους και διευκόλυνση της εκχύλισης, σε ποσοστό όμως που δεν βλάπτει τον NADES [13].
- Η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη τείνει να αυξάνει με έναν ασταθή τρόπο τις μεταβλητές TPC, TFC. Γενικότερα, είναι επιθυμητή η εφαρμογή μικρής αναλογίας με στόχο την εξοικονόμηση πρώτης ύλης.

Για μια πρώτη σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο διαλυτών ως εκχυλιστικά μέσα, συγκεντρώθηκαν στους παρακάτω πίνακες τα αποτελέσματα που προέκυψαν από εκχύλισεις όπου επικρατούσαν οι ίδιες συνθήκες και για τους δύο NADES.

*Πίνακας 24 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθήκες εκχύλισης 0%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης και 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη*

<b>0%Νερού ως συνδιαλύτη/ 1h/ 25 mg Rosehip/ g διαλύτη</b>		
<b>Διαλύτης</b>	<b>TFC (mg CATE/ g rosehip)</b>	<b>TPC (mg GAE/ g rosehip)</b>
BUW113	25,49	133,36
FGW115	28,54	87,75

Από τον Πίνακα 24 παρατηρείται ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης, οι δύο διαλύτες παρουσιάζουν πολύ κοντινές τιμές TFC. Ωστόσο, φαίνεται πως ευνοείται η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων στις δεδομένες συνθήκες κατά τη χρήση του διαλύτη BUW.

*Πίνακας 25 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθήκες εκχύλισης 25%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη*

<b>25%Νερού ως συνδιαλύτη/ 1h/ 25 mg Rosehip/ g διαλύτη</b>		
<b>Διαλύτης</b>	<b>TFC (mg CATE/ g rosehip)</b>	<b>TPC (mg GAE/ g rosehip)</b>
BUW113	59,72	131,13
FGW115	30,65	129,23

Από τον Πίνακα 25 παρατηρείται ότι η προσθήκη νερού ως συνδιαλύτη υποβοηθάει τις δύο μεταβλητές TPC, TFC. Συγκεκριμένα, σημειώνεται μεγάλη αύξηση του TFC στην περίπτωση

του BUW113 και αντίστοιχα του TPC στην περίπτωση του FGW115. Οι μεταβολές αυτές πιθανό να οφείλονται στην μείωση του ιξώδους των διαλυτών.

Πίνακας 26 Τιμές TFC, TPC για τους δύο διαλύτες σε συνθληκες εκχύλισης 25%νερού ως συνδιαλύτη, 1h εκχύλισης, 75 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη

25%Νερού ως συνδιαλύτη/ 1h/ 75 mg Rosehip/ g διαλύτη		
Διαλύτης	TFC (mg CATE/ g rosehip)	TPC (mg GAE/ g rosehip)
BUW113	42,85	111,05
FGW115	45,18	137,31

Από τον Πίνακα 26 παρατηρείται ότι υπάρχει μια μικρή μείωση στο TPC του BUW113 συγκριτικά με την αναλογία 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη, ενώ μια αύξηση και των δύο μεταβλητών στην περίπτωση του FGW115. Μεταξύ των δύο διαλυτών, φαίνεται να υπερισχύει ο FGW115.

Μελετώντας τους Πίνακες 24-26, συμπεραίνεται ότι ο διαλύτης FGW115 επηρεάζεται περισσότερο από όλες τις παραμέτρους προς μελέτη. Συγκεκριμένα, φαίνεται αποδοτικότερος κατά την αύξηση της μάζας πρώτης ύλης καθώς και την προσθήκη επιπλέον νερού στο διαλυτικό μέσο.

Σημειώνεται ότι πραγματοποιηθήκαν μετρήσεις προσδιορισμού TFC και TPC των NADES, και επιβεβαιώθηκε η απουσία απορρόφησης στα ενδεδειγμένα από την εκάστοτε μέθοδο μήκη κύματος (500 & 755 nm), υποδεικνύοντας ότι οι τιμές TPC και TFC που προκύπτουν από τις μετρήσεις των NADES-εκχυλισμάτων οφείλονται αποκλειστικά στην παρουσία των εκχυλιζόμενων ενώσεων από το υπάνθιο του άγριου τριαντάφυλλου.

### 3.3 Επιλογή διαλύτη

Για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την πράσινη διεργασία εκχύλισης του καρπού *Rosa Canina* L., λήφθηκαν υπόψη πολλοί παράγοντες. Ξεκινώντας από τα συστατικά του κάθε NADES, παρόλο που όλα είναι φυσικής προέλευσης και βιώσιμα, υπάρχουν ορισμένες προτιμήσεις μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, τόσο η φρουκτόζη όσο και η γλυκερόλη, αποτελούν ένα φυσικό συστατικό χαρακτηριζόμενο ως GRAS, χαμηλού κόστους που συναντάται πολύ συχνά στη φύση και χρησιμοποιείται ήδη σε πληθώρα προϊόντων με αποδέκτη τον άνθρωπο [47,48]. Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός του διαλύτη FGW115 μπορεί να είναι πιο χρονοβόρος συγκριτικά με του BUW113, ωστόσο δεν περιέχει θερμοευαίσθητα συστατικά. Αναλυτικότερα, κατά την παρασκευή του διαλύτη BUW113, είναι αναγκαίος ο έλεγχος της θερμοκρασίας της διεργασίας, αφού για υψηλές θερμοκρασίες η ουρία αποσυντίθεται σε αμμωνία και ισοκυανικό οξύ, διαταράσσοντας έτσι το σύστημα του NADES και αλλάζοντας στην ουσία τον ίδιο τον διαλύτη [49]. Επιπλέον, παρόλο που η βεταΐνη και η ουρία

συναντώνται συχνά σε καλλυντικά προϊόντα, έχουν υπάρξει περιστάσεις κατά τις οποίες έχει παρατηρηθεί ήπιος ερεθισμός του δέρματος, κυρίως κατά τη χρήση της ουρίας σε υψηλές συγκεντρώσεις [46]. Συνεπώς, δεδομένου ότι το εκχύλισμα από *Rosa Canina* L. θα έρθει σε άμεση επαφή με την άνθρωπο, είναι προτιμότερη η χρήση ηπιότερων συστατικών.

Αναφορικά με τις ιδιότητες των διαλυτών, ο διαλύτης FGW115 είναι περισσότερο ιξώδης σε σύγκριση με τον BUW113, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για την εκχύλιση. Ωστόσο, το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με χρήση νερού ως συνδιαλύτη, επιτυγχάνοντας έτσι μείωση του ιξώδους αλλά κι εξοικονόμηση του NADES. Επιπρόσθετα, με βάση τον Πίνακα 18, παρατηρείται ότι ο FGW115 εμφανίζει μεγαλύτερη πολικότητα συγκριτικά με τον BUW113, γεγονός που παραπέμπει σε αποδοτικότερη εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων [34]. Αναφορικά με το pH, σημειώνεται ότι ο FGW115 δεν επηρεάζεται σημαντικά από την προσθήκη νερού συγκριτικά με τον BUW113. Παράλληλα, ο συγκεκριμένος NADES παρουσιάζει pH εντός σχεδόν των επιτρεπών ορίων για χρήση ενός διαλύτη στην παραγωγή καλλυντικού προϊόντος.

Τέλος, συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα των δύο διαλυτών στις δοκιμαστικές εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι ο διαλύτης FGW115 επηρεάζεται σημαντικότερα από τη μεταβολή των παραμέτρων προς μελέτη και συνεπώς, η τάση του αυτή θα διευκολύνει την οριοθέτηση των επιπέδων του πειραματικού σχεδιασμού. Έχοντας λάβει υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις, έγινε η επιλογή του FGW115 ως καταλληλότερου διαλύτη για την διεργασία.

### 3.4 Σύγκριση πράσινης εκχύλισης με χρήση NADES και εκχύλισης με χρήση συμβατικών διαλυτών

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, διεξήχθησαν συμβατικές εκχυλίσεις του υπανθίου του καρπού *Rosa Canina* L. με χρήση το νερό και το σύστημα αιθανόλης-νερού ως εκχυλιστικά μέσα. Και στις δύο περιπτώσεις οι συνθήκες εκχύλισης ήταν ίδιες με εκείνες των βασικών πειραμάτων (40°C, 1h, 25 mg rosehip/ g διαλύτη) έτσι ώστε να είναι εφικτή η άμεση η σύγκριση της αποδοτικότητας μεταξύ συμβατικών και μη εκχυλίσεων. Στον Πίνακα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο συμβατικών εκχυλίσεων αναφορικά με την μέτρηση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, καθώς και της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 27 Σύγκριση συμβατικών διαλυτών και NADES ως προς την βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων

Διαλύτης	TFC (mg CATE/ g rosehip)	TPC (mg GAE/ g rosehip)	IC <sub>50</sub> (DPPH 15 min) (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)
Et/W (70/30%)	26,11	78,72	4,21
W	7	18,26	5,22
FGW115 (χωρίς συνδιαλύτη)	28,54	87,75	3,72

Με βάση τον Πίνακα 27, παρατηρείται ότι και στις τρεις μετρήσεις, το σύστημα αιθανόλης/ νερού υπερισχύει σε σύγκριση με το νερό. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη φαίνεται να ενισχύει την εκχύλιση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων καθώς και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Αναφορικά με την εκχύλιση με NADES, σημειώνεται ότι προκύπτουν μεγαλύτερες τιμές στη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών, καθώς και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με την εκχύλιση με αιθανόλη/ νερό και κατ'επέκταση σκέτο νερό. Το γεγονός αυτό πιθανό να οφείλεται στους ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συστατικών του NADES και των εκχυλισμένων ενώσεων με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της διεργασίας [50].

Συνεπώς, αποδεικνύεται ότι η ένταξη ενός NADES ως κύριου διαλύτη στην εκχύλιση του *Rosa Canina* L. καθιστά αποτελεσματικότερη την διεργασία σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες αιθανόλης και νερού.

Συνοψίζοντας, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα αποδοτικότητας αλλά και τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των NADES, κρίνεται εύλογη η υπερίσχυση τους έναντι των συμβατικών διαλυτών για τους παρακάτω λόγους:

- πρόκειται για διαλύτες αποτελούμενους από φυσικά προϊόντα,
- κατά την χρήση τους δεν παράγονται παραπροϊόντα από την εκχύλιση,
- δεν απαιτείται απομάκρυνση τους,
- δεν εμφανίζουν την ίδια τοξικότητα και ευφλεκτικότητα με τους συμβατικούς διαλύτες,
- τα συστατικά τους χρησιμοποιούνται ήδη σε πολλά τελικά προϊόντα, οπότε μειώνεται το κόστος πρώτων υλών [50],
- λειτουργούν ως μέσα αποθήκευσης με στόχο την προστασία ευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων από την οξειδωτική αποικοδόμηση [50],
- σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ NADES και εκχυλισμένων ενώσεων, αυξάνοντας την αποδοτικότητα της διεργασίας [50].

Συνεπώς, η εκχύλιση με χρήση NADES αφορά μια πράσινη διεργασία με μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο, λιγότερα στάδια και μικρότερο κόστος, ιδανική για αναγωγή σε βιομηχανική κλίμακα.

### 3.5 Πειραματικός Σχεδιασμός

Στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken, με χρήση του λογισμικού Design Expert (free trial version), πραγματοποιήθηκαν 17 πειράματα αποτελούμενα από διάφορους συνδυασμούς των εξής τριών παραμέτρων της εκχύλισης: (α) χρόνος της διεργασίας, (β) ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη και (γ) αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη. Εντός αυτών των πειραμάτων, ορίστηκαν πέντε επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του σφάλματος.

#### 3.5.1 Οριοθέτηση επιπέδων Box-Behnken

Για τον καθορισμό των επιπέδων μελέτης του σχεδίου Box-Behnken (-1, 0, +1), μελετήθηκε η επίδραση κάθε παράγοντα ( $x_1, x_2, x_3$ ) στις μεταβλητές απόκρισης αντίστοιχα ( $y_1, y_2, y_3$ ) μέσα από τα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον διαλύτη FGW115.

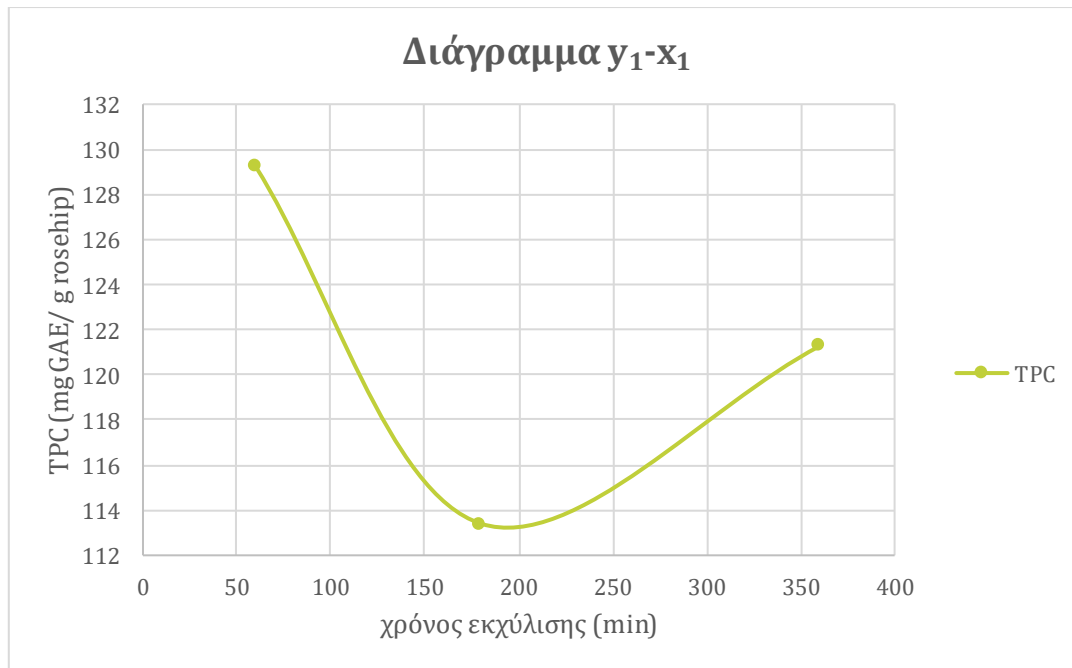
##### 1) Χρόνος εκχύλισης

Για την παράμετρο του χρόνου εκχύλισης, μελετήθηκαν τρία προκαταρκτικά πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

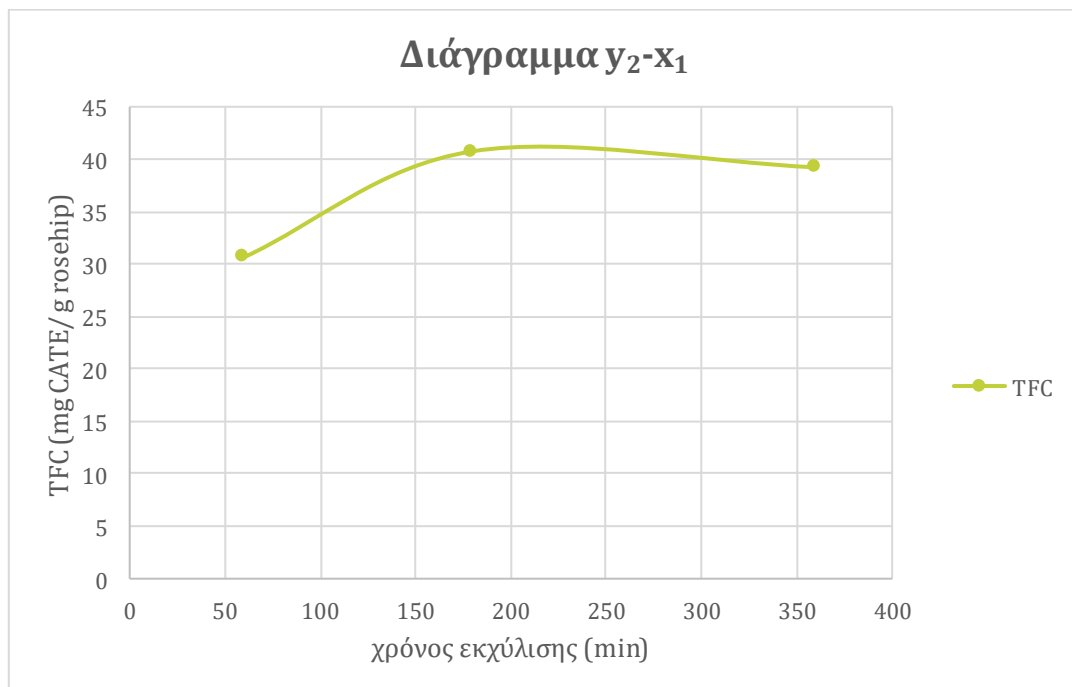
*Πίνακας 28 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115*

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) ( $x_1$ )	TPC (mg GAE/ g rosehip) ( $y_1$ )	TFC (mg CATE/ g rosehip) ( $y_2$ )	IC <sub>50</sub> (DPPH,15min) (μL εκχυλίματος/ mL διαλύματος) ( $y_3$ )
DEB16	60	129,23	30,65	0,68
DEB18	180	113,4	40,76	2,04
DEB17	360	121,27	39,22	2,09

Αναπαριστώντας γραφικά τα αποτελέσματα του Πίνακα 28, προκύπτουν τα εξής διαγράμματα:

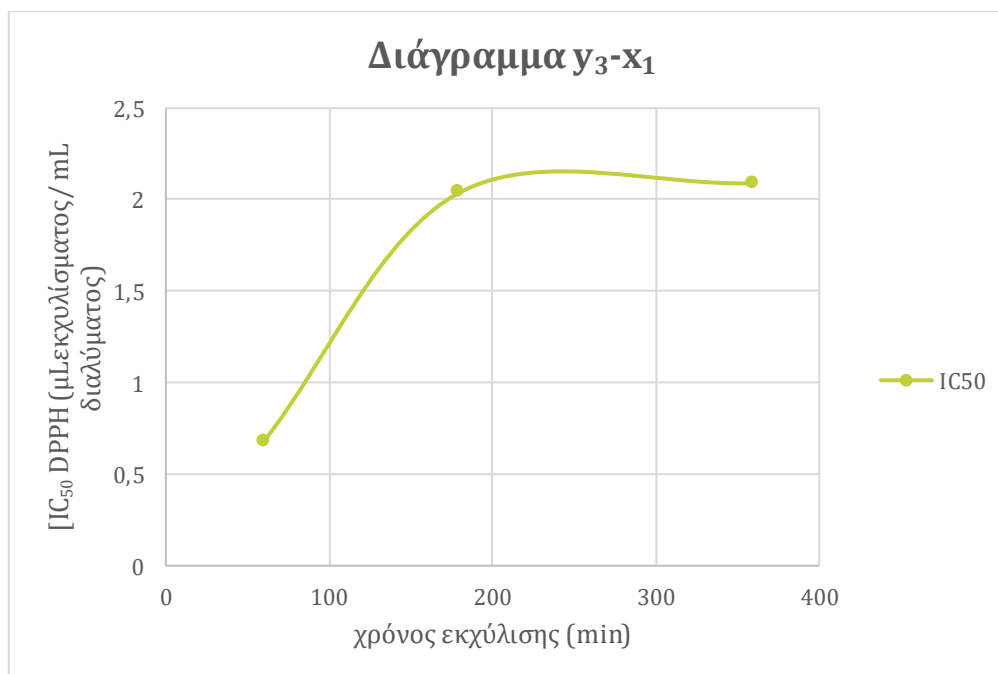


Διάγραμμα 5 Διάγραμμα TPC συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις



Διάγραμμα 6 Διάγραμμα TFC συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις





Διάγραμμα 7 Διάγραμμα IC<sub>50</sub> συναρτήσεως του χρόνου εκχύλισης κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 5-7, οι καμπύλες των μεταβλητών απόκρισης δεν είναι γραμμικές, οπότε δεν υπάρχει μια σταθερή μεταβολή. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως το κόστος και την δυνατότητα κλιμάκωσης μιας τέτοιας διεργασίας, λαμβάνονται οι εξής αποφάσεις:

- **Κατώτερο άκρο (-1):** Σχετικά με την μεταβλητή TPC, παρατηρήθηκε ότι κατά την εκχύλιση μιας ώρας λαμβάνεται βέλτιστη τιμή. Αντίστοιχα, για την μεταβλητή TFC, πραγματοποιείται μια αύξηση στο πλαίσιο μεταξύ 60 και 180 min. Τέλος, σημειώνεται ότι μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (DPPH)) επιτυγχάνεται κατά την εκχύλιση διάρκειας μιας ώρας. Συνεπώς, στοχεύοντας στην διερεύνηση εάν η αύξηση του TPC και της αντιοξειδωτικής δράσης ισχύει και για πιο βραχυπρόθεσμες εκχυλίσεις, επιλέγεται ως ακραία κατώτερη τιμή του μοντέλου χρόνος ίσος με **30 min**.
- **Μηδενικό σημείο (0):** Για χρόνο εκχύλισης ίσο με 180 min, παρατηρείται μείωση των μεταβλητών TPC και αντιοξειδωτικής δράσης (μεγαλύτερη τιμή IC<sub>50</sub> (DPPH)), ενώ αντίθετα αύξηση της TFC. Συνεπώς, επιλέγεται ως μηδενικό σημείο ένα χρονικό διάστημα μικρότερο των τριών ωρών, όπου επιτυγχάνεται μεγαλύτερη τιμή TPC και μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> ενώ ταυτόχρονα η μεταβλητή TFC έχει σχετικά υψηλή τιμή. Πρόκειται λοιπόν για χρόνο εκχύλισης ίσο **135 min (2h15min)**.
- **Ανώτατο άκρο (+1):** Από τα γραφήματα παρατηρείται ότι για χρόνο εκχύλισης ίσο με 360 min, ακολουθεί αύξηση των TPC και αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και μια μικρή μείωση του TFC. Ωστόσο, δεδομένου ότι μικροί χρόνοι εκχύλισης είναι γενικότερα επιθυμητοί για το κόστος της διεργασίας, επιδιώκεται ένα πλαίσιο μελέτης του χρόνου μικρότερο των 360 min. Για αυτό το λόγο, ως ανώτατο άκρο επιλέγεται χρόνος εκχύλισης ίσος με **240 min (4h)**.

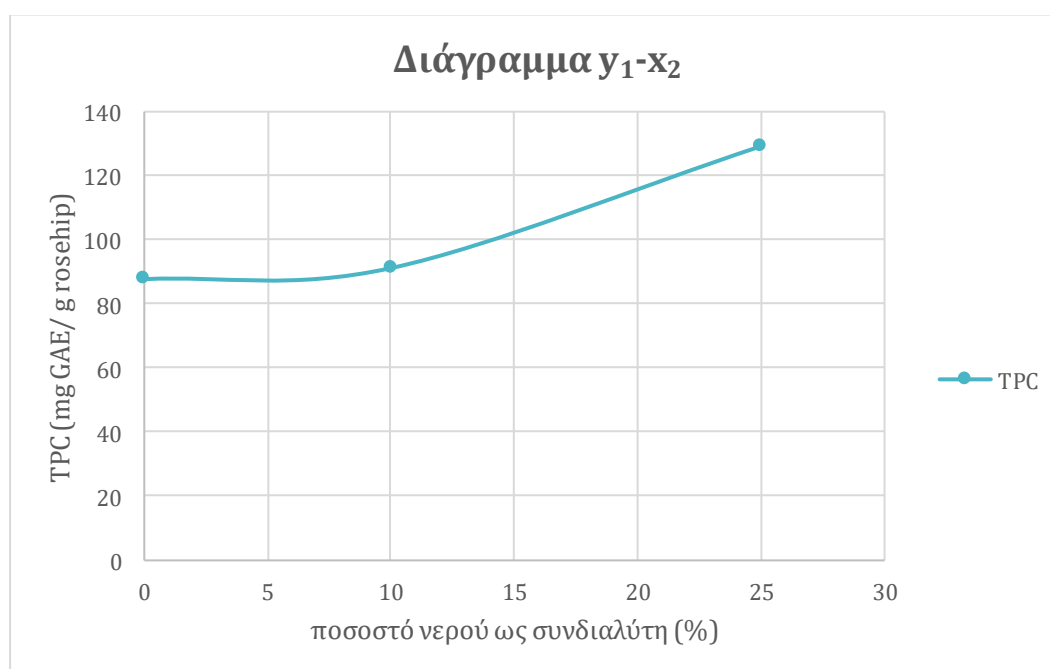
## 2) Ποσοστό του νερού στον τελικό διαλύτη

Ακολουθώντας το ίδιο σκεπτικό, για την δεύτερη παράμετρο ( $x_2$ ) του πειραματικού σχεδιασμού, μελετήθηκαν τα παρακάτω προκαταρκτικά πειράματα και τα γραφήματα τους:

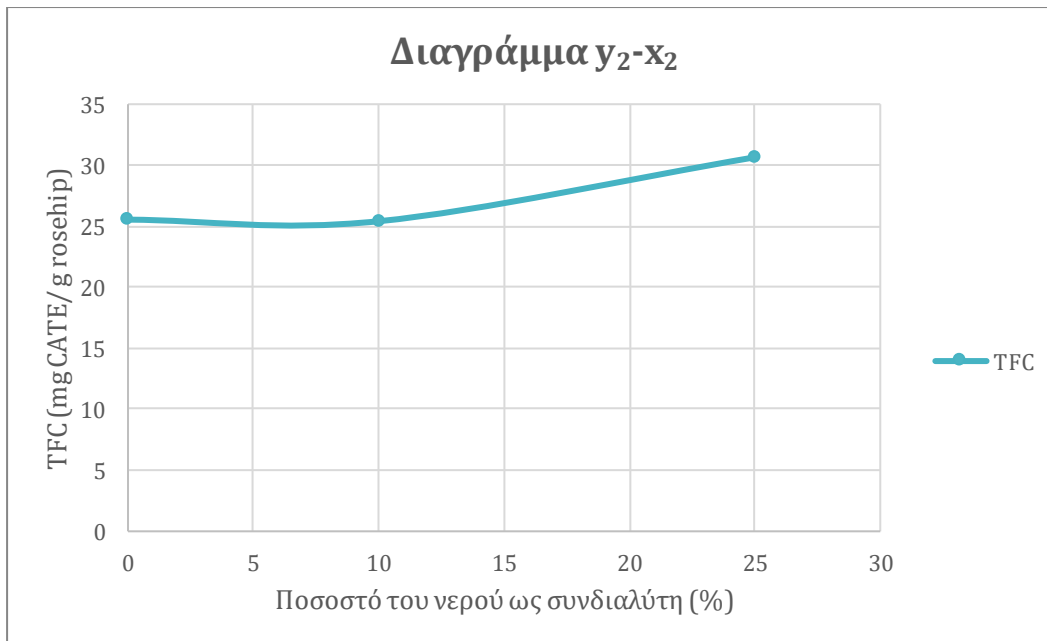
Πίνακας 29 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές του ποσοστού νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115

Κωδικός πειράματος	Ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη (%) ( $x_2$ )	TPC (mg GAE/ g rosehip) ( $y_1$ )	TFC (mg CATE/ g rosehip) ( $y_2$ )	IC <sub>50</sub> (DPPH, 15min) (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) ( $y_3$ )
DEB15	0	87,75	25,54	3,72
DEB20	10	91,2	25,41	2,43
DEB16	25	129,23	30,65	0,68

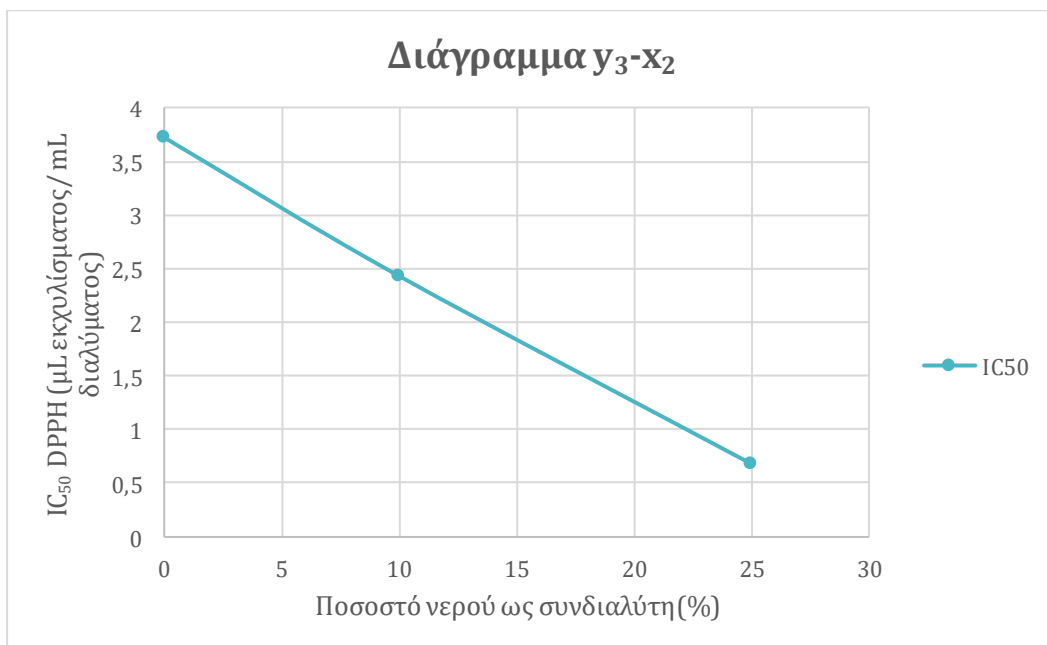
Αναπαριστώντας γραφικά τα αποτελέσματα του Πίνακα 29 προκύπτουν τα εξής διαγράμματα:



Διάγραμμα 8 Διάγραμμα TPC συναρτήσει του ποσοστού το νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις



Διάγραμμα 9 Διάγραμμα TFC συναρτήσει του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις



Διάγραμμα 10 Διάγραμμα IC<sub>50</sub> συναρτήσει του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 8-10, οι καμπύλες των TPC, TFC δεν είναι γραμμικές οπότε δεν υπάρχει μια σταθερή μεταβολή. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως το κόστος και την δυνατότητα κλιμάκωσης μιας τέτοιας διεργασίας, λαμβάνονται οι εξής αποφάσεις:

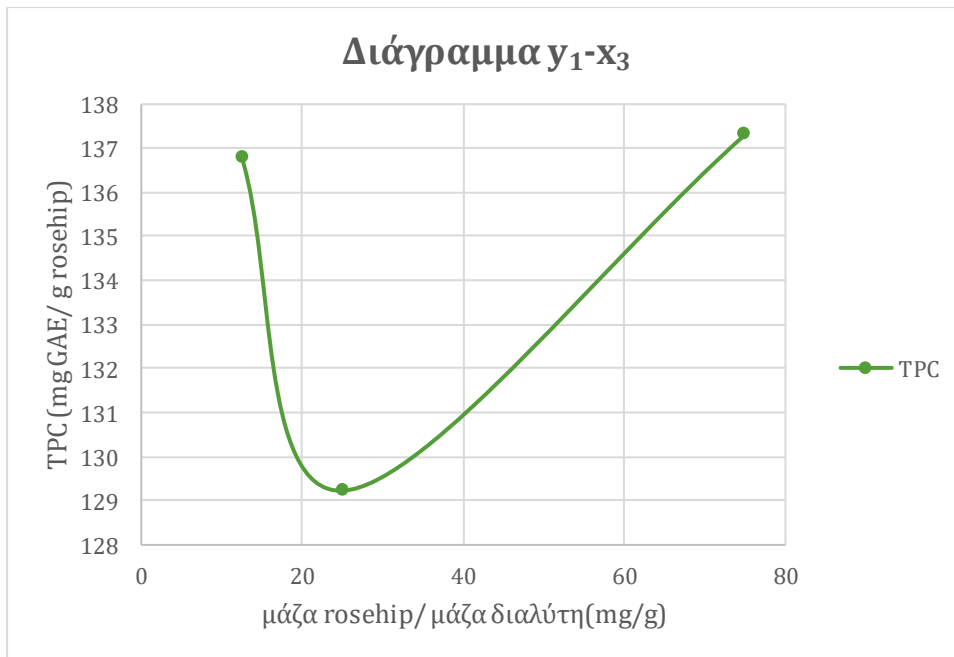
- **Κατώτερο άκρο (-1):** Και για τις τρεις μεταβλητές, παρατηρείται ότι κατά την απουσία πρόσθετου νερού από το διαλυτικό μέσο, επικρατεί η χαμηλότερη τιμή των TPC, TFC και αντιοξειδωτικής δράσης. Το σημείο αυτό λοιπόν αποτελεί ένα ξεκάθαρο κατώτερο άκρο. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο διαλύτης FGW115 περιέχει ήδη μεγάλη ποσότητα νερού, κρίνεται σημαντικό να παραμείνει ως κατώτερο άκρο το ποσοστό **0%**, έτσι ώστε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης χωρίς την βοήθεια επιπλέον νερού.
- **Μηδενικό σημείο (0):** Για προσθήκη νερού σε ποσοστό ίσο με 10% του συνολικού εκχυλιστικού μέσου, παρατηρείται εξαιρετικά μικρή αύξηση των μεταβλητών TPC και TFC καθώς και μια γραμμική αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Συνεπώς, επιλέγεται ως μηδενικό σημείο ένα μεγαλύτερο ποσοστό νερού, ίσο με **25%**, όπου επιτυγχάνεται εντονότερη μεταβολή των TPC, TFC και αντιοξειδωτικής δράσης (μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (DPPH)).
- **Ανώτατο άκρο (+1):** Με στόχο τον εντοπισμό του μέγιστου ποσοστού νερού που μπορεί να προστεθεί στον NADES χωρίς να πραγματοποιηθεί καταστροφή του διαλύτη, επιλέγεται ποσοστό ίσο με **50%**.

### 3) Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη

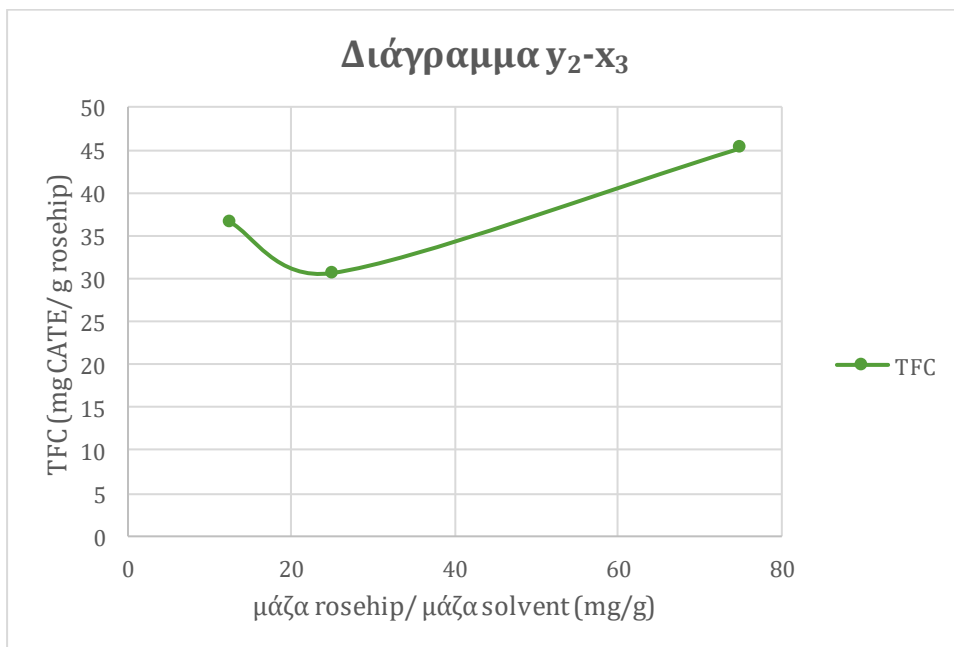
Όμοια, μελετήθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

*Πίνακας 30 Αποτελέσματα μεταβλητών απόκρισης για διάφορες τιμές της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις με FGW115*

Κωδικός πειράματος	Μάζα πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη (mg/g) (x <sub>3</sub> )	TPC (mg GAE/ g rosehip) (y <sub>1</sub> )	TFC (mg CATE/ g rosehip) (y <sub>2</sub> )	IC <sub>50</sub> (DPPH, 15min) (μL εκχυλίματος/ mL διαλύματος) (y <sub>3</sub> )
DEB21	12,5	136,78	36,56	4,62
DEB16	25	129,23	30,65	0,68
DEB22	75	137,31	45,18	0,84



Διάγραμμα 11 Διάγραμμα TPC συναρτήσει της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις



Διάγραμμα 12 Διάγραμμα TFC συναρτήσει της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις



Διάγραμμα 13 Διάγραμμα  $IC_{50}$  (DPPH, 15 min) συναρτήσεως της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη κατά τις προκαταρκτικές εκχυλίσεις

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 11-13, οι καμπύλες των μεταβλητών απόκρισης δεν είναι γραμμικές οπότε δεν υπάρχει μια σταθερή μεταβολή. Λειτουργώντας με το ίδιο σκεπτικό, λαμβάνονται οι εξής αποφάσεις:

- **Κατώτερο άκρο (-1):** Από τα παραπάνω γραφήματα, παρατηρείται ότι για αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη ίση με 12,5 mg/ g, προκύπτουν υψηλές τιμές TPC, TFC ενώ χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κατά τη χρήση μικρής ποσότητας πρώτης ύλης συγκριτικά με τον διαλύτη, πιθανότατα ένα ποσοστό του διαλύτη αυτού να είναι περιττό, γεγονός που είναι ανεπιθύμητο για διεργασίες μεγαλύτερης κλίμακας. Για αυτό τον λόγο, επιλέγεται ως κατώτερο σημείο αναλογία ίση με **25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη** όπου, με βάση τα Διαγράμματα 11-13, γίνεται ξεκάθαρο ότι επικρατούν μικρές τιμές TPC, TFC και αντιοξειδωτικής δράσης.
- **Μηδενικό σημείο (0):** Όπως προαναφέρθηκε, για αναλογία ίση με 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη προκύπτει βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση και μικρότερο περιεχόμενο TPC και TFC αντίστοιχα. Ωστόσο, δεδομένου ότι με αύξηση της αναλογίας η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται ελαφρώς ενώ τα TFC, TPC αυξάνονται σημαντικά, επιλέγεται ως μηδενικό σημείο η αναλογία μεγαλύτερη των 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη, τιμής ίσης με **80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη**.
- **Ανώτατο άκρο (+1):** Με στόχο την διερεύνηση εάν οι μεταβλητές TPC, TFC μπορούν να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω, επιλέγεται η επιλογή ενός ακραίου σημείου μεγαλύτερου από 80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη, τιμής ίσης με **135 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη**. Σημειώνεται ότι δεν εξετάζεται η επιλογή μεγαλύτερης αναλογίας διότι υπάρχει κίνδυνος μικρότερης απόδοσης αναλογικά με τη μάζα πρώτης ύλης που διατίθεται, εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας εκχυλίσματος που ενδέχεται να προκύψει λόγω δυσκολίας κατά την παραλαβή.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την μέτρηση των φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων στα οριοθετημένα επίπεδα αντίστοιχα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 31 . Σημειώνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράζεται με την ανασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>, DPPH).

Πίνακας 31 Αποτελέσματα των 17 οριοθετημένων πειραμάτων σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό

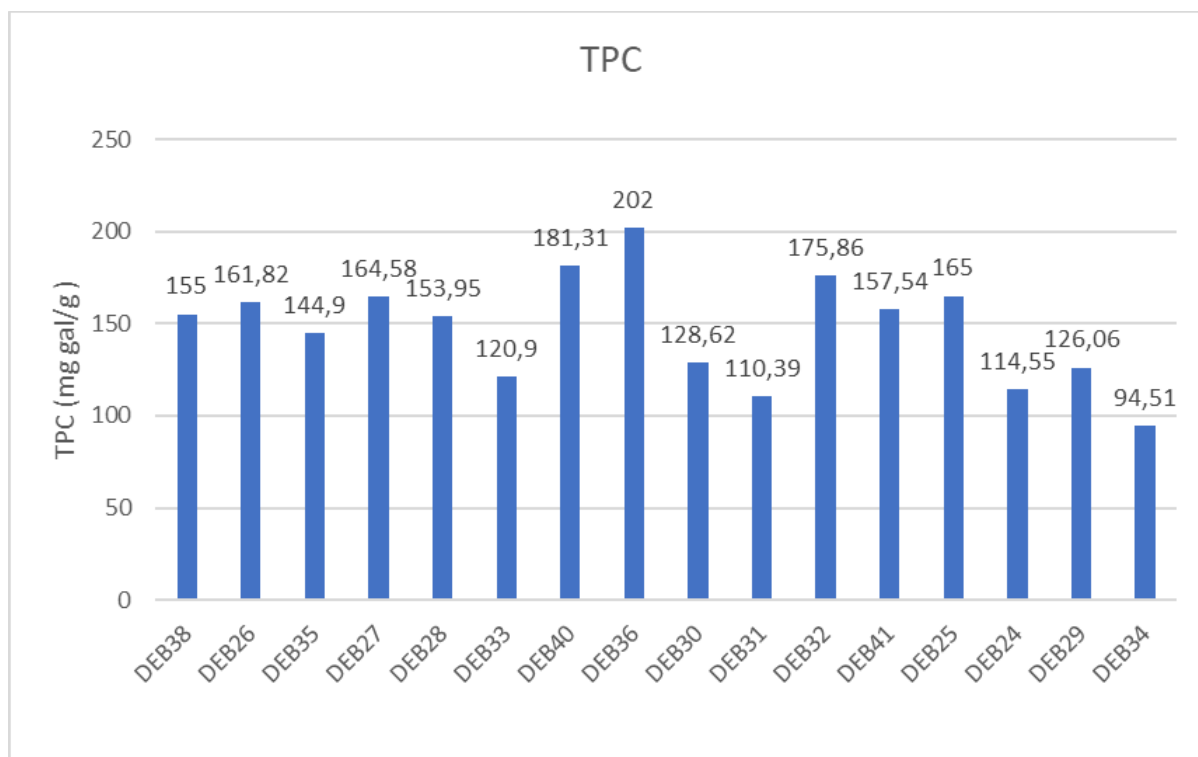
Κωδ. Πειρ.	std	x <sub>1</sub> -x <sub>2</sub> -x <sub>3</sub> *	Coded	y <sub>1</sub> **	y <sub>2</sub> **	y <sub>3</sub> **	y <sub>4</sub> **	y <sub>5</sub> **
DEB24	3	30-50-80	-1+1 0	114,55	43,22	1,13	0,93	0,74
DEB27	14	135-25-80	0 0 0	164,58	52,78	0,88	0,76	0,67
DEB29	2	240-0-80	+1-1 0	126,06	38,04	0,8	0,72	0,64
DEB26	16	135-25-80	0 0 0	161,82	55,24	0,86	0,62	0,36
DEB30	8	240-25-135	+1 0+1	128,62	43,63	0,65	0,52	0,4
DEB33	11	135-0-135	0 -1 +1	120,9	35,4	0,45	0,26	0,08
DEB25	4	240-50-80	+1+1 0	165	63,62	1,08	0,88	0,69
DEB35	15	135-25-80	0 0 0	144,9	40,05	0,81	0,67	0,57
DEB36	9	135-0-25	0-1-1	202	34,69	2,67	2,08	1,71
DEB38	17	135-25-80	0 0 0	155	47,98	0,98	0,65	0,49
DEB31	7	30-25-135	-1 0+1	110,39	37,41	0,52	0,39	0,25
DEB28	12	135-50-135	0+1+1	153,95	52,48	0,74	0,58	0,45
DEB39	13	135-25-80	0 0 0	122,10	39,37	0,50	0,5	0,38
DEB41	5	30-25-25	-1 0-1	157,54	38,22	2,58	2,03	1,58
DEB40	10	135-50-25	0+1-1	181,31	54,6	1,99	1,49	0,96
DEB34	1	30-0-80	-1-1 0	94,51	33,96	0,75	0,45	0,17
DEB32	6	240-25-25	+1 0-1	175,86	52,96	2,24	1,84	1,37

\* x<sub>1</sub>= Χρόνος εκχύλισης (min), x<sub>2</sub>= Ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη (%) και x<sub>3</sub>= Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη

\*\* y<sub>1</sub>= TPC (mg GAE/g rosehip), y<sub>2</sub>= TFC (mg CATE/ g rosehip), y<sub>3</sub>= IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min) (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος), y<sub>4</sub>= IC<sub>50</sub> (DPPH, 30 min) (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος), y<sub>5</sub>= IC<sub>50</sub> (DPPH, 60 min) (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος),

### 3.5.2 Ανάλυση ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων (TPC (mg GAE/ g rosehip))

Κατά την ανάλυση της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, εισήχθησαν σε ένα συγκεντρωτικό ιστόγραμμα οι τιμές TPC που προέκυψαν από το κάθε πείραμα.



Διάγραμμα 14 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών TPC για κάθε πείραμα που διεξήχθη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό

Μελετώντας το Διάγραμμα 14, παρατηρείται ότι βέλτιστη τιμή TPC (202 mg GAE/ g rosehip) επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DEB36 και συνθήκες εκχύλισης 135 min, 0% νερό ως συνδιαλύτη και 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Αντίστοιχα, μικρότερη τιμή TPC (94,51 mg GAE/ g rosehip) προκύπτει στο πείραμα DEB34 με συνθήκες εκχύλισης 30 min, 0% νερό ως συνδιαλύτη και 80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Συνεπώς, ως πρώτη παρατήρηση μπορεί να θεωρηθεί η θετική επίδραση του αυξημένου χρόνου εκχύλισης και η μειωμένη αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη στην αύξηση του περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Σε συνέχεια της ανάλυσης του ολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις, πραγματοποιήθηκε η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου για τον χαρακτηρισμό της ως μεταβλητή απόκρισης. Ως καταλληλότερο μοντέλο επιλέχθηκε το «Τετραγωνικό» (“Quadratic model”).



Πίνακας 32 Επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC

Μοντέλο	Διαδοχική τιμή p	Απουσία προσαρμογής	Προσαρμοσμένο R <sup>2</sup>	Προβλεπόμενο R <sup>2</sup>	
Γραμμικό	0,01	0,07	0,49	0,18	
2FI	0,66	0,05	0,43	-0,61	
Τετραγωνικό	0,01	0,24	0,85	0,27	√
Κυβικό	0,24		0,91		x

Σύμφωνα με τον Πίνακα 32, παρατηρείται ότι το τετραγωνικό μοντέλο πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την συγκεκριμένη μελέτη. Συγκεκριμένα, η τιμή p είναι μικρότερη από 0,05 σε αντίθεση με εκείνη των υπόλοιπων μοντέλων.

Αναφορικά με τους όρους του μοντέλου, λειτουργώντας με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος, επιλέχθηκαν οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στον χρόνο της εκχύλισης (A), το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (B) και την αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (C). Επιπλέον, επιλέχθηκαν οι όροι BC, A<sup>2</sup> και C<sup>2</sup>. Η επιλογή αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τέσσερα κριτήρια:

- η προκύπτουσα τιμή p να είναι μικρότερη του 0,05,
- η προκύπτουσα τιμή έλλειψης προσαρμογής F να χαρακτηρίζεται ως μη σημαντική,
- η διαφορά μεταξύ προβλεπόμενης και προσαρμοσμένης τιμής R<sup>2</sup> να είναι μικρότερη του 0,2.
- η τιμή τιμή “Adequate precision”, η οποία μετρά το λόγο του σήματος προς το θόρυβο, να είναι μεγαλύτερη από το 4

Στους Πίνακες 33, 34 επιβεβαιώνεται η πλήρωση και των τεσσάρων κριτηρίων από το τετραγωνικό μοντέλο, καθιστώντας το ιδανικό για την συγκεκριμένη μελέτη του περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 33 Πίνακας ANOVA του επιλεγμένου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC

	Sum of squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	11743,55	6	1957,26	18,04	0,0002	<b>significant</b>
A-Time	1756,76	1	1756,76	16,19	0,0030	
B-% Water	636,17	1	636,17	5,86	0,0385	
C-Rosehip/Solvent	5143,52	1	5143,52	47,41	< 0,0001	
BC	722,00	1	722,00	6,65	0,0297	
A <sup>2</sup>	2807,15	1	2807,15	25,87	0,0007	
C <sup>2</sup>	677,95	1	677,95	6,25	0,0339	
<b>Residual</b>	976,48	9	108,50			
Lack of Fit	746,10	6	124,35	1,62	0,3714	<b>not significant</b>
Pure Error	230,38	3	76,79			
<b>Cor Total</b>	12720,03	15				

Πίνακας 34 Πίνακας προσαρμογής μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TPC

<b>Std. Dev.</b>	10,42	<b>R<sup>2</sup></b>	0,92
<b>Mean</b>	147,31	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,87
<b>C.V. %</b>	7,07	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,69
		<b>Adeq Precision</b>	14,01

Συγκεκριμένα:

- η τιμή F του μοντέλου είναι ίση με 18,04, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για σημαντικό μοντέλο. Υπάρχει μόνο 0,02% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F λόγω θορύβου.
- οι τιμές p που είναι μικρότερες από 0,05 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Σε αυτήν την περίπτωση τα A, B, C, BC, A<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> θεωρούνται σημαντικοί όροι. Αντιθέτως, τιμές μεγαλύτερες από 0,1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι σημαντικοί.
- η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) είναι ίση με 1,62 και υποδηλώνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική, σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Αναλυτικότερα, υπάρχει 37,14% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F της έλλειψης προσαρμογής λόγω θορύβου.
- Το προβλεπόμενο R<sup>2</sup> ίσο με 0,6938 συμφωνεί εύλογα με το Προσαρμοσμένο R<sup>2</sup> του 0,8721, δεδομένου ότι η μεταξύ τους διαφορά είναι μικρότερη από 0,2.
- Η αναλογία Adequate Precision ίση με 14.012 υποδηλώνει επαρκές σήμα. Συνεπώς, αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλοήγηση στο χώρο σχεδιασμού.

Από το τετραγωνικό μοντέλο προκύπτει η **κωδικοποιημένη εξίσωση**:

$$\text{TPC (mg GAE/ g rosehip)} = 154,05 + 14,82 \cdot A + 8,92 \cdot B + -25,36 \cdot C + 13,44 \cdot BC + -26,49 \cdot A^2 + 13,02 \cdot C^2 \text{ (Εξίσωση 10) όπου:}$$

- A= χρόνος της εκχύλισης (min)
- B= το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (%)
- C= η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g solvent)
- BC= ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη\*αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g solvent)

Σημειώνεται ότι η σημασία της κάθε παραμέτρου (A, B, C) στο συγκεκριμένο μοντέλο αποδεικνύεται, πέρα από την τιμή p-value και από τους συντελεστές της κωδικοποιημένης εξίσωσης. Για παράδειγμα, παρατηρείται ότι ο συντελεστής της παραμέτρου C είναι σημαντικά μεγαλύτερος συγκριτικά με τις υπόλοιπες παραμέτρους του μοντέλου, γεγονός που επιβεβαιώνει την μεγάλη επίδραση που ασκεί.

Η **πραγματική εξίσωση** που προκύπτει έχει ως εξής:

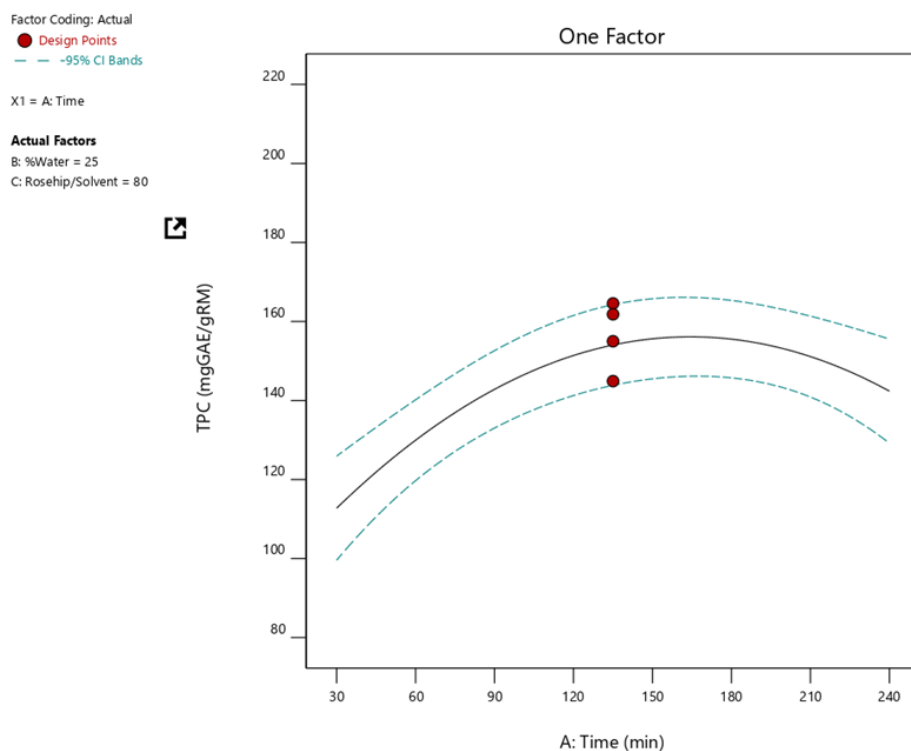
$$\text{TPC (mg GAE/ g rosehip)} = 166,25 + 0,79 \cdot \text{Χρόνος} - 0,42 \cdot \% \text{Νερού ως συνδιαλύτη} - 1,39 \cdot \text{mg rosehip/ g διαλύτη} + 0,01 \cdot \% \text{νερού ως συνδιαλύτη} \cdot \text{mg rosehip/ g διαλύτη} - 0,002 \cdot \text{Χρόνος}^2 + 0,004 \cdot \text{Rosehip/ Διαλύτη}^2 \text{ (Εξίσωση 11)}$$

Η Εξίσωση 11 μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη του συνολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων μετά από αλλαγή των τριών παραμέτρων της εκχύλισης (χρόνος, %νερού ως συνδιαλύτη, αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς διαλύτη).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η μελέτη των μονοδιάστατων και τρισδιάστατων διαγραμμάτων της επιφάνειας απόκρισης του περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC), συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (A=Χρόνος εκχύλισης, B=%Νερού ως συνδιαλύτη, C= Rosehip/ Διαλύτη) αντίστοιχα στο μηδενικό επίπεδο της κάθε παραμέτρου. Το συγκεκριμένο μοντέλο περιλαμβάνει τις μεταβλητές A, B, C, BC, C<sup>2</sup> επομένως θα μελετηθούν τα παρακάτω γραφήματα:

### A (Χρόνος Εκχύλισης)

Διατηρώντας σταθερές τις παραμέτρους B, C σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού επιπέδου (25% & 80 mg/ g) προκύπτει το παρακάτω γράφημα.

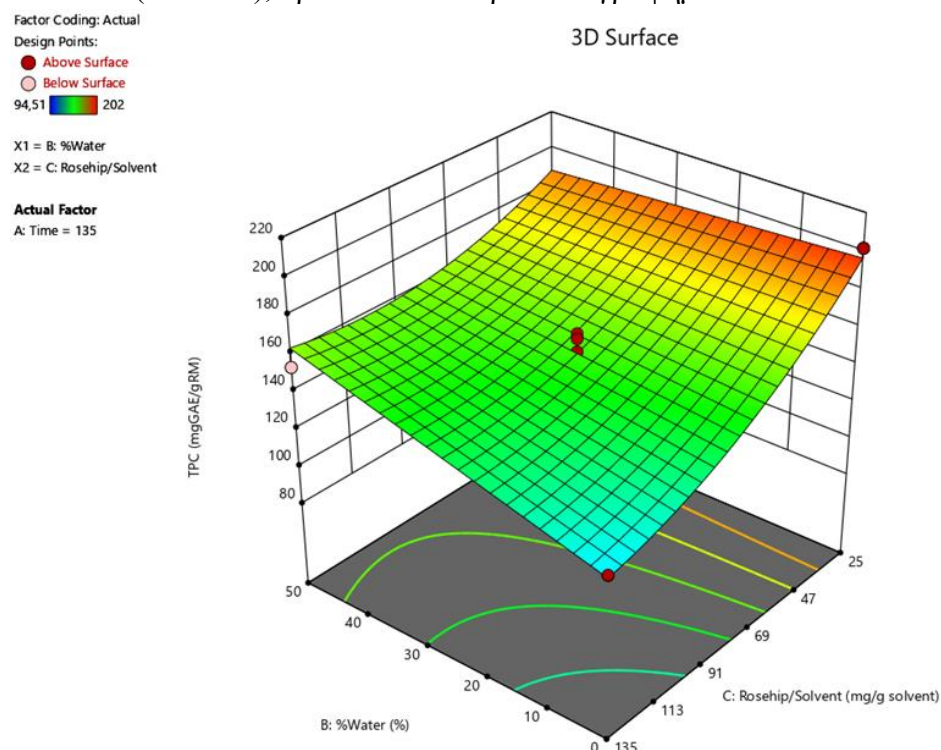


Διάγραμμα 15 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στην μεταβλητή TPC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους B, C.

Από το Διάγραμμα 15, παρατηρείται ότι με αύξηση του χρόνου έπεται αύξηση και του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων. Η αύξηση αυτή συνεχίζεται μέχρις ότου η μεταβλητή απόκρισης TPC να λάβει μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια ακολουθεί σταδιακή μείωση με αύξηση του χρόνου. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η καμπύλη εμφανίζει μέγιστο (~158 mg GAE/ g rosehip) σε χρονική στιγμή περίπου ίση με 160 min.

### **BC (%νερού ως συνδιαλύτη \* αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα δ/τη)**

Διατηρώντας σταθερή την παράμετρο του χρόνου σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού της επιπέδου (135 min), προκύπτει το παρακάτω γράφημα.

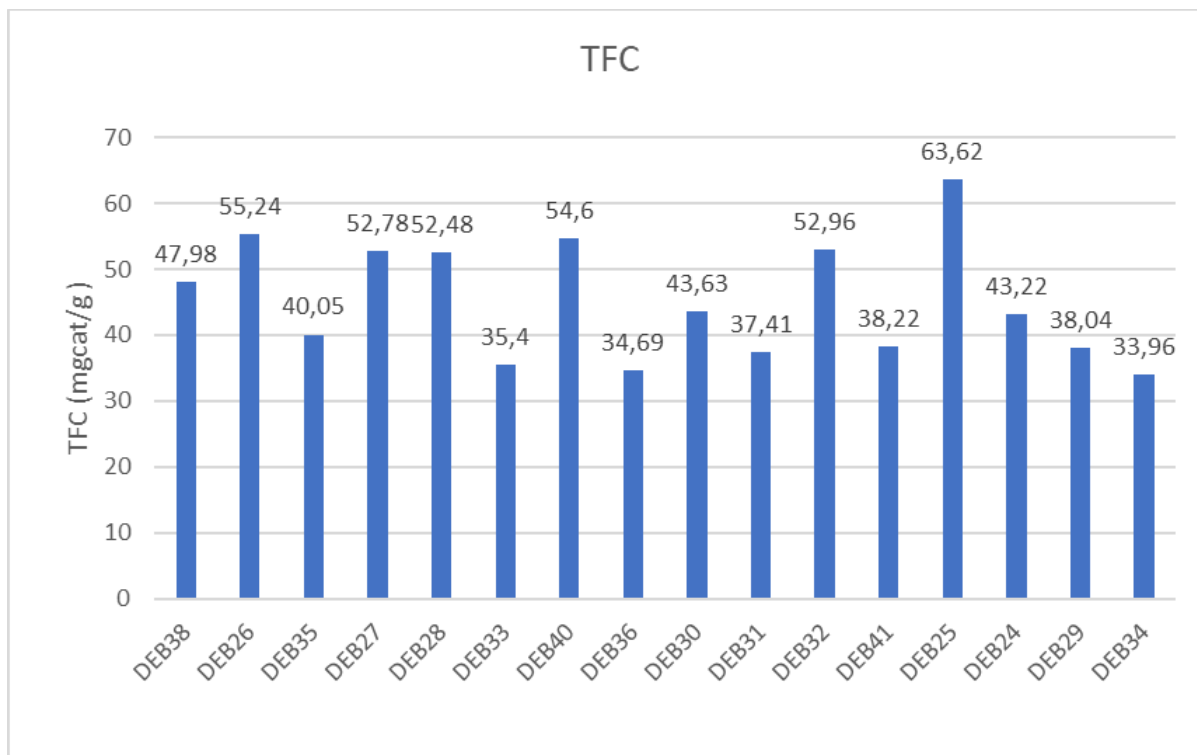


Διάγραμμα 16 Τρισδιάστατο διάγραμμα της επίδρασης των παραμέτρων %νερού ως συνδιαλύτη και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης/μάζα διαλύτη στην μεταβλητή TPC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για την παράμετρο A

Από το Διάγραμμα 16 συμπεραίνεται ότι τόσο το ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη όσο και η αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη επιδρούν σημαντικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Το πόρισμα αυτό αποδεικνύεται από την κλίση του γραφήματος. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας C (αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ διαλύτη) ασκεί μεγαλύτερη επίδραση (μεγαλύτερη κλίση) στην μεταβλητή απόκρισης TPC από ότι ο παράγοντας B. Επιπλέον, σημειώνεται ότι με αύξηση του όρου B (ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη) παρατηρείται αύξηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων ενώ με αύξηση του όρου C (αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη), παρατηρείται μείωση.

### 3.5.3 Ανάλυση ολικής συγκέντρωσης φλαβονοειδών (TFC (mg CATE/ g rosehip))

Κατά την ανάλυση της ολικής συγκέντρωσης φλαβονοειδών, εισήχθησαν σε ένα συγκεντρωτικό ιστόγραμμα οι τιμές TFC που προέκυψαν από το κάθε πείραμα.



Διάγραμμα 17 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα των τιμών TFC για κάθε πείραμα που διεξήχθη κατά τον πειραματικό σχεδιασμό

Μελετώντας το Διάγραμμα 17, παρατηρείται ότι βέλτιστη τιμή TFC (63,62 mg CATE/ g rosehip) επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DEB25 και συνθήκες εκχύλισης 240 min, 50% νερό ως συνδιαλύτη και 80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Αντίστοιχα, μικρότερη τιμή TFC (33,96 mg CATE/ g rosehip) προκύπτει στο πείραμα DEB34 με συνθήκες εκχύλισης 30 min, 0% νερό ως συνδιαλύτη και 80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Συνεπώς, ως πρώτη παρατήρηση μπορεί να θεωρηθεί η θετική επίδραση του αυξημένου χρόνου εκχύλισης και το αυξημένο ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη κατά την εκχύλιση, στην αύξηση του περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Σε συνέχεια της ανάλυσης της ολικής συγκέντρωσης φλαβονοειδών, πραγματοποιήθηκε η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου για τον χαρακτηρισμό της ως μεταβλητή απόκρισης. Ως καταλληλότερο μοντέλο επιλέχθηκε το «Γραμμικό» (“Linear model”).

Πίνακας 35 Επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC

Μοντέλο	Διαδοχική τιμή p	Απουσία προσαρμογής	Προσαρμοσμένο R <sup>2</sup>	Προβλεπόμενο R <sup>2</sup>	
Γραμμικό	0,0007	0,85	0,68	0,61	√
2FI	0,3816	0,88	0,69	0,67	
Τετραγωνικό	0,4172	0,96	0,70	0,66	
Κυβικό	0,9627		0,46		x

Σύμφωνα με τον Πίνακα 35, παρατηρείται ότι το γραμμικό μοντέλο πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την συγκεκριμένη μελέτη. Συγκεκριμένα, η τιμή p είναι μικρότερη από 0,05 σε αντίθεση με εκείνη των υπόλοιπων μοντέλων.

Αναφορικά με τους όρους του μοντέλου, λειτουργώντας με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος, επιλέχθηκαν οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στον χρόνο της εκχύλισης (A), το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (B) και την αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (C). Η επιλογή αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τέσσερα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως, κατά την ανάλυση TPC.

Στους Πίνακες 36, 37 επιβεβαιώνεται η πλήρωση και των τεσσάρων προϋποθέσεων από το γραμμικό μοντέλο, καθιστώντας το ιδανικό για την συγκεκριμένη μελέτη του περιεχομένου φλαβονοειδών.

Πίνακας 36 Πίνακας ANOVA του επιλεγμένου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC

	Sum of squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	919,72	3	306,57	11,74	0,001	<b>significant</b>
A-Time	258,10	1	258,10	9,88	0,0085	
B-% Water	644,94	1	644,94	24,69	0,0003	
C-Rosehip/Solvent	16,68	1	16,68	0,64	0,4398	
<b>Residual</b>	313,48	12	26,12			
Lack of Fit	179,12	9	19,90	0,44	0,8484	<b>not significant</b>
Pure Error	134,37	3	44,79			
<b>Cor Total</b>	1233,20	15				

Πίνακας 37 Πίνακας προσαρμογής του επιλεγμένου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής TFC

<b>Std. Dev.</b>	5,11	<b>R<sup>2</sup></b>	0,75
<b>Mean</b>	45,27	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,68
<b>C.V. %</b>	11,29	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,61
		<b>Adeq Precision</b>	11,47

Συγκεκριμένα:

- η τιμή F του μοντέλου είναι ίση με 11,74, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για σημαντικό μοντέλο. Υπάρχει μόνο 0,07% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F λόγω θορύβου.
- οι τιμές p που είναι μικρότερες από 0,05 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Σε αυτήν την περίπτωση τα A, B θεωρούνται σημαντικοί όροι. Αντιθέτως, τιμές μεγαλύτερες από 0,1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι δεν είναι σημαντικοί. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο όρος C δεν θεωρείται σημαντικός για το μοντέλο. Ωστόσο, δεδομένου ότι πρόκειται για μια από τις τρεις βασικές παραμέτρους προς μελέτη, επιλέγεται να συμπεριληφθεί στο τελικό μοντέλο.
- η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) είναι ίση με 0,44 και υποδηλώνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική, σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Αναλυτικότερα, υπάρχει 84,84% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F της έλλειψης προσαρμογής λόγω θορύβου.
- Το προβλεπόμενο R<sup>2</sup> ίσο με 0,61 συμφωνεί εύλογα με το Προσαρμοσμένο R<sup>2</sup> του 0,6822, δεδομένου ότι η μεταξύ τους διαφορά είναι μικρότερη από 0,2.
- Η αναλογία Adequate Precision ίση με 11,47 υποδηλώνει επαρκές σήμα. Συνεπώς, αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλοήγηση στο χώρο σχεδιασμού.

Από το γραμμικό μοντέλο προκύπτει η **κωδικοποιημένη εξίσωση**

**TFC (mg CATE/ g rosehip) = 45,27 + 5,68 \* A + 8,98 \* B - 1,44 \* C** (Εξίσωση 12)

όπου:

- A= χρόνος της εκχύλισης (min)
- B= το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (%)
- C= η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g solvent)

Σημειώνεται ότι η σημασία της κάθε παραμέτρου (A, B, C) στο συγκεκριμένο μοντέλο αποδεικνύεται, πέρα από την τιμή p-value και από τους συντελεστές της κωδικοποιημένης εξίσωσης. Για παράδειγμα, παρατηρείται ότι ο συντελεστής της παραμέτρου C είναι σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες παραμέτρους του μοντέλου, γεγονός που επιβεβαιώνει την μικρή επίδραση που ασκεί.

Η **πραγματική εξίσωση** που προκύπτει έχει ως εξής:

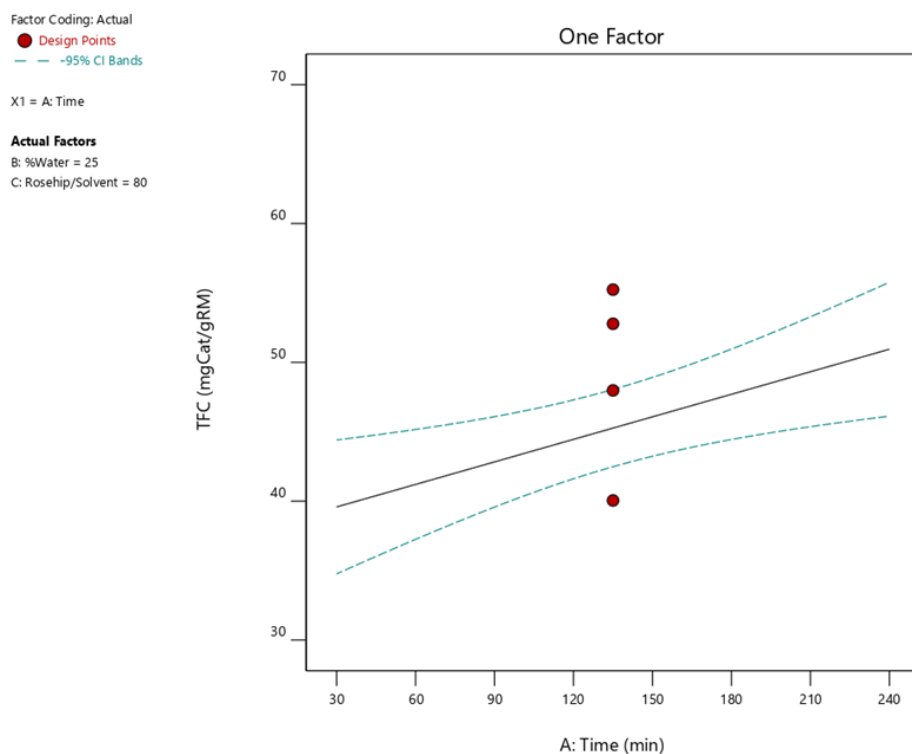
$$\text{TFC (mg CATE/ g rosehip)} = 31,09 + 0,05 * \text{Χρόνος εκχύλισης} + 0,36 * \% \text{Νερού ως συνδιαλύτη} - 0,03 * \text{μάζα rosehip/μάζα διαλύτη (Εξίσωση 13)}$$

Η Εξίσωση 13 μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη του συνολικού περιεχομένου φλαβονοειδών μετά από αλλαγή των τριών παραμέτρων της εκχύλισης (χρόνος, %νερού ως συνδιαλύτη, αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς διαλύτη).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η μελέτη των μονοδιάστατων και τρισδιάστατων διαγραμμάτων της επιφάνειας απόκρισης του περιεχομένου φλαβονοειδών (TFC), συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (A=Χρόνος εκχύλισης, B=%Νερού ως συνδιαλύτη, C= Rosehip/ Διαλύτη) αντίστοιχα στο μηδενικό τους επίπεδο. Το συγκεκριμένο μοντέλο περιλαμβάνει τις μεταβλητές A, B, C, BC, C<sup>2</sup> επομένως θα μελετηθούν τα παρακάτω γραφήματα:

### A (Χρόνος εκχύλισης)

Διατηρώντας σταθερές τις παραμέτρους B, C σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού τους επιπέδου (25% & 80 mg/g), προκύπτει το παρακάτω γράφημα.



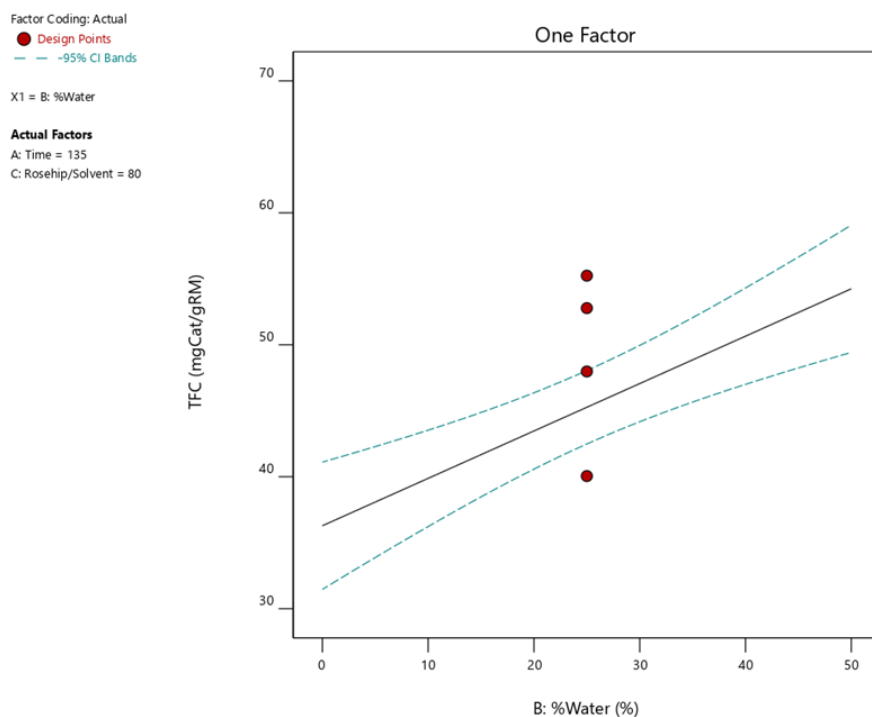
Διάγραμμα 18 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του χρόνου στην μεταβλητή απόκρισης TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους B, C



Σύμφωνα με το Διάγραμμα 18, επισημαίνεται ότι με αύξηση του χρόνου εκχύλισης έπεται γραμμική αύξηση και του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών.

### **B (% νερού ως συνδιαλύτη)**

Διατηρώντας σταθερές τις παραμέτρους A, C σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού τους επιπέδου (135 min & 80 mg/g), προκύπτει το παρακάτω γράφημα.

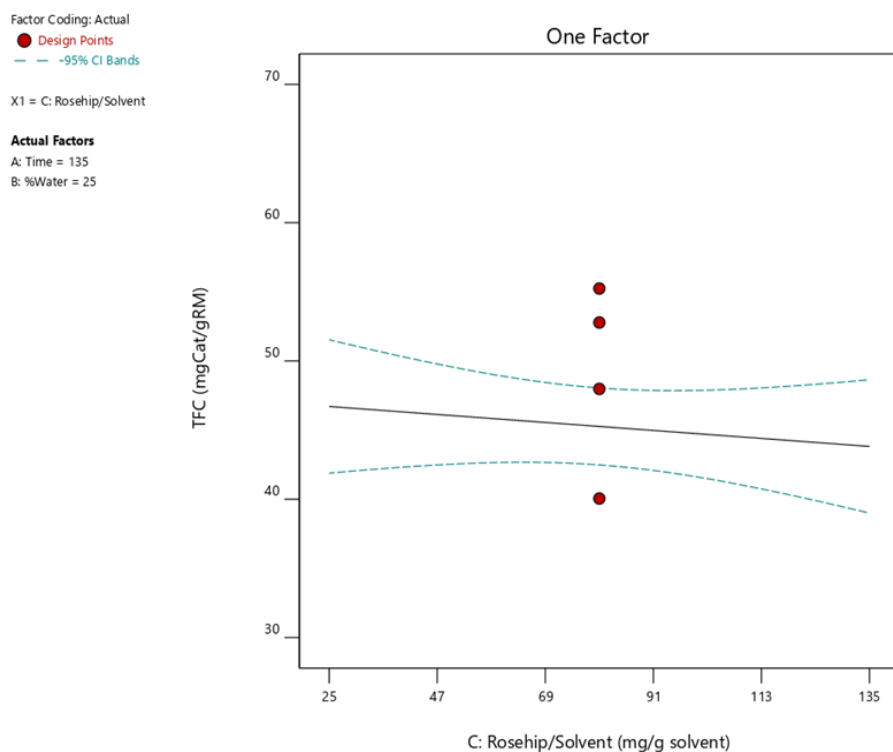


*Διάγραμμα 19 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη στην μεταβλητή TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις παραμέτρους A, C*

Μελετώντας το Διάγραμμα 19, συμπεραίνεται ότι με αύξηση του ποσοστού του νερού στον διαλύτη έπεται γραμμική αύξηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών, σε μεγαλύτερη κλίση συγκριτικά με το Διάγραμμα 19.

### C (Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη)

Διατηρώντας σταθερές τις παραμέτρους A, B σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού τους επιπέδου (135 min & 25%), προκύπτει το παρακάτω γράφημα.



Διάγραμμα 20 Μονοδιάστατο διάγραμμα επίδρασης της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στη μεταβλητή TFC στο μηδενικό σημείο του πειραματικού σχεδιασμού για τις μεταβλητές A, B

Με βάση το Διάγραμμα 20, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι με αύξηση της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη έπεται γραμμική μείωση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών. Ωστόσο, σημειώνεται ότι η κλίση της καμπύλης είναι μικρότερη συγκριτικά με τα προηγούμενα γραφήματα. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η παράμετρος C δεν ασκεί μεγάλη επίδραση στη μεταβλητή απόκρισης TFC, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την μεγάλη τιμή p-value της παραμέτρου στο μοντέλο καθώς και τον μικρό της συντελεστή στην κωδικοποιημένη εξίσωση.

### 3.5.4 Ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης [IC<sub>50</sub> (DPPH) (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος)]

#### 3.5.4.1 Μελέτη επίδρασης του χρόνου στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του χρόνου στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι χρόνοι 15, 30, και 60 λεπτά μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου DPPH στην πλακέτα με τα διαλύματα στοκ των εκχυλισμάτων και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα στον Πίνακα 38.

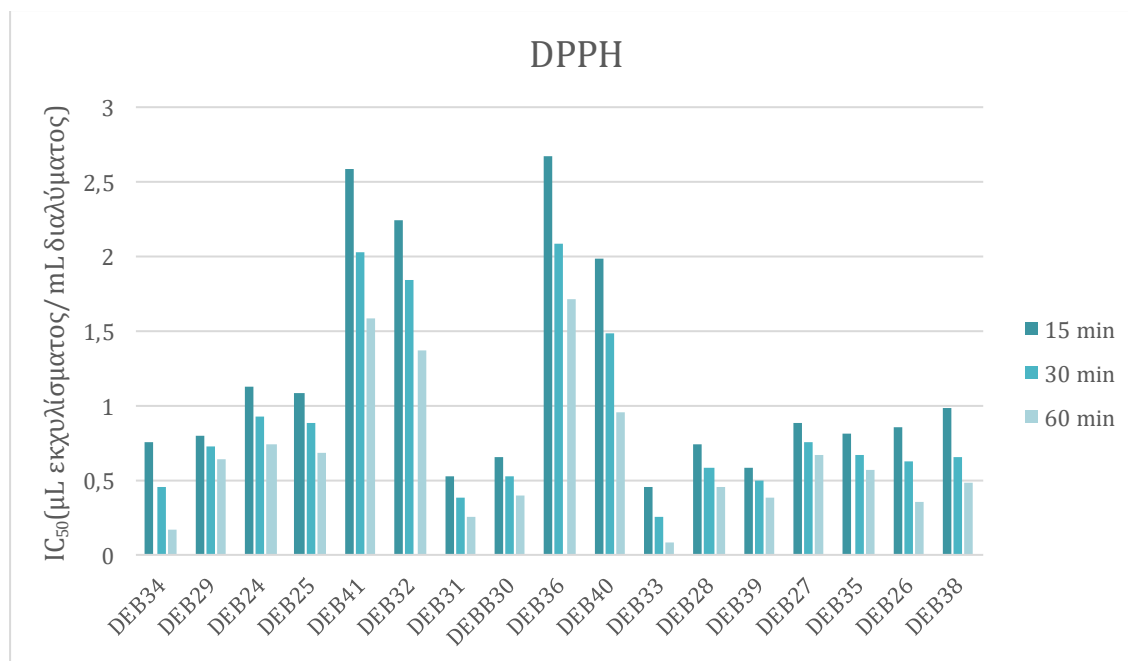
Πίνακας 38 Αποτελέσματα της τιμής IC<sub>50</sub> (DPPH) κατά τον πειραματικό σχεδιασμό 15, 30 και 60 min αντίστοιχα μετά την προσθήκη της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα

Κωδικός Πειράματος	Std DE	x <sub>1</sub> -x <sub>2</sub> -x <sub>3</sub> *	Coded	IC <sub>50</sub> (DPPH) (μL εκχυλίσματος/ mL δείγματος)		
				15 min	30 min	60 min
DEB34	1	30-0-80	-1 -1 0	0,75	0,45	0,17
DEB29	2	240-0-80	+1 -1 0	0,8	0,72	0,64
DEB24	3	30-50-80	-1 +1 0	1,13	0,93	0,74
DEB25	4	240-50-80	+1 +1 0	1,08	0,88	0,69
DEB41	5	30-25-25	-1 0 -1	2,58	2,03	1,58
DEB32	6	240-25-25	+1 0 -1	2,24	1,84	1,37
DEB31	7	30-25-135	-1 0 +1	0,52	0,39	0,25
DEB30	8	240-25-135	+1 0 +1	0,65	0,52	0,4
DEB36	9	135-0-25	0 -1 -1	2,67	2,08	1,71
DEB40	10	135-50-25	0 +1 -1	1,99	1,49	0,96
DEB33	11	135-0-135	0 -1 +1	0,45	0,26	0,08
DEB28	12	135-50-135	0 +1 +1	0,74	0,58	0,45
DEB39	13	135-25-80	0 0 0	0,59	0,5	0,38
DEB27	14	135-25-80	0 0 0	0,88	0,76	0,67
DEB35	15	135-25-80	0 0 0	0,81	0,67	0,57
DEB26	16	135-25-80	0 0 0	0,86	0,62	0,36
DEB38	17	135-25-80	0 0 0	0,98	0,65	0,49

\* x<sub>1</sub>= Χρόνος εκχύλισης (min), x<sub>2</sub>= Ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη (%) και x<sub>3</sub>= Αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων μελετήθηκε η τιμή της μεταβλητής IC<sub>50</sub> (DPPH). Συγκεκριμένα, όσο χαμηλότερη είναι τιμή IC<sub>50</sub> (DPPH), τόσο υψηλότερη θα είναι και η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Μελετώντας τον Πίνακα 38, παρατηρείται ότι με το πέρασμα του χρόνου η αντιοξειδωτική δράση των διαλυμάτων στοκ μεγαλώνει. Αναλυτικότερα, σε κάθε πείραμα σημειώνεται σημαντική μείωση της τιμής της συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> (DPPH) μεταβαίνοντας από τα 15 λεπτά στα 30. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι ο χρόνος επώασης δρα ευεργετικά στην αντιοξειδωτική δράση.

Με στόχο την σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του κάθε πειράματος, συγκεντρώνονται γραφικά οι τιμές  $IC_{50}$  (DPPH) υπό την μορφή ενός ιστογράμματος.



Διάγραμμα 21 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών μεταβλητής  $IC_{50}$  (DPPH) για το κάθε πείραμα σε χρόνους 15, 30 και 60 λεπτά επώασης των εκχυλισμάτων

Μελετώντας το Διάγραμμα 21, παρατηρείται ότι βέλτιστη (μικρότερη) τιμή  $IC_{50}$  (DPPH) (0,45-0,26-0,08  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος/  $\text{mL}$  διαλύματος) επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DEB33 και συνθήκες εκχύλισης 135 min (A), 0% νερό ως συνδιαλύτη (B) και 135 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη (C). Αντίστοιχα, μεγαλύτερη τιμή  $IC_{50}$  (2,67-2,08-1,71  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος/  $\text{mL}$  διαλύματος) προκύπτει στο πείραμα DEB36 με συνθήκες εκχύλισης 135 min (A), 0% νερό ως συνδιαλύτη (B) και 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη (C).

Συνεπώς, ως πρώτη παρατήρηση μπορεί να θεωρηθεί η θετική επίδραση της αυξημένης αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στην ελαχιστοποίηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης  $IC_{50}$ (DPPH) και κατ'επέκταση την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

### 3.5.4.2 Σύγκριση αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με το ασκορβικό οξύ

Στα πλαίσια της μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της ρίζας DPPH σε διάλυμα ασκορβικού οξέος ως σύστημα αναφοράς. Οι τιμές της συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> (DPPH) που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 39:

*Πίνακας 39 Αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων εκχύλισης με FGW115, 15 λεπτά μετά την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH*

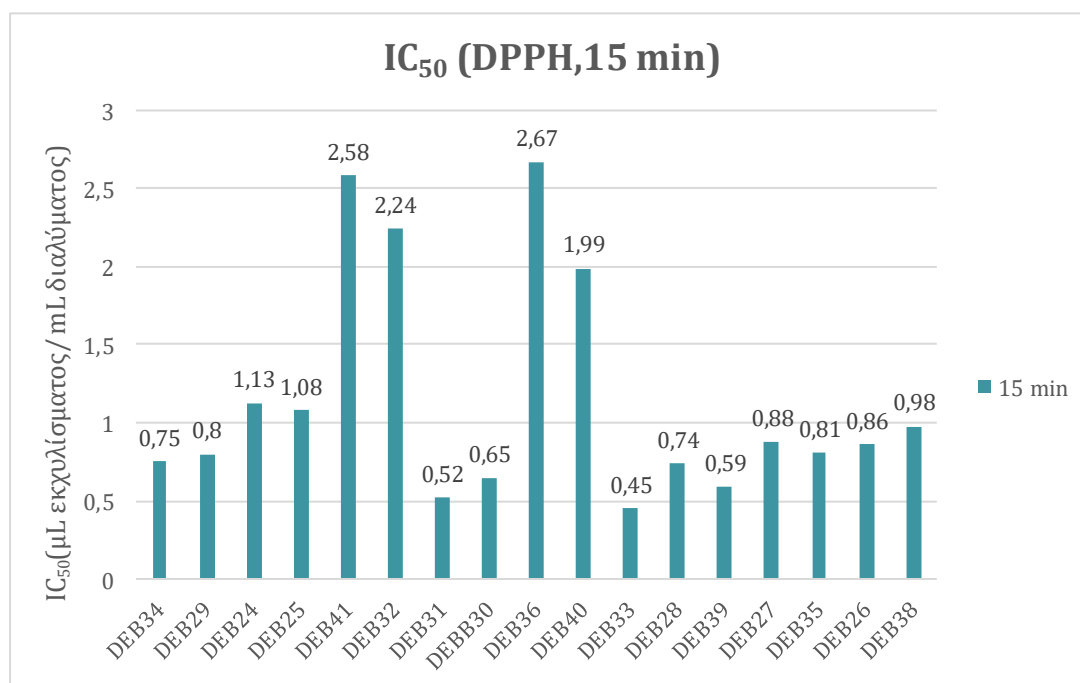
Stock Διάλυμα προς μέτρηση	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Νερό ως συνδ/της (%)	mg rosehip/ g δ/τη (mg/ g)	IC <sub>50</sub> (DPPH, 15min) (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος )	IC <sub>50</sub> (DPPH, 15min) (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος )
DEB15	60	0	25	3,72	4,27
DEB16	60	25	25	0,68	0,78
DEB17	360	25	25	2,09	2,39
DEB18	180	25	25	2,04	2,43
DEB20	60	10	25	2,43	2,93
DEB21	60	25	12,5	4,62	5,16
DEB22	60	25	75	0,84	1,01

Μελετώντας τους Πίνακες 38, 39, παρατηρείται ότι τα προκύπτοντα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού καθώς και των προκαταρκτικών πειραμάτων παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το **ασκορβικό οξύ (0,50 mg/ mL)**. Το πόρισμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό στη φύση. Αντιθέτως, τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από εκχύλιση με FGW115 περιέχουν συγκεκριμένες ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, οι οποίες, σε αντίθεση με το ασκορβικό οξύ, έχουν υποστεί περαιτέρω διάλυση.

### 3.5.4.3 Ανάλυση αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών επώασης μετά από προσθήκη DPPH [ $IC_{50}$ (DPPH 15min) $\mu$ L εκχυλίσματος/ mL διαλύματος]

Για τους σκοπούς του πειραματικού σχεδιασμού, επιλέχθηκε ως παράμετρος μελέτης η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών μετά από την προσθήκη του αντιδραστηρίου DPPH.

Κατά την ανάλυση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, εισήχθησαν σε ένα συγκεντρωτικό ιστόγραμμα οι προκύπτουσες τιμές ανασταλτικής συγκέντρωσης  $IC_{50}$  (DPPH) του κάθε πειράματος.



Διάγραμμα 22 Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα τιμών της μεταβλητής  $IC_{50}$  κατά τον πειραματικό σχεδιασμό για χρόνο επώασης εκχυλίσματος ίσο με 15 min

Από το Διάγραμμα 22 διεξάγονται τα ίδια συμπεράσματα με εκείνα του Διαγράμματος 21. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα του πειράματος DEB33 εμφανίζει βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση ενώ του DEB36 παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή  $IC_{50}$  (DPPH). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες εκχύλισης των δύο πειραμάτων, φαίνεται η αύξηση της αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη να επιδρά θετικά στην αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

Σε συνέχεια της ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών, πραγματοποιήθηκε η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου για τον χαρακτηρισμό της ως μεταβλητή απόκρισης. Ως καταλληλότερο μοντέλο επιλέχθηκε το «Τετραγωνικό» (“Quadratic model”).

Πίνακας 40 Επιλογή του κατάλληλου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής απόκρισης IC<sub>50</sub> (15 min)

Μοντέλο	Διαδοχική τιμή ρ	Απουσία προσαρμογής	Προσαρμοσμένο R <sup>2</sup>	Προβλεπόμενο R <sup>2</sup>	
Γραμμικό	0,0003	0,01	0,73	0,59	
2FI	0,63	0,004	0,70	0,26	
Τετραγωνικό	0,003	0,05	0,95	0,71	√
Κυβικό	0,05		0,99		x

Σύμφωνα με τον Πίνακα 40, παρατηρείται ότι το τετραγωνικό μοντέλο πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την συγκεκριμένη μελέτη. Συγκεκριμένα, η τιμή ρ είναι μικρότερη από 0,05 σε αντίθεση με εκείνη των υπόλοιπων μοντέλων.

Αναφορικά με τους όρους του μοντέλου, λειτουργώντας με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος, επιλέχθηκαν οι μεταβλητές που αντιστοιχούν στον χρόνο της εκχύλισης (A), το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (B) και την αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (C). Επιπλέον, επιλέχθηκαν οι όροι AC, BC και C<sup>2</sup>. Η επιλογή αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τα τέσσερα κριτήρια που προαναφέρθηκαν στις προηγούμενες ενότητες.

Στους Πίνακες 41, 42 επιβεβαιώνεται η πλήρωση και των τεσσάρων προϋποθέσεων από το τετραγωνικό μοντέλο, καθιστώντας το ιδανικό για την συγκεκριμένη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 41 Πίνακας ANOVA του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min)

	Sum of squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	7,94	6	1,32	68,33	< 0.0001	<b>significant</b>
A-Time	0,01	1	0,01	0,28	0,61	
B-% Water	0,01	1	0,01	0,47	0,51	
C-Rosehip/Solvent	6,34	1	6,34	327,37	< 0.0001	
AC	0,06	1	0,06	2,85	0,13	
BC	0,24	1	0,24	12,15	0,01	
C <sup>2</sup>	1,29	1	1,29	66,84	< 0.0001	
<b>Residual</b>	0,17	9	0,02			
Lack of Fit	0,16	6	0,03	5,20	0,10	<b>not significant</b>
Pure Error	0,02	3	0,06			
<b>Cor Total</b>	8,11	15				

Πίνακας 42 Πίνακας προσαρμογής του επιλεγόμενου μοντέλου για την ανάλυση της μεταβλητής IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min)

<b>Std. Dev.</b>	0,14	<b>R<sup>2</sup></b>	0,98
<b>Mean</b>	1,20	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,96
<b>C.V. %</b>	11,64	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,90
		<b>Adeq Precision</b>	24,61

Συγκεκριμένα:

- η τιμή F του μοντέλου είναι ίση με 68,33, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για σημαντικό μοντέλο. Υπάρχει μόνο 0,01% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F λόγω θορύβου.
- οι τιμές p που είναι μικρότερες από 0,05 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Σε αυτήν την περίπτωση τα C, BC, C<sup>2</sup> θεωρούνται σημαντικοί όροι. Αντιθέτως, τιμές μεγαλύτερες από 0,1000 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου δεν είναι σημαντικοί. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι όροι A, B, AC δεν θεωρούνται σημαντικοί. Ωστόσο, δεδομένου ότι πρόκειται για δύο από τις τρεις βασικές παραμέτρους προς μελέτη, επιλέγεται να συμπεριληφθούν στο τελικό μοντέλο.
- η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) είναι ίση με 5,20 και υποδηλώνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική, σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Αναλυτικότερα, υπάρχει 10,20% πιθανότητα να προκύψει μια τόσο μεγάλη τιμή F της έλλειψης προσαρμογής λόγω θορύβου.
- Το προβλεπόμενο R<sup>2</sup> ίσο με 0,90 συμφωνεί εύλογα με το Προσαρμοσμένο R<sup>2</sup> του 0,96, δεδομένου ότι η μεταξύ τους διαφορά είναι μικρότερη από 0,2.
- Η αναλογία Adequate Precision ίση με 24,61 υποδηλώνει επαρκές σήμα. Συνεπώς, αυτό το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλοήγηση στο χώρο σχεδιασμού.

Από το τετραγωνικό μοντέλο προκύπτει η **κωδικοποιημένη εξίσωση**

$$IC_{50} \text{ (DPPH, 15 min)} \text{ (}\mu\text{L εκχύλισματος/mL διαλύματος)} = 0,91 - 0,03 * A + 0,03 * B - 0,89 * C + 0,12 * AC + 0,24 * BC + 0,57 * C^2 \text{ (Εξίσωση 14)}$$

όπου:

- A= χρόνος της εκχύλισης (min)
- B= το ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη (%)
- C= η αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (mg rosehip/ g διαλύτη)
- AC= χρόνος της εκχύλισης\*αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (min\*mg rosehip/ g διαλύτη)
- BC= ποσοστό του νερού ως συνδιαλύτη\*αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη (% water\*mg rosehip/ g διαλύτη)



Σημειώνεται ότι η σημασία της κάθε παραμέτρου (A, B, C) στο συγκεκριμένο μοντέλο αποδεικνύεται, πέρα από την τιμή p-value και από τους συντελεστές της κωδικοποιημένης εξίσωσης. Για παράδειγμα, παρατηρείται ότι οι συντελεστές των παραμέτρων A, B είναι σημαντικά μικρότεροι σε σύγκριση με τις υπόλοιπες παραμέτρους του μοντέλου, γεγονός που επιβεβαιώνει την μικρή επίδραση που ασκούν.

Συνεπώς, η **πραγματική εξίσωση** που προκύπτει έχει ως εξής:

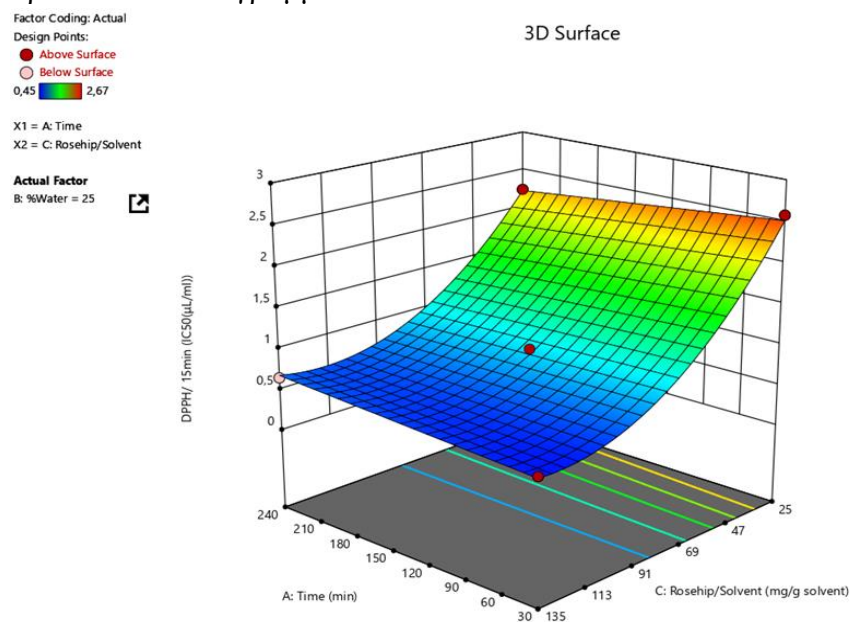
$$IC_{50} \text{ (DPPH, 15 min)} \text{ (}\mu\text{L εκχυλίσματος/mL διαλύματος)} = 3,98 - 0,002 * \text{Χρόνος} - 0,01 * \% \text{Νερού ως συνδιαλύτη} - 0,05 * \text{Rosehip/ Διαλύτη} + 0,000020 * \text{Χρόνος} * \text{Rosehip/ Διαλύτη} + 0,0002 * \% \text{Νερού ως συνδιαλύτη} * \text{Rosehip/ Διαλύτη} + 0,0002 * \text{Rosehip/ Διαλύτη}^2 \text{ (Εξίσωση 15)}$$

Η Εξίσωση 15 μπορεί να αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής δράσης μετά από αλλαγή των τριών παραμέτρων της εκχύλισης (χρόνος, %νερού ως συνδιαλύτη, αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς διαλύτη).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η μελέτη των μονοδιάστατων και τρισδιάστατων διαγραμμάτων της επιφάνειας απόκρισης αντιοξειδωτικής δράσης ( $IC_{50}$ , 15min), συναρτήσσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (A=Χρόνος εκχύλισης, B=%Νερού ως συνδιαλύτη, C= Rosehip/ Διαλύτη) αντίστοιχα στο μηδενικό επίπεδο. Το συγκεκριμένο μοντέλο περιλαμβάνει τις μεταβλητές A, B, C, AC, BC,  $C^2$  επομένως θα μελετηθούν τα παρακάτω γραφήματα:

### AC (Χρόνος εκχύλισης\* Αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη)

Διατηρώντας σταθερή την παράμετρο B σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού επιπέδου (25%), προκύπτει το Διάγραμμα 23.

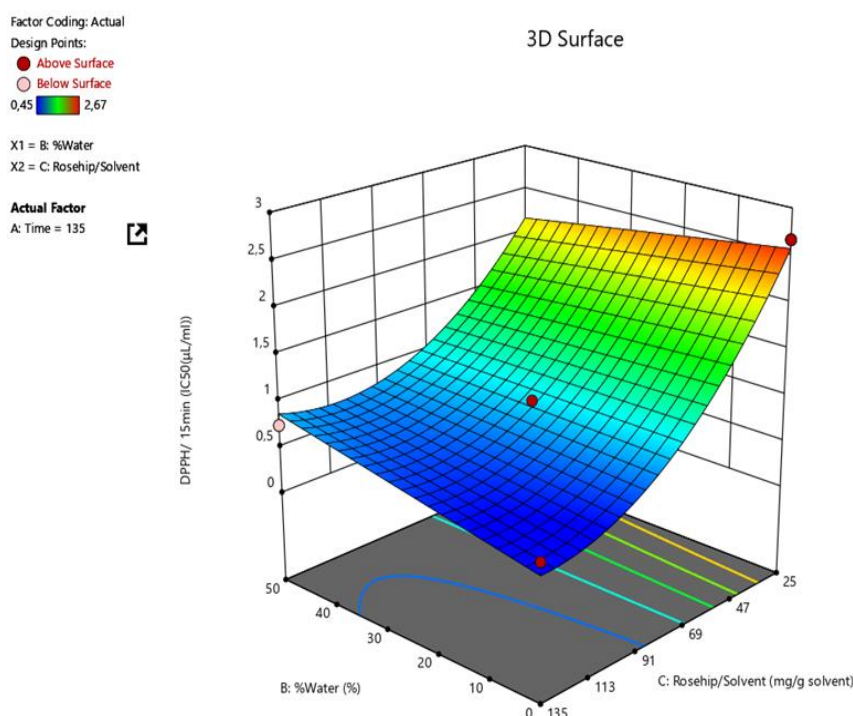


Διάγραμμα 23 Τρισδιάστατο διάγραμμα επίδρασης των παραμέτρων χρόνου και αναλογίας μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στο μηδενικό σημείο της παραμέτρου B

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 23, με αύξηση του παράγοντα A (χρόνος εκχύλισης, αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη) προκαλείται αύξηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min) και κατ'επέκταση μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Αντίθετα, με αύξηση του παράγοντα C (αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη) παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Μεταξύ των δύο παραμέτρων (A, C) σημειώνεται ότι μεγαλύτερη επίδραση (μεγαλύτερη κλίση) στην αντιοξειδωτική δράση ασκεί η μεταβολή της παραμέτρου C (αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη).

### **BC (%Νερού ως συνδιαλύτη \* Αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη)**

Διατηρώντας σταθερή την παράμετρο A σε τιμή ίση με εκείνη του μηδενικού επιπέδου (135 min), προκύπτει το Διάγραμμα 24.



*Διάγραμμα 24 Τρισδιάστατο διάγραμμα επίδρασης των παραμέτρων %νερού ως συνδιαλύτη και αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στο μηδενικό σημείο της παραμέτρου A*

Μελετώντας το Διάγραμμα 24, επισημαίνεται ότι με αύξηση του παράγοντα B (% νερού ως συνδιαλύτη) προκαλείται αύξηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min) και κατ'επέκταση μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Αντίθετα, με αύξηση του παράγοντα C (αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη) παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Μεταξύ των δύο παραμέτρων (B, C) σημειώνεται ότι μεγαλύτερη επίδραση (μεγαλύτερη κλίση) στην αντιοξειδωτική δράση ασκεί η μεταβολή της παραμέτρου C (αναλογία πρώτης ύλης προς διαλύτη).

### 3.5.5 Βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης

#### 3.5.5.1 Βελτιστοποίηση ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC; mg GAE/ g rosehip)

Σε συνέχεια της μελέτης του πειραματικού σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων. Ο βέλτιστος συνδυασμός των παραμέτρων της εκχύλισης χάρη στον οποίο προέκυψε μέγιστος αριθμός TPC είναι:

Πίνακας 43 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης TPC

Χρόνος εκχύλισης (min)	Νερό ως συνδιαλύτης (%)	Rosehip/Διαλύτη (mg/g)	TPC (mg GAE/g rosehip)	Desirability
164,31	0	25	199,01	0,97

Κατά την διαδικασία βελτιστοποίησης, ο επιθυμητός στόχος συνδυάζεται σε μια συνάρτηση επιθυμητότητας και το πρόγραμμα Design Expert επιδιώκει να μεγιστοποιήσει αυτή τη λειτουργία. Ιδανικότερη είναι η κατάσταση των παραμέτρων στην οποία η επιθυμητότητα (desirability) είναι μέγιστη. Για αυτό τον λόγο επιλέγεται ο παραπάνω συνδυασμός ως βέλτιστο σημείο TPC για τη διεργασία της εκχύλισης.

#### 3.5.5.2 Βελτιστοποίηση ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών (TFC; mg CATE/ g rosehip)

Ομοίως πραγματοποιείται η βελτιστοποίηση της διεργασίας ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών. Συγκριμένα, ο βέλτιστος συνδυασμός παραμέτρων ως προς την μεταβλητή TFC παρουσιάζεται στον Πίνακα 44.

Πίνακας 44 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης TFC

Χρόνος εκχύλισης (min)	Νερό ως συνδιαλύτης (%)	Rosehip/Διαλύτη (mg/g)	TFC (mg CATE/g rosehip)	Desirability
240	50	25	61,37	0,92

Σε αντίθεση με τις φαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή απαιτούν τη μέγιστη ποσότητα του νερού ως συνδιαλύτη κατά τη διεργασία της εκχύλισης καθώς και περισσότερο χρόνο.

### 3.5.5.3 Βελτιστοποίηση ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (IC<sub>50</sub>, DPPH/15 min; μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος)

Αντίστοιχα ακολουθεί η βελτιστοποίηση της διεργασίας ως προς την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Για κάθε χρονική στιγμή που λήφθηκε μέτρηση της απορρόφησης στο φασματόμετρο UV-vis, βρέθηκε το βέλτιστο σημείο της εκχύλισης όπως αναγράφεται στον Πίνακα 45. Στη συγκεκριμένη περίπτωση βέλτιστο θεωρείται το σημείο κατά το οποίο η ανασταλτική συγκέντρωση IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15 min) έχει ελάχιστη τιμή.

Πίνακας 45 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για τη βελτιστοποίηση της μεταβλητής απόκρισης IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min)

Χρόνος εκχύλισης (min)	Νερό ως συνδιαλύτης (%)	Rosehip/Διαλύτη (mg/g)	IC <sub>50</sub> , (DPPH /15 min) (μL εκχ/ mL δ/τος)	Desirability
59,25	2,96	123,03	0,32	1

Από τον Πίνακα 45 παρατηρείται ότι στην περίπτωση της μεγιστοποίησης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, η παρουσία του νερού ως συνδιαλύτη είναι πολύ μικρή. Σε αντίθεση με τις περιπτώσεις του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών αντίστοιχα, εντοπίζεται αυξημένη αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη στις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης.

Κλείνοντας, συμπεραίνεται ότι η επίδραση των τριών παραμέτρων διαφέρουν για κάθε μεταβλητή απόκρισης. Αναλυτικότερα, βέλτιστες τιμές TPC εντοπίζονται σε χαμηλή αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη και απουσία νερού ως συνδιαλύτη. Παράλληλα, βέλτιστο περιεχόμενο φλαβονοειδών προκύπτει σε εκχυλίσεις με υψηλό χρόνο και %νερού ως συνδιαλύτη. Τέλος, καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζεται σε μικρή αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη.

### 3.5.5.4 Ολική βελτιστοποίηση διεργασίας εκχύλισης

Μετά από τις ξέχωρες διαδικασίες βελτιστοποίησης των μεταβλητών απόκρισης, πραγματοποιήθηκε ολική βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων καθώς και της αντιοξειδωτικής δράσης. Αναφορικά με την βελτιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης, λήφθηκε υπόψη η ελαχιστοποίηση της ανασταλτικής συγκέντρωσης χρονικού διαστήματος 15 λεπτών μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου DPPH. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 46.

Πίνακας 46 Προτεινόμενες συνθήκες εκχύλισης για ολική βελτιστοποίηση του συστήματος

Χρόνος εκχύλισης (min)	Νερό ως συνδ/τη (%)	Rosehip/ Δ/τη (mg/g)	TPC (mg GAE/ g rosehip)	TFC (mg CATE/ g rosehip)	IC <sub>50</sub> , (DPPH 15 min) (μL εκχ/ mL δ/τος)	Desirability
189,24	50	96,09	161,11	56,74	0,80	0,74

Σημειώνεται ότι το πρόγραμμα Design Expert παρέδωσε πολλαπλές λύσεις οι οποίες προβαίνουν στην ολική βελτιστοποίηση του συστήματος. Ωστόσο, η επιλογή του παραπάνω σημείου έγινε με στόχο την μεγιστοποίηση της τιμής της επιθυμητότητας καθώς και την δυνατότητα κλιμάκωσης της διεργασίας. Αρχικά, ενδείκνυται η προσθήκη νερού σε ποσοστό 50% του συνολικού διαλύτη, γεγονός που παραπέμπει σε εξοικονόμηση NADES καθώς και μείωση του ιξώδους του εκχυλιστικού μέσου. Όσον αφορά το χρόνο της διεργασίας αλλά και την αναλογία μάζας πρώτης ύλης, η επιλογή του βέλτιστου σημείου έγινε με στόχο την εξοικονόμηση χρόνου και πρώτης ύλης, παραμένοντας παράλληλα στο επιτρεπτό πλαίσιο επιθυμητότητας.

### 3.5.6 Επιβεβαίωση μοντέλου

Για την επιβεβαίωση της ορθότητας του μοντέλου, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα ελέγχου με συνθήκες εκχύλισης: (α) 188,41 min, (β) 50% νερό ως συνδιαλύτης και (γ) 99,16 mg rosehip/ g διαλύτη. Στα εκχυλίσματα που προέκυψαν, προσδιορίστηκαν οι τιμές TPC, TFC καθώς και της ανασταλτικής συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15min). Στη συνέχεια, οι μετρήσεις αυτές εφαρμόστηκαν στο πρόγραμμα Design Expert έτσι ώστε να ελεγχθεί αν κυμαίνονται στα επιτρεπτά όρια που προβλέπονται από το λογισμικό. Στον Πίνακα 47 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 47 Επιβεβαίωση μοντέλου από το λογισμικό Design Expert

Μεταβλητή	Προβλεπόμενος ΜΟ	95% Κατώτερο Διάστημα πρόβλεψης	Πειραματικός ΜΟ	95% Ανώτερο Διάστημα πρόβλεψης
TPC (mg GAE/ g rosehip)	161,08	139,79	145,73	182,36
TFC (mg CATE/ g rosehip)	56,63	47,09	55,05	66,18
IC <sub>50</sub> (DPPH/ 15min) (μL εκχ/ mL δ/τος)	0,80	0,51	0,713	1,01

Μελετώντας τον Πίνακα 47 συμπεραίνεται ότι το μοντέλο που επιλέχθηκε είναι έγκυρο. Συγκεκριμένα, και στις τρεις περιπτώσεις μεταβλητών (TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15min)), οι προκύπτουσες τιμές βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων που παρέχει το λογισμικό.

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας σχεδιάστηκαν και παρασκευάστηκαν στοχευμένα Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες Φυσικής Προέλευσης (NADES) για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης του φυτού *Rosa Canina* L. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη χωρίζονται και παρουσιάζονται σε τρία τμήματα: πορίσματα σχετικά με (α) τους NADES, (β) την εκχύλιση του υπανθίου του *R. Canina* L. και (γ) τον πειραματικό σχεδιασμό που εφαρμόστηκε στη διεργασία αυτή.

### 4.1 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NADES)

Κατά την επιλογή του αρμόδιου διαλύτη για την εκχύλιση του υπανθίου του φυτού *Rosa Canina* L. παρατηρήθηκε ότι οι NADES είναι καταλληλότεροι συγκριτικά με συμβατικούς διαλύτες όπως το νερό και το σύστημα αιθανόλης/ νερού. Αναλυτικότερα, οι NADES περιέχουν φυσικά συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη σε πολλά τελικά προϊόντα οπότε δεν είναι αναγκαία η επιπλέον προσθήκη τους. Επιπρόσθετα, απουσιάζει η ανάγκη για καθαρισμό και απομάκρυνση τους στο τέλος της διεργασίας. Κατά τη σύνθεση αυτών των διαλυτών, η παρουσία νερού σε ελεγχόμενο ποσοστό συμβάλλει στην μείωση του ιξώδους και κόστους της διεργασίας ενώ παράλληλα ενισχύει την εκχυλιστική ικανότητα τους. Όσον αφορά τους NADES που προορίζονται για εκχύλιση, επιθυμητά χαρακτηριστικά είναι το χαμηλό ιξώδες, η υψηλή πολικότητα καθώς και η έλλειψη τοξικότητας. Συγκεκριμένα, η δομή των συστατικών των NADES και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους επηρεάζουν έντονα την πολικότητα τους και κατ'επέκταση την εκχυλιστική ικανότητα τους. Παράλληλα, εμφανίζουν προστατευτική δράση στο εκχύλισμα από την οξειδωση, λειτουργώντας ως μέσα αποθήκευσης. Μεταξύ των δύο σχηματιζόμενων NADES (BUW113, FGW115), ο διαλύτης FGW115 κρίθηκε προτιμότερος όσον αφορά το χαμηλό κόστος συστατικών, την εκχυλιστική του ικανότητα, πολικότητα και pH.

## 4.2 Εκχύλιση του υπανθίου του καρπού *Rosa Canina* L.

Κατά την διεργασία εκχύλισης του υπανθίου του *Rosa Canina* L., η εφαρμογή της εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση αποδείχτηκε αποδοτική και οικονομικότερη συγκριτικά με άλλες μεθόδους εκχύλισης. Συγκρίνοντας το περιεχόμενο σε βιοδραστικές ενώσεις και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τόσο κατά την εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες του καρπού *Rosa Canina* L. όσο και κατά την εκχύλιση με χρήση NADES, παρατηρήθηκε ότι το προκύπτον «πράσινο» εκχύλισμα, είναι πλουσιότερο σε βιοδραστικές ενώσεις, με ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, ο NADES FGW115 παρουσίασε τιμές TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15 min) ίσες με 87,75 mg GAE/ g rosehip, 28,54 mg CATE/ g rosehip και 3,72 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, αντίστοιχα. Αντιθέτως, το σύστημα αιθανόλη/ νερού (70/ 30) παρουσίασε τιμές TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15 min) ίσες με 78,72 mg GAE/ g rosehip, 26,11 mg CATE/ g rosehip και 4,21 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, αντίστοιχα. Τέλος, από τη χρήση νερού ως εκχυλιστικό μέσο προέκυψαν τιμές TPC, TFC, IC<sub>50</sub> (DPPH, 15 min) ίσες με 18,26 mg GAE/ g rosehip, 7 mg CATE/ g rosehip και 5,22 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, αντίστοιχα. Και οι τρεις αυτές εκχυλίσεις επικράτησαν σε συνθήκες 60 min, 0% νερού ως συνδιαλύτη και 25 mg rosehip/ g διαλύτη.

## 4.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

### 4.3.1 Χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων

Κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού σχεδιασμού, η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης αποδείχθηκε αποτελεσματική για τη μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων εκχύλισης στις μεταβλητές απόκρισης TPC, TFC και αντιοξειδωτική δράση. Η οριοθέτηση των επιπέδων του μοντέλου Box-Behnken έγινε με στόχο την ελαχιστοποίηση του χρόνου διεργασίας, την εξοικονόμηση πρώτης ύλης και διαλύτη, εξασφαλίζοντας παράλληλα την παραγωγή εκχυλισμάτων υψηλής βιοδραστικής και αντιοξειδωτικής αξίας.

Από την πρώτη ανάγνωση των πειραματικών αποτελεσμάτων προκύπτει ότι υψηλότερη τιμή TPC (202 mg GAE/ g rosehip) επιτεύχθηκε στο πείραμα με κωδικό DEB36 και συνθήκες εκχύλισης 135 min, 0% νερό ως συνδιαλύτη και 25 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Αντίστοιχα, υψηλότερη τιμή TFC (63,62 mg CATE/ g rosehip) εντοπίστηκε στο πείραμα με κωδικό DEB25 και συνθήκες εκχύλισης 240 min, 50% νερό ως συνδιαλύτη και 80 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Τέλος, ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (IC<sub>50</sub> (DPPH/ 15 min)= 0,45 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) επιτεύχθηκε στο πείραμα με κωδικό DEB33 και συνθήκες εκχύλισης 135 min, 0% νερό ως συνδιαλύτη και 135 mg πρώτης ύλης/ g διαλύτη. Αναφορικά με την αλληλεπίδραση παραμέτρων και μεταβλητών, παρατηρήθηκε έντονη επίδραση της μάζας πρώτης ύλης στις μεταβλητές TPC, αντιοξειδωτικής δράσης ενώ σημειώθηκε μεγάλη επιρροή του ποσοστού του νερού ως συνδιαλύτη στην περίπτωση του TFC. Αναλυτικότερα, υψηλή αναλογία μάζας πρώτης ύλης προς μάζα διαλύτη φάνηκε να ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση



ενώ παράλληλα να μειώνει τη τιμή της μεταβλητής TPC. Αντίστοιχα, υψηλό ποσοστό νερού ως συνδιαλύτη αποδείχτηκε ευεργετικό για την αύξηση της τιμής της μεταβλητής TFC. Σχετικά με την επίδραση του χρόνου στην αντιοξειδωτική δράση, συμπεραίνεται ότι ο αυξημένος χρόνος επώασης των διαλυμάτων στοκ μετά την προσθήκη αντιδραστήριου DPPH ευνοεί αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

### 4.3.2 Βελτιστοποίηση διεργασίας

Κατά τη βελτιστοποίηση του μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού, συμπεραίνεται ότι βέλτιστη τιμή της μεταβλητής TPC (199,013 mg GAE/ g rosehip) επιτυγχάνεται σε χαμηλή αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη και απουσία νερού ως συνδιαλύτη (Συνθήκες εκχύλισης: 164,308 min, 0% νερό στο διαλυτικό μέσο, 25 mg rosehip/ g διαλύτη). Αντίστοιχα, βέλτιστη τιμή της μεταβλητής TFC (61,37 mg CATE/ g rosehip) προκύπτει με υψηλό χρόνο εκχύλισης, έντονη συμμετοχή του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και χαμηλή αναλογία μάζας πρώτης ύλης/ μάζα διαλύτη (Συνθήκες εκχύλισης: 240 min, 50% νερό ως συνδιαλύτη, 25 mg rosehip/ g διαλύτη). Τέλος, μέγιστη αντιοξειδωτική δράση ( $IC_{50}$  (DPPH/ 15 min)= 0,32  $\mu$ L εκχυλίσματος / mL δείγματος) εντοπίζεται σε χαμηλή συμμετοχή του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και υψηλή αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη (Συνθήκες εκχύλισης: 59,25 min, 2,963% νερό ως συνδιαλύτη, 123,03 mg rosehip/ g διαλύτη). Η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση και των τριών μεταβλητών απόκρισης [TPC (161,11 mg GAE/ g rosehip), TFC (56,74 mg CATE/ g rosehip),  $IC_{50}$  (15 min) (0,80  $\mu$ L εκχυλίσματος/ mL δείγματος)] μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες διεργασίας εκχύλισης: **189,24 min, 50% νερό ως συνδιαλύτη, 96,99 mg rosehip/ g διαλύτη**. Κλείνοντας, επισημαίνεται η ορθότητα του μοντέλου που εφαρμόστηκε με βάση το σχέδιο Box-Behnken για τη συγκεκριμένη διεργασία, χάρη στα πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν.

Εν κατακλείδι, είναι φανερό πως το φυτό *Rosa Canina* L. έχει αξιοσημείωτη βιοδραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικό ως φυσική πρώτη ύλη κατά την παραγωγή νέων προϊόντων με αποδέκτη τον άνθρωπο. Η αξιολόγηση των βιοδραστικών του ενώσεων έχει ήδη πραγματοποιηθεί με συμβατές και μη εκχυλίσες από πολλούς ερευνητές. Ωστόσο, η ανάγκη για μια πιο «πράσινη» διεργασία οδήγησε στην εισαγωγή των NADES ως νέα, οικονομικότερα, ηπιότερα και οικολογικότερα εκχυλιστικά μέσα. Χαρακτηριστική είναι η αποδοτικότητα του διαλύτη FGW115 κατά την απόσπαση βιοδραστικών ενώσεων από το υπάνθιο του άγριου τριανταφύλλου, ο οποίος πλεονεκτεί όσον αφορά την έλλειψη τοξικότητας, πολικότητα, pH και εκχυλιστική ικανότητα. Χάρη στην εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού κατά τη μελέτη της συγκεκριμένης «πράσινης» εκχύλισης, συμπεράνθηκε ότι μεγαλύτερη επίδραση στο σύνολο φαινολικών ενώσεων καθώς και την αντιοξειδωτική ικανότητα, ασκεί η παράμετρος εκχύλισης της ποσότητας πρώτης ύλης αναλογικά με τον διαλύτη. Αντίστοιχα, το σύνολο φλαβονοειδών ενώσεων επηρεάζεται κυρίως από τη συμμετοχή του νερού ως συνδιαλύτη στο εκχυλιστικό μέσο.



## Κεφάλαιο 5: Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης αποτελούν θεμέλιο για την διερεύνηση της πράσινης εκχύλισης του καρπού *Rosa Canina* L.. Συγκεκριμένα, εξίσου ενδιαφέρουσα θα ήταν η μελέτη της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων με NADES από άλλα μέρη του φυτού πέρα από το υπάνθιο, καθώς και η διεξαγωγή εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης όπως εκείνη των μικροκυμάτων ή των υπερήχων.

Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι πολλά από τα συστατικά που περιέχονται στους NADES προέρχονται από φυτικές πηγές, υπάρχει ανησυχία σχετικά με τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων και τα βαρέα μέταλλα που μπορεί να τα επιβαρύνουν (28). Για αυτό τον λόγο, κρίνεται σημαντικός ο συνεχής έλεγχος για τον περιορισμό αυτών των ακαθαρσιών στα συστατικά προτού αναμειχθούν σε καλλυντική σύνθεση καθώς και να γίνεται σταδιακός έλεγχος της τοξικότητας.

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν ως έχουν σε καλλυντικά σκευάσματα και εφαρμογές.

## Βιβλιογραφία

- [1] B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. Gandolpho Tótolli *et al.* Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. SPJ. 2019;27(1):1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>
- [2] M. Dąbrowska, E. Maciejczyk, D. Kalemba. Rose Hip Seed Oil: Methods of Extraction and Chemical Composition. Eur. J. Lipid. Sci. Technol.. 2019;121(8).  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800440>
- [3] H. Ilyasoğlu. Characterization of Rosehip (*Rosa canina* L.) Seed and Seed Oil. Int. J. Food Prop.. 2014;17(7):1591-1598.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2013.777075>
- [4] K. Winther, A. S. Vinther Hansen, J. Campbell-Tofte. Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L.) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies. Botanics. 2016;6:11-23.  
<https://doi.org/10.2147/BTAT.S91385>
- [5] I. Roman, A. Stănilă, S. Stănilă. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. Chem. Cent. J.. 2013;7(1):1-10.  
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-73>
- [6] K. Szentmihályi, P. Vinkler, B. Lakatos *et al.* Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. Bioresour. Technol.. 2002; 82(2) :195-201.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00161-4)
- [7] K. Ninomiya, H. Matsuda, M. Kubo *et al.* Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: structural requirements and mode of action of trans-tiliroside. Bioorg, Med. Chem. Lett.. 2007;17(11):3059-3064.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.051>
- [8] A. Nagatomo, N. Nishida, I. Fukuhara *et al.* Daily intake of rosehip extract decreases abdominal visceral fat in preobese subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Diabetes Metab. Syndr. Obes.. 2015;8:147-156.  
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S78623>
- [9] B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. Gandolpho Tótolli *et al.* Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. SPJ. 2019;27(1):1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>
- [10] Ε. Σ. Βασιλογιάννη. Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση βιοδραστικών μορίων από το άγριο τριαντάφυλλο (*Rosa Canina* L.). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. DcSpace. 2020.  
<https://dx.doi.org/10.26240/heal.ntua.19060>
- [11] M. M. Vuolo, V. S. Lima, M. R. Maróstica Jr. Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Bioactive Compounds. M. R. S. Campos, Eds. NJ: Woodhead Publishing. 2019, pp.33-50.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- [12] S. Kumar, A. K. Pandey. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Sci. World J..2013;162750.  
<https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- [13] D. Skarpalezos, A. Detsi. Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. Appl. Sci.. 2019;9(19):4169.

<https://doi.org/10.3390/app9194169>

[14] E. Hvattum. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. RCM. 2002;16(7):655-662.

<https://doi.org/10.1002/rcm.622>

[15] N. B. Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio *et al.* The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. Antioxidants. 2020; 9(8):709.

<https://doi.org/10.3390/antiox9080709>

[16] A. P. R. Santana, Santana J. A. Santana, T. G. S. Guimarães *et al.* Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. J. Mol. Liq.. 2019;293;111452.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111452>

[17] S. Fetni, N. Bertella, A. Ouahab *et al.* Composition and biological activity of the Algerian plant *Rosa canina* L. by HPLC-UV-MS. Arab. J. Chem.. 2020;13(1):1105-1119.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.09.013>

[18] G. A. Agbor, J. A. Vinson, P. E. Donnelly. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. IJFS. 2014;3(8):147-156.

<http://dx.doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>

[19] R. M. Lamuela-Raventós. Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In: Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications. R. Apak, E. Capanoglu, F. Shahidi, Eds. NJ: John Wiley & Sons Ltd 2018.

<https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

[20] A. M. Shraima, T. A. Ahmed, M. M. Rahman *et al.* Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. LWT. 2021;150:111932.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>

[21] S. B. Mardsen. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature. 1958;181:1199–1200.

<https://doi.org/10.1038/1811199a0>

[22] M. G. Rasul. Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. IJBSAC. 2018;2:10-14.

[23] L. Wils, S. Hilali, L. Boudesocque-Delaye. Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France? Molecules. 2021;26(21):6556.

<https://doi.org/10.3390/molecules26216556>

[24] C. E. Sparr, E. Björklund. Analytical-scale microwave-assisted extraction. J. Chromatogr. A. 2000;902(1):227-250.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3)

[25] B. Caprin, V. Charton, B. Vogelgesang. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. In: Advances in Botanical Research. Verpoorte R., Witkamp G. J, Choi Y. H., Eds. NJ: Academic Press 2021;97:309-332.

<https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.009>

- [26] M. A. Karadendrou, I. Kostopoulo, V. Kakokefalou *et al.* L-Proline-Based Natural Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents and Catalysts for the Ultrasound-Assisted Synthesis of Aurones via Knoevenagel Condensation. *Catalysts* 2022;12(3):249.  
<https://doi.org/10.3390/catal12030249>
- [27] E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* 2014;114(21):11060–11082.  
<https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- [28] R. Kohli. Chapter 1 - Removal of Surface Contaminants Using Ionic Liquids. In: *Developments in Surface Contamination and Cleaning*. Kohli R., Mittal K.L., Eds. NJ: William Andrew Publishing 2013, pp.1-63.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-7879-3.00001-7>
- [29] M. Laguerre, A. Lavaud. The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. *Naturex*. 2016;45-47.
- [30] P. Kalhor, K. Ghandi. Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules*. 2019;24(22):4012.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24224012>
- [31] S. P. Ijardar, V. Singh, R. L. Gardas. Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents. *Molecules*. 2022; 27(4):1368.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27041368>
- [32] H. Vanda, Y. Dai, E. G. Wilson *et al.*. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *C. R. Chim.* 2018;21(6):628-638.  
<https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>
- [33] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod*. 2018;81(3):679-690.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- [34] A. Ghasemzadeh, H. Z. E. Jaafar, A. S. Juraimi *et al.* Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for the Assay of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Hashemi Rice Bran. *Molecules*. 2015;20(6):10822-10838.  
<https://doi.org/10.3390/molecules200610822>
- [35] W. Lu, S. Liu. Choline chloride-based deep eutectic solvents (Ch-DESs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: state-of-the-art, prospects, and challenges. *Biomass Convers. Biorefin.* 2022;12:2949–2962.  
<https://doi.org/10.1007/s13399-020-00753-7>
- [36] I. P. E. Macário, H. Oliveira, A. C. Menezes *et al.* Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci. Rep.* 2019;9:3932.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39910-y>
- [37] M. Lukić, I. Pantelić, S. D. Savić. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. *Cosmetics*. 2021;8(3):69.  
<https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>
- [38] W. J. Hill, W. G. Hunter. A Review of Response Surface Methodology: A Literature Survey. *Technometrics*. 1966;8(4):571-590.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00401706.1966.10490404>

- [39] N. Aslan, Y. Cebeci. Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*. 2007;86(1-2):90-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.06.010>
- [40] S. Polat, P. Sayan. Application of response surface methodology with a Box–Behnken design for struvite precipitation. *Adv. Powder Technol.*. 2019;30(10):2396-2407.  
<https://doi.org/10.1016/j.apt.2019.07.022>
- [41] P. Qiu, M. Cui, K. Kang *et al.* Application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimizing ultrasonic oxidation of arsenite with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Open Chem. J.*. 2014;12(2):164-172.  
<https://doi.org/10.2478/s11532-013-0360-y>
- [42] G. Angelov, S. S. Boyadzhieva, S. S. Georgieva. Rosehip extraction: Process optimization and antioxidant capacity of extracts. *Cent. Eur. J. Chem.* 2014;12(4):502-508.  
<https://doi.org/10.2478/s11532-013-0395-0>
- [43] J. F. Rivero-Cruz, J. Granados-Pineda, J. Pedraza-Chaverri *et al.* Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. *Antioxidants*. 2020;9(1):70.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9010070>
- [44] M. F. Nava-Ocampo, L. Al Fuhaid, A. Santana *et al.* Structural properties and stability of the Betaine-Urea natural deep eutectic solvent. *J. Mol. Liq.*. 2021;343:117655.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117655>
- [45] D. O. Abranches, L. P. Silva, Dr. M. A. R. Martins *et al.* Understanding the Formation of Deep Eutectic Solvents: Betaine as a Universal Hydrogen Bond Acceptor. *ChemSusChem*. 2020;13(18):4916-4921.  
<https://doi.org/10.1002/cssc.202001331>
- [46] J. Piquero-Casals, D. Morgado-Carrasco, C. Granger *et al.* Urea in Dermatology: A Review of its Emollient, Moisturizing, Keratolytic, Skin Barrier Enhancing and Antimicrobial Properties. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2021;11(6):1905-1915.  
<https://doi.org/10.1007/s13555-021-00611-y>
- [47] M. M. Fiume, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito *et al.* Safety Assessment of Monosaccharides, Disaccharides, and Related Ingredients as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 2019;38(1\_suppl):5S-38S.  
<https://doi.org/10.1177/1091581818814189>
- [48] L. C. Becker, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito *et al.* Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.*. 2019;38(3\_suppl):6S-22S.  
<https://doi.org/10.1177/1091581819883820>
- [49] S. Tischer, M. Börnhorst, J. Amsler *et al.* Thermodynamics and reaction mechanism of urea decomposition. *Phys. Chem. Chem. Phys.*. 2019;21:16785-16797.  
<https://doi.org/10.1039/C9CP01529A>
- [50] A. Tzani, S. Kalafateli, G. Tatsis *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustain. Chem.*. 2021;2(4):576-598.  
<https://doi.org/10.3390/suschem2040032>