

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας Χημικών Επιστημών
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



Εκχύλιση καρπών άγριου τριαντάφυλλου (*Rosa canina* L.)
και ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων σε καλλυντικά
σκευάσματα

Διπλωματική Εργασία

Δανάη Άννα Νάνου



Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Αναστασία Δέτση

Αθήνα
Φεβρουάριος 2023

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου και αποτελεί απόρροια βιβλιογραφικής και πειραματικής έρευνας, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση, τα ακαδημαϊκά έτη 2021-2022 και 2022-2023.

Θα ήθελα, πρώτα από όλα, να ευχαριστήσω θερμά την κα Αναστασία Δέτση για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τη συνεχή της καθοδήγηση, καθώς και τη στήριξή της σε όλα τα επίπεδα.

Επιπρόσθετα, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τη Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη, η οποία στάθηκε στο πλευρό μου σε όλα τα στάδια της διπλωματικής μου εργασίας, με αμέριστη διάθεση να μου μεταλαμπαδεύσει όσο το δυνατόν περισσότερες από τις γνώσεις της και την εργαστηριακή της εμπειρία και η οποία ήταν πάντα παρούσα για να συζητήσουμε και να βρούμε λύσεις σε ο,τιδήποτε με προβλημάτιζε. Η βοήθεια της διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας και παράλληλα, στη διεύρυνση των επιστημονικών μου οριζόντων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την πολύτιμη βοήθειά της, τη στήριξή της και το πάθος της για το εργαστήριο, που μου το μετέδιδε σε κάθε ευκαιρία.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την άψογη συνεργασία μας και τη διάθεσή τους να με βοηθήσουν σε οποιοδήποτε στάδιο χρειαζόμουν τη βοήθειά τους.

Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου όλα τα χρόνια φοίτησής μου στη σχολή, στηρίζοντάς με και ενθαρρύνοντας με να βελτιώνομαι διαρκώς. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, στην οικογένειά μου, τους γονείς μου και τον αδελφό μου, οι οποίοι αποτελούν το στήριγμά μου σε όλα τα στάδια της ζωής μου και τίποτα δε θα ήταν ίδιο χωρίς αυτούς. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στο Βασίλη, ο οποίος αποτελεί πηγή έμπνευσης για εμένα και έναν άνθρωπο που εξελίσσει διαρκώς τους ορίζοντές μου. Τέλος, την παρούσα διπλωματική εργασία αφιερώνω στη μητέρα μου, η οποία είναι στο πλευρό μου με όλους τους δυνατούς τρόπους, πάντα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από τους καρπούς άγριου τριαντάφυλλου (και πιο συγκεκριμένα, του υπάνθιου), με χρήση στοχευμένα σχεδιασμένων Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) και η ενσωμάτωση των NaDES-εκχυλισμάτων σε καλλυντικά σκευάσματα. Παρότι οι NaDES έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία ως εκχυλιστικά μέσα ποικίλων φυτικών πρώτων υλών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που διενεργήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας, δεν υπάρχουν αναφορές χρήσης NaDES για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από το άγριο τριαντάφυλλο.

Το άγριο τριαντάφυλλο αποτελεί αναρριχώμενο ή θαμνώδες ξυλώδες φυτό, με ύψος 1 έως 5 m, με μίσχους και γλυκά αρωματισμένα άνθη, διαφόρων χρωμάτων. Περιέχει σημαντικές ποσότητες βιοδραστικών ενώσεων και παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Η αξιοποίηση του περιεχομένου του σε βιοδραστικές ενώσεις αποσκοπεί στην παραλαβή εκχυλισμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας, με χρήση πράσινων διαλυτών και τεχνικών, και τη χρήση αυτών στις βιομηχανίες καλλυντικών, φαρμάκων και τροφίμων.

Με στόχο τη μελέτη των εκχυλισμάτων υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου, αρχικά, απαιτήθηκε ο στοχευμένος σχεδιασμός Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (NaDES) από φυσικές πρώτες ύλες και η διερεύνηση της ικανότητάς τους ως εναλλακτικά εκχυλιστικά μέσα. Οι Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες αποτελούν μίγματα δύο ή περισσότερων στερεών ή υγρών συστατικών φυσικής προέλευσης, υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των συστατικών τους. Επιπρόσθετα, αποτελούν διαλύτες βιοαποικοδομήσιμους, μη εύφλεκτους, χαμηλού κόστους και χαμηλής τοξικότητας και παρασκευάζονται με μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον. Βάσει όλων των παραπάνω λόγων, οι NaDES είναι «πράσινα» εκχυλιστικά μέσα, ικανά να αντικαταστήσουν με επιτυχία τους παραδοσιακούς συμβατικούς διαλύτες, προσφέροντας, παράλληλα, υψηλή σταθερότητα στα παραλαμβανόμενα εκχυλίσματα. Οι δύο Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες που επιλέχθηκαν, ως οι καταλληλότεροι, λόγω της ικανότητάς τους ως εκχυλιστικά μέσα είναι ο NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:2:2.5) και ο NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:5:21). Τα συστατικά των συγκεκριμένων διαλυτών είναι φυσικής προέλευσης, φιλικά προς το περιβάλλον, ασφαλή και χρησιμοποιούνται ήδη στη βιομηχανία σε προϊόντα με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο. Η καταλληλότητα των συγκεκριμένων διαλυτών προσδιορίστηκε μέσω της αξιολόγησης των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content, TPC), ως προς το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (Total Flavonoid Content, TFC), καθώς και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω του δείκτη IC₅₀ των ελευθέρων ριζών DPPH.

Έπειτα από την επιλογή των NaDES, διεξήχθησαν προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό των σημαντικότερων για την εκχύλιση παραμέτρων και τον προσδιορισμό των ορίων του συστήματος μελέτης. Ως παράμετροι απόκρισης τέθηκαν τα TPC, TFC και η αντιοξειδωτική δράση. Από τη μελέτη αυτή προέκυψαν ως

σημαντικότερες παράμετροι ο χρόνος εκχύλισης, το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, καθώς και η αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη. Οι διεργασίες εκχύλισης με τους δύο επιλεγόμενους NaDES βελτιστοποιήθηκαν με χρήση πειραματικού σχεδιασμού (Box-Behnken για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Παραγοντικό Σχεδιασμό Δύο Επιπέδων για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21).

Ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, με διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5, για ταυτόχρονη αύξηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, κρίθηκαν οι: 177 min χρόνος εκχύλισης, 50% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 101.4 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη. Με τη χρήση του διαλύτη NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21, βέλτιστες συνθήκες κρίθηκαν οι εξής: 240 min χρόνος εκχύλισης και 70 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη. Το βέλτιστο εκχύλισμα με διαλύτη Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:2:2.5) παρουσίασε TPC ίσο με 129.85 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC ίσο με 56.60 mg_{CAT}/g_{wild rose} και δείκτη IC₅₀ ίσο με 1.65 μL εκχυλίσματος/mL. Ακόμη, το βέλτιστο εκχύλισμα, με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21, παρουσίασε TPC ίσο με 131.23 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC ίσο με 43.24 mg_{CAT}/g_{wild rose} και δείκτη IC₅₀ ίσο με 1.71 μL εκχυλίσματος/mL.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιβεβαίωσης που υπέδειξαν την καλή προσαρμογή των μοντέλων των δύο πειραματικών σχεδιασμών, τόσο εντός, όσο και εκτός των ορίων των πειραματικών σχεδιασμών.

Σκόπιμη θεωρήθηκε, επίσης, η σύγκριση της εκχύλισης με χρήση NaDES με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης με χρήση συστήματος αιθανόλης/νερού (αναλογία 70:30) ή με χρήση αποκλειστικά νερού, ως διαλύτη. Από τη σύγκριση αυτή προέκυψε πως οι NaDES παρουσιάζουν πολύ πιο ικανοποιητικές δυνατότητες εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου.

Επιπρόσθετα, διεξήχθη σύγκριση για δύο μεθόδους εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, με χρήση των δύο NaDES, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της μεθόδου θέρμανσης και ανάδευσης με τη μέθοδο χρήσης υπερήχων, που αποτελεί τεχνική υψηλής ενέργειας. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν παρόμοια, με τη διαφορά πως στη μέθοδο υψηλής ενέργειας η χρονική διάρκεια των εκχυλίσεων ήταν σημαντικά μικρότερη, ενώ όλες οι άλλες παράμετροι διατηρήθηκαν ίδιες.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενσωμάτωση του NaDES-εκχυλίσματος που προέκυψε από τις βέλτιστες παραμέτρους του πειραματικού σχεδιασμού, ως έχει και χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, σε καλλυντική κρέμα, η οποία μελετήθηκε ως προς τη σταθερότητά και τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη αποδέσμευσης με αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του αποδεσμευόμενου, από την κρέμα, εκχυλίσματος.

Λέξεις-κλειδιά: Φυσιικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES), Άγριο τριαντάφυλλο, Πράσινη εκχύλιση, Πειραματικός σχεδιασμός, Καλλυντική κρέμα.

ABSTRACT

The purpose of this thesis is the development and optimization of the green process for the extraction of bioactive compounds from the grapes of wild rose (and more specifically, hypanthium), using purposefully designed Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) and the intergration of NaDES-extracts into cosmetic formulations. Although NaDES have been widely used in the literature as extractants of various plant raw materials, according to the literature review carried out in the context of this work, there are no reports of the use of NaDES for the extraction of bioactive compounds from wild rose.

The wild rose is a climbing or shrubby woody plant, 1 to 5 m tall, with stems and sweetly scented flowers of various colors. It contains significant amounts of bioactive compounds and exhibits significant antioxidant activity. The exploitation of its content in bioactive compounds aims to obtain extracts of high added value, using green solvents and techniques, and their use in the cosmetic, pharmaceutical and food industries.

Aiming to study wild rose hypanthium extracts, initially, the targeted design of Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) from natural raw materials and the investigation of their ability as alternative extractive media were required. Natural Deep Eutectic Solvents are mixtures of two or more solid or liquid components of natural origin, liquid at ambient temperature, due to the intermolecular hydrogen bonds that develop between their components. In addition, they are biodegradable, non-flammable, low-cost and low-toxicity solvents and they are prepared using environmentally friendly methods. Based on all the above reasons, NaDES are «green» extraction media, able to successfully replace traditional conventional solvents, offering, at the same time, high stability to the obtained extracts. The two Natural Deep Eutectic Solvents chosen as the most suitable due to their capacity as extractants are NaDES Betaine-D,L Lactic Acid-Water (1:2:2.5) and NaDES Glycine-D,L Lactic Acid-Water (1:5:21). The components of the specific solvents are of natural origin, environmentally friendly, safe and they are already used in industry in products with a final recipient in humans. The suitability of the specific solvents was determined through the evaluation of the extracts in terms of the Total Phenolic Content (TPC), the Total Flavonoid Content (TFC), as well as in terms of their antioxidant activity, via the IC₅₀ index of DPPH free radicals.

After the selection of NaDES, preliminary experiments were conducted to determine the most important parameters for the extraction and the limits of the study system. TPC, TFC and antioxidant activity were set as response parameters. From this study, the most important parameters emerged were the extraction time, the percentage of water in the extraction medium, as well as the raw material/ solvent ratio. The extraction processes with the two selected NaDES were optimized using experimental design (Box-Behnken for NaDES Betaine-D,L Lactic Acid-Water 1:2:2.5 and Two-Level Factorial Design for NaDES Glycine-D,L Lactic Acid-Water 1:5:21).

The optimal extraction conditions, with NaDES Betaine-D,L Lactic Acid-Water 1:2:2.5 solvent, for a simultaneous increase in the Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content, were judged to be: 177 min extraction time, 50% water in the extraction

medium and 101.4 mg wild rose/ 3 g solvent. Using the NaDES Glycine-D,L Lactic Acid-Water 1:5:21 solvent, the following optimal conditions were determined: 240 min extraction time and 70 mg wild rose/ 3 g solvent. The optimal solvent Betaine-D,L Lactic Acid-Water (1:2:2.5) extract presented TPC equal to 129.85 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC equal to 56.60 mg_{CAT}/g_{wild rose} and IC₅₀ index equal to 1.65 μL extract/mL. Also, the optimal extract, with NaDES Glycine-D,L Lactic Acid-Water 1:5:21 solvent, presented TPC equal to 131.23 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC equal to 43.24 mg_{CAT}/g_{wild rose} and IC₅₀ index equal to 1.71 μL extract/mL.

Subsequently, confirmation experiments were carried out that indicated the good fit of the models of the two experimental designs, both within and outside the limits of the experimental designs.

It was also considered worthwhile to compare the extraction using NaDES with conventional extraction methods using an ethanol/water system (ratio 70:30) or using only water as solvent. From this comparison, it emerged that NaDES present much more satisfactory possibilities of extracting the bioactive compounds of the wild rose.

In addition, a comparison was made for two extraction methods. More specifically, using the two NaDES, a comparison was made between the heating and stirring method and the method using ultrasound, which is a high energy technique. The results of the two methods were similar, with the difference that in the high energy method the time duration of the extractions was significantly shorter, while all the other parameters were kept the same.

Finally, the NaDES-extract resulting from the optimal parameters of the experimental design was incorporated, as it is and without further processing, into a cosmetic cream, which was studied for its stability and quality characteristics. In addition, a release study was carried out evaluating the antioxidant activity of the extract released from the cream.

Key-words: Natural deep eutectic solvents (NaDES), Wild rose, Green extraction, Experimental design, Cosmetic cream.

Περιεχόμενα

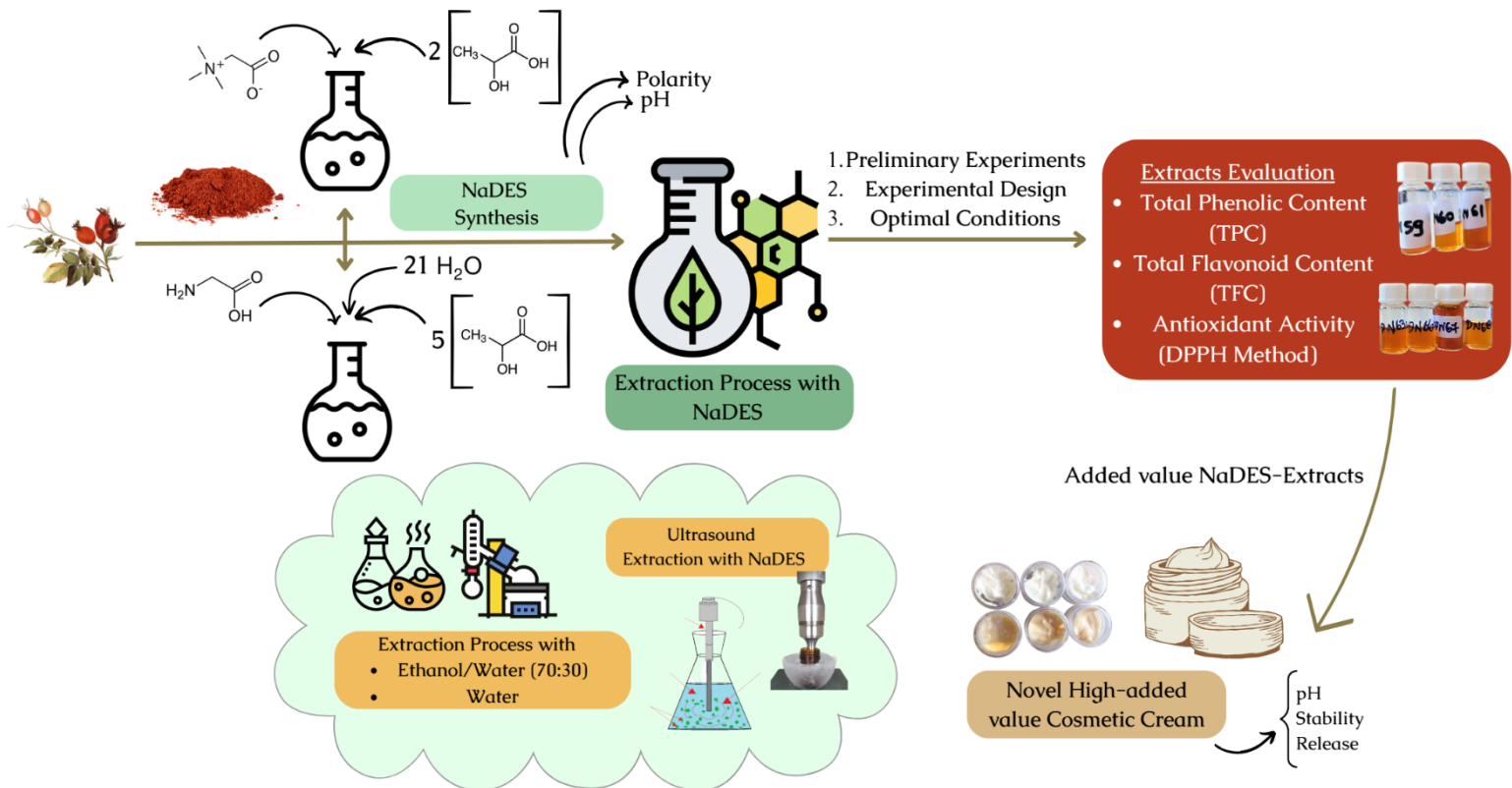
1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
1.1	ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ.....	19
1.2	ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟ-WILD ROSE.....	21
1.2.1	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΦΥΤΟΥ.....	21
1.2.2	ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ.....	22
1.2.3	ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ.....	23
1.2.4	ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	25
1.2.5	ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ.....	29
1.2.6	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ.....	31
1.2.7	ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ.....	34
1.3	ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ.....	39
1.3.1	ΦΥΣΙΚΟΙ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (NaDES).....	40
1.3.1.1	Ορισμός.....	40
1.3.1.2	Αρχές Πράσινης Χημείας και Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες.....	41
1.3.1.3	Ιστορική Αναδρομή των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	41
1.3.1.4	Τύποι Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	42
1.3.1.5	Φυσικοχημικές Ιδιότητες των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	43
1.3.1.6	Μέθοδοι παρασκευής Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	45
1.3.1.7	Σύγκριση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών και Ιοντικών Υγρών.....	46
1.3.1.8	Πλεονεκτήματα των Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	48
1.3.1.9	Ανάλυση Δυνατών σημείων, Αδυναμιών, Ευκαιριών και Απειλών (SWOT) για τους Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	48
1.3.1.10	Προοπτικές των Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	49
1.3.1.11	Εφαρμογές Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών.....	51
1.4	ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	57
1.4.1	ΚΡΕΜΕΣ.....	57
1.4.2	ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	58
1.4.3	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΚΡΕΜΩΝ.....	59
1.5	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	60
1.5.1	ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	60
1.5.2	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ.....	62
1.5.3	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ.....	64
1.5.4	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	65
1.5.5	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	66
1.5.5.1	Επίδραση της θερμοκρασίας στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες	

1.5.5.2	Επίδραση της μοριακής δομής και της σύστασης του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση	66
1.5.5.3	Επίδραση του ιξώδους του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση	67
1.5.5.4	Επίδραση της περιεκτικότητας σε νερό του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση	68
1.5.5.5	Επίδραση της αναλογίας πρώτης ύλης/ διαλύτη στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη	69
1.5.5.6	Επίδραση του χρόνου στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη	70
1.5.5.7	Επίδραση του pH του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση	70
1.5.5.8	Επίδραση της πολικότητας του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση ..	71
1.5.5.9	Λειτουργία του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη ως πρόσθετου/ ή πρόσθετα στους Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες	71
1.5.6	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ DES ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ	72
1.6	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – DESIGN OF EXPERIMENT.....	75
1.6.1	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ	76
1.6.1.1	Σχεδιασμός Box-Behnken.....	77
1.6.2	ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (FRACTIONAL FACTORIAL DESIGN).....	78
1.6.2.1	Σχεδιασμός Regular Two-Level Factorial	79
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	81
2.1	ΣΚΟΠΟΣ.....	81
2.2	ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	82
2.3	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ NaDES.....	83
2.4	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ NaDES	86
2.4.1	ΜΕΤΡΗΣΗ pH NaDES	86
2.4.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ NaDES	86
2.5	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΜΕ NaDES	86
2.6	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΪΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:2:2.5.....	88
2.7	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:5:21.....	90
2.8	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ NaDES ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	91
2.9	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	93
2.10	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	95
2.10.1	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC) ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	95
2.10.2	ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC) ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	97
2.10.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH.....	98

2.11	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ	101
2.12	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ.....	102
2.12.1	ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	102
2.12.2	ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΚΡΕΜΑΣ.....	104
2.12.3	ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ.....	104
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	105
3.1	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	105
3.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	107
3.2.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH ΤΩΝ NaDES.....	107
3.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ NaDES	109
3.3	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	110
3.3.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΙΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ 1:2:2.5	110
3.3.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ	113
3.3.3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΪΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:2:2.5	117
3.3.3.1	Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις (TPC) του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	117
3.3.3.2	Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	124
3.3.3.3	Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.....	130
3.3.3.4	Βελτιστοποίηση της διεργασίας με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	136
3.3.3.5	Μελέτη της επέκτασης του μοντέλου σε συνθήκες εκτός του εύρους του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	142
3.3.3.6	Επιβεβαίωση μοντέλων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	143
3.3.4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:5:21	144
3.3.4.1	Περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21	145
3.3.4.2	Περιεκτικότητα σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	149
3.3.4.3	Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	153
3.3.4.4	Βελτιστοποίηση της διεργασίας με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	158
3.3.4.5	Μελέτη της επέκτασης του μοντέλου σε συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	160

3.3.4.6	Επιβεβαίωση των μοντέλων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	161
3.3.4.7	Σύγκριση των NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 στην εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου.....	163
3.3.5	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	164
3.3.6	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	166
3.3.7	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	168
3.4	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ & ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ.....	171
3.4.1	ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ	171
3.4.2	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ pH.....	173
3.4.3	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΡΕΜΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ.....	174
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	178
5	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ.....	183
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	184

Graphical Abstract



ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Το «Πράσινο Δένδρο» της Πράσινης Χημείας[2].	20
Εικόνα 2: Άνθος άγριου τριαντάφυλλου[12].	21
Εικόνα 3: Καρποί άγριου τριαντάφυλλου[3].	21
Εικόνα 4: Καρποί και σπόροι καρπών άγριου τριαντάφυλλου[12].	22
Εικόνα 5: Διαδικασία παρασκευής διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	85
Εικόνα 6: Τελικό αποτέλεσμα διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	85
Εικόνα 7: Συσκευή υπερήχων με probe.	92
Εικόνα 8: Δείγμα προς εκχύλιση εντός της συσκευής υπερήχων.	93
Εικόνα 9: Περιστροφικός εξατμιστήρας.	94
Εικόνα 10: Ξηρά εκχυλίσματα έπειτα από την εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης.	94
Εικόνα 11: Επαναδιαλυτοποιημένα εκχυλίσματα έπειτα από προσθήκη νερού ή συστήματος αιθανόλης/νερού.	95
Εικόνα 12: Πειραματική διάταξη για την εφαρμογή της μεθόδου μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης.	103
Εικόνα 13: Δείγμα κρέμας εντός της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης.	103
Εικόνα 14: Δομή βεταΐνης στο χώρο[109].	106
Εικόνα 15: Δομή γλυκίνης στο χώρο[110].	106
Εικόνα 16: Δομή D,L-γαλακτικού οξέος στο χώρο[113].	107
Εικόνα 17: Δείγματα εκχυλισμάτων σε micro-plate, κατά σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν ή τριπλούν μετά από χρόνο επώασης 60 min.	166
Εικόνα 18: Αξιολόγηση της υφής των κρεμών. Αριστερή κρέμα: κρέμα με εκχύλισμα, Δεξιά κρέμα: κρέμα απουσία εκχυλίσματος.	172
Εικόνα 19: Ενδεδειγμένο εύρος τιμών pH για προϊόντα περιποίησης του δέρματος[116].	174
Εικόνα 20: Δείγματα για χρόνο επώασης 15 min.	176
Εικόνα 21: Δείγματα για χρόνο επώασης 30 min.	176
Εικόνα 22: Δείγματα για χρόνο επώασης 45 min.	176
Εικόνα 23: Δείγματα για χρόνο επώασης 60 min.	177

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Φλαβονοειδής σκελετός και γενικές δομές των βασικών κατηγοριών φλαβονοειδών[37].	28
Σχήμα 2: Χημικοί τύποι των υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].	29
Σχήμα 3: Χημικοί σκελετοί των βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου άγριου τριαντάφυλλου[3].	31
Σχήμα 4: Χημικοί τύποι των υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].	33
Σχήμα 5: Χημικοί τύποι των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].	34
Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα φάσεων θερμοκρασιών τήξης διαφόρων μιγμάτων[47].	40
Σχήμα 7: Σύγκριση ιδιοτήτων ιοντικών υγρών και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών[53].	47
Σχήμα 8: Ανάλυση SWOT για τους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες[54].	49
Σχήμα 9: Φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή NaDES με στόχο τη χρήση σε καλλυντικές εφαρμογές[60].	56
Σχήμα 10: Εφαρμογές βαθέως ευτηκτικών διαλυτών[58].	56
Σχήμα 11: Σχεδιασμός Box-Behnken τριών παραγόντων (1)[88].	77
Σχήμα 12: Σχεδιασμός Box-Behnken τριών παραγόντων (2)[88].	78
Σχήμα 13: Μεταβολή της ρίζας του DPPH, καθώς και του χρώματος αυτής[108].	99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ενώσεις με βιοδραστικές ιδιότητες, οι οποίες περιέχονται στο άγριο τριαντάφυλλο[26].	26
Πίνακας 2: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.	82
Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.	82
Πίνακας 4: Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν.	83
Πίνακας 5: Προκαταρκτικά πειράματα για εκχύλιση με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	87
Πίνακας 6: Προκαταρκτικά πειράματα για εκχύλιση με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2.	88
Πίνακας 7: Συνθήκες και κωδικοποίηση των πειραμάτων εκχύλισης του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	89
Πίνακας 8: Συνθήκες και κωδικοποίηση των πειραμάτων εκχύλισης του παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού δύο επιπέδων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	91
Πίνακας 9: Συνθήκες εκχυλίσεων με χρήση NaDES και υπερήχων.	92
Πίνακας 10: Συνθήκες εκχυλίσεων με χρήση συμβατικών διαλυτών.	94
Πίνακας 11: Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα.	105
Πίνακας 12: Μετρήσεις pH για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ 1:2:2.5 σε διάφορες περιεκτικότητες.	107
Πίνακας 13: Μετρήσεις pH για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 σε διάφορες περιεκτικότητες.	108
Πίνακας 14: Μελέτη της πολικότητας των NaDES με χρήση του δείκτη Nile red.	109
Πίνακας 15: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και δείκτη IC ₅₀ στα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	110
Πίνακας 16: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2.	114
Πίνακας 17: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	117
Πίνακας 18: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Quadratic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).	120
Πίνακας 19: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).	120
Πίνακας 20: Αποτελέσματα μέτρησης φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	124
Πίνακας 21: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο Reduced Qubic Model που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	126
Πίνακας 22: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	126
Πίνακας 23: Αποτελέσματα μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	131
Πίνακας 24: Αποτελέσματα ANOVA για τον αντίστροφο μετασχηματισμό του μοντέλου Reduced Qubic Model που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένη σε δείκτη IC ₅₀	133
Πίνακας 25: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του δείκτη IC ₅₀ και κατά συνέπεια, της αντιοξειδωτικής δράσης.	134

Πίνακας 26: Βέλτιστες συνθήκες και παράμετροι εκχύλισης για την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.	136
Πίνακας 27: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού, όπως αυτά προβλέπονται από το λογισμικό.	142
Πίνακας 28: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων ελέγχου.	143
Πίνακας 29: Μέσος όρος των πειραματικών τιμών των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC ₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για τα πειράματα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες.	144
Πίνακας 30: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC ₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού.	144
Πίνακας 31: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	145
Πίνακας 32: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση του ελεολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).	147
Πίνακας 33: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).	147
Πίνακας 34: Αποτελέσματα μέτρησης φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	150
Πίνακας 35: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	151
Πίνακας 36: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	152
Πίνακας 37: Αποτελέσματα μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	154
Πίνακας 38: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένη σε δείκτη IC ₅₀	155
Πίνακας 39: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω του δείκτη IC ₅₀	156
Πίνακας 40: Βέλτιστες συνθήκες και παράμετροι εκχύλισης για την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.	158
Πίνακας 41: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με βάση την πρόβλεψη του λογισμικού.	161
Πίνακας 42: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος ελέγχου.	162
Πίνακας 43: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC ₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	162
Πίνακας 44: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC ₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	162
Πίνακας 45: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC ₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις συνθήκες εκτός των επιλεγμένων ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	162
Πίνακας 46: Αποτελέσματα πειραμάτων επιβεβαίωσης των δύο πειραματικών σχεδιασμών με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	163
Πίνακας 47: Επίδραση της συγκέντρωσης του υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος στην % αναστολή των ριζών του DPPH.	165
Πίνακας 48: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση και εκχύλισης με χρήση υπερήχων για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.	167

Πίνακας 49: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση και εκχύλισης με χρήση υπερήχων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.....	167
Πίνακας 50: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και συμβατικής εκχύλισης με νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού.....	169
Πίνακας 51: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 και συμβατικής εκχύλισης με νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού.....	169
Πίνακας 52: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποιοτικών χαρακτηριστικών των κρεμών και των ελέγχων σταθερότητας.....	172
Πίνακας 53: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για τα δείγματα διαφόρων χρόνων αποδέσμευσης, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	174
Πίνακας 54: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για το βέλτιστο εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στην παρασκευή της κρέμας, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	175
Πίνακας 55: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για πρότυπο ασκορβικό οξύ, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.....	175
Πίνακας 56: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και συμβατικών διαλυτών για συνθήκες εκχύλισης: 177 min, 101.4 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη.....	180
Πίνακας 57: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 και συμβατικών διαλυτών για συνθήκες εκχύλισης: 240 min, 70 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη.....	181
Πίνακας 58: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 με δύο τεχνικές εκχύλισης για συνθήκες εκχύλισης: 50% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 101.4 mg/ 3 g διαλύτη.....	181
Πίνακας 59: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 με δύο τεχνικές εκχύλισης για συνθήκη εκχύλισης: 101.4 mg/ 3 g διαλύτη.....	182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.....	96
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.....	97
Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας σε NaDES, για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.....	108
Διάγραμμα 4: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας σε NaDES, για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.....	109
Διάγραμμα 5: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.....	119
Διάγραμμα 6: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).....	121
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.....	122
Διάγραμμα 8: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής A.....	123
Διάγραμμα 9: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.....	125
Διάγραμμα 10: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).....	127
Διάγραμμα 11: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής C.....	128
Διάγραμμα 12: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.....	129
Διάγραμμα 13: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής A.....	129
Διάγραμμα 14: Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του δείκτη IC ₅₀ , και κατά συνέπεια της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.....	132
Διάγραμμα 15: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του δείκτη IC ₅₀ και της αντιοξειδωτικής δράσης.....	134
Διάγραμμα 16: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC ₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής C.....	135
Διάγραμμα 17: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC ₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.....	136
Διάγραμμα 18: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.....	137
Διάγραμμα 19: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B.....	137
Διάγραμμα 20: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής A.....	138
Διάγραμμα 21: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.....	138
Διάγραμμα 22: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B.....	139
Διάγραμμα 23: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής A.....	139
Διάγραμμα 24: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC ₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.....	141

Διάγραμμα 25: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC_{50} συναρτήσει των μεταβλητών A και C , για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B .	141
Διάγραμμα 26: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	146
Διάγραμμα 27: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).	148
Διάγραμμα 28: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και B .	149
Διάγραμμα 29: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	150
Διάγραμμα 30: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).	152
Διάγραμμα 31: Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του δείκτη IC_{50} , και κατά συνέπεια της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.	154
Διάγραμμα 32: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του δείκτη IC_{50} και της αντιοξειδωτικής δράσης.	156
Διάγραμμα 33: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC_{50} συναρτήσει των μεταβλητών A και B .	157
Διάγραμμα 34: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B .	158
Διάγραμμα 35: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B .	159
Διάγραμμα 36: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC_{50} , και κατ' επέκταση της αντιοξειδωτικής δράσης, συναρτήσει των μεταβλητών A και B .	160

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ & ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

DES	Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης	Deep Eutectic Solvent
NaDES	Φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης	Natural Deep Eutectic Solvent
GAL	Γαλλικό Οξύ	Gallic Acid
CAT	Κατεχίνη	Catechin
TPC	Ολικό Περιεχόμενο Φαινολικών Ενώσεων	Total Phenolic Content
TFC	Ολικό Περιεχόμενο Φλαβονοειδών Ενώσεων	Total Flavonoid Content
DPPH	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
SWOT Analysis	Ανάλυση Δυνατών Σημείων, Αδυναμιών, Ευκαιριών και Απειλών	Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats Analysis
IC ₅₀		Half maximal inhibitory concentration
EFA	Απαραίτητο Λιπαρό Οξύ	Essential Fatty Acid
FA	Λιπαρό Οξύ	Fatty Acid
PUFA	Πολυακόρεστο Λιπαρό Οξύ	Polyunsaturated Fatty Acid
BBD	Σχεδιασμός Box-Behnken	Box-Behnken Design

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ

Η Πράσινη Χημεία συνίσταται στην εφαρμογή ενός συνόλου αρχών που περιορίζουν ή εξαλείφουν τη χρήση ή την παραγωγή επικίνδυνων-τοξικών ουσιών, τόσο κατά το σχεδιασμό, όσο και κατά την παρασκευή και χρήση των χημικών προϊόντων.

Οι στόχοι της Πράσινης Χημείας μπορούν να επιτευχθούν μέσω μικρών σταδιακών βελτιώσεων. Υπάρχει πληθώρα κριτηρίων, η επίτευξη των οποίων οδηγεί στην αποτελεσματικότητα μιας μεθοδολογίας. Η αποδοτικότητα είναι σημαντική, αλλά δεν αποτελεί μοναδικό κριτήριο της ποιότητας μιας μεθόδου. Παράλληλα, σημαντικά κριτήρια είναι και τα οικονομικά, αλλά και τα τεχνικά. Η Πράσινη Χημεία αναγνωρίζει όλα τα παραπάνω κριτήρια και προτείνει βελτιώσεις σε επιμέρους στάδια και διαδικασίες, χωρίς να υποβαθμίζεται κανένα από τα κριτήρια [1].

Η Πράσινη Χημεία αποτελεί νέο πεδίο της χημείας, το οποίο παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον. Ο λόγος, ο οποίος αιτιολογεί το όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον κλάδο αυτό, είναι πως κατά τις τελευταίες δεκαετίες υπήρξε πληθώρα προβλημάτων, η οποία βασιζόταν στην ακριβή φύση των περιβαλλοντικών κινδύνων που προκλήθηκαν από την απελευθέρωση διαφόρων συνθετικών χημικών στο περιβάλλον. Λόγω αυτού, έχει γίνει κοινώς αποδεκτό από τον επιστημονικό κλάδο πως η απελευθέρωση χημικών ουσιών οδηγεί σε σταδιακή αύξηση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Με την προϋπόθεση ότι ο κίνδυνος είναι δυνατό να περιοριστεί, ή και να εξαλειφθεί πλήρως, με εναλλακτικές, αλλά τεχνικά και οικονομικά εφαρμόσιμες και εφικτές, καινοτομίες στις χημικές μεθοδολογίες, οι επιστήμονες οφείλουν να επιδιώξουν κάτι τέτοιο [1].

Κατά τον εναλλακτικό σχεδιασμό, δεν αποτελεί μοναδικό ενδιαφέρον το τελικό μόριο, αλλά και η συνθετική οδός αυτού. Πραγματοποιώντας τροποποιήσεις στη σύνθεση μπορεί να επιτευχθεί το ίδιο προϊόν και παράλληλα, να περιοριστούν ή και να εξαφανιστούν πλήρως οι τοξικές πρώτες ύλες, τα τοξικά παραπροϊόντα και τα τοξικά απόβλητα. Ακόμη, ένα σημαντικό πεδίο που αφορά την Πράσινη Χημεία επικεντρώνεται στην επιλογή του μέσου στο οποίο λαμβάνει χώρα ο συνθετικός μετασχηματισμός. Ο βασικότερος προβληματισμός έγκειται στην επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δεν κρίνεται αναγκαία η χρήση αυτού. Τα τελευταία χρόνια, διεξάγονται προσπάθειες για την εκτέλεση χημικών μετασχηματισμών, απουσία διαλυτών. Στην περίπτωση, όμως, που κρίνεται απαραίτητη η παρουσία διαλύτη, αποτελεί αναγκαίο να επιλεγεί ο καταλληλότερος από ένα πλήθος εναλλακτικών διαλυτών. Παρότι οι παραδοσιακοί διαλύτες είναι ιδιαίτερα οικείοι και ευρέως διαδεδομένοι, οι εναλλακτικοί διαλύτες όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, τα ιοντικά υγρά, τα υπερκρίσιμα ρευστά και άλλοι βρίσκουν θέση ολοένα και περισσότερο σε διάφορες μεθόδους [1].

Ο κλάδος της Πράσινης Χημείας επικεντρώνεται στη χρήση εναλλακτικών πρώτων υλών, εναλλακτικών αντιδραστηρίων, εναλλακτικών διαλυτών, εναλλακτικών

1.2 ΑΓΡΙΟ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟ-WILD ROSE

1.2.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΦΥΤΟΥ

Το γένος *Rosa* περιέχει περισσότερα από 100 είδη που είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλη την Ευρώπη, την Ασία και τη Βόρεια Αμερική. Τα άγρια τριαντάφυλλα καλλιεργούνται από την αρχαιότητα και μερικά από αυτά βρίσκονται ακόμα να φυτρώνουν στη φύση. Αποτελούν αναρριχώμενα ή θαμνώδη ξυλώδη φυτά, με ύψος 1 έως 5 m, με μίσχους και γλυκά αρωματισμένα άνθη, διαφόρων χρωμάτων. Οι μίσχοι του άγριου τριαντάφυλλου είναι καλυμμένοι με μικρά, αιχμηρά, αγκιστρωμένα αγκάθια, τα οποία βοηθούν την αναρρίχηση. Τα φύλλα είναι πτεροειδή, με 5-7 φυλλαράκια. Τα άνθη είναι συνήθως ανοιχτό ροζ, αλλά μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ βαθύ ροζ και λευκού. Έχουν διάμετρο 4 έως 6 cm με πέντε πέταλα και ωριμάζουν σε ένα οβάλ κόκκινο-πορτοκαλί καρπό, μεγέθους 1.5 με 2 cm. Οι σαρκώδεις κόκκινοι καρποί, είναι γνωστοί ως rosehip και είναι το πιο μελετημένο τμήμα του φυτού[3]–[11].



Εικόνα 2: Άνθος άγριου τριαντάφυλλου[12].



Εικόνα 3: Καρποί άγριου τριαντάφυλλου[3].



Εικόνα 4: Καρποί και σπόροι καρπών άγριου τριαντάφυλλου[12].

Τα φύλλα, τα άνθη και οι καρποί της άγριας τριανταφυλλιάς χρησιμοποιούνται, εδώ και χιλιάδες χρόνια, για τα φαρμακευτικά τους οφέλη. Τα φύλλα έχουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα άνθη, από την άλλη, έχουν αντιβακτηριδιακή, στυπτική, τονωτική και αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιούνται για ήπια φλεγμονή του δέρματος ή του βλεννογόνου του στόματος και του λαιμού. Επιπρόσθετα, τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και μπορούν να γονιμοποιηθούν από μέλισσες, μύγες, σκαθάκια, και ταυτόχρονα, το φυτό αυτογονιμοποιείται, λόγω του γεγονότος ότι τα άνθη μπορούν να αυτογονιμοποιηθούν. Οι καρποί μπορούν να καταναλωθούν φρέσκοι, αλλά παράλληλα, καταναλώνονται και ως τσάι, μαρμελάδα, ζελέ, σιρόπι ή κρασί. Ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα παθήσεων λόγω των βιολογικών του δράσεων, όπως ανοσοκατασταλτικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαρθρικές, αναλγητικές, αντιδιαβητικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, γαστροπροστυτικές και βελτιωτικές επιδράσεις του δέρματος. Οι παραπάνω δράσεις παρουσιάζονται σε επόμενες ενότητες αναλυτικότερα[3], [7], [9], [11], [13]–[15].

1.2.2 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ

Σε ορισμένους πολιτισμούς, το άγριο τριαντάφυλλο απολαμβάνεται ως φαγητό, ενώ σε κάποιους άλλους ως φάρμακο. Η κατανάλωση άγριου τριαντάφυλλου είναι δημοφιλής σε ευρωπαϊκές χώρες όπως η Πολωνία, η Πορτογαλία, η Γερμανία, η Φινλανδία, η Ρουμανία και η Σουηδία, αν και είναι ιδιαίτερα δημοφιλής κυρίως στις Σκανδιναβικές χώρες. Οι καρποί ή ισχία μεταποιούνται σε επιδόρπιο, μπισκότα, κέικ, ψωμί, ζελέ, μαρμελάδα, παγωτό, σούπα, σιρόπι, τσάι, ποτά κ.ο.κ. Για παράδειγμα, η Nyronsoppa είναι μια σούπα με άγριο τριαντάφυλλο, δημοφιλής στη σουηδική κουζίνα. Το Hagebuttem είναι παραδοσιακή γερμανική σούπα και το Dzika Roza Zachowaniáis είναι πολωνική κονσέρβα με άγριο τριαντάφυλλο. Από την άλλη, στη Ρουμανία, οι ποικιλίες *Rosa* είναι άφθονες και οι καρποί χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες μορφές, ως υποστηρικτικές θεραπείες για τη συμπλήρωση της πρόσληψης βιταμίνης Α και C. Ακόμη, ένα άλλο παράδειγμα χρήσης του άγριου τριαντάφυλλου είναι το Palinka, ένα παραδοσιακό ουγγρικό μπράντι, παρασκευασμένο από φρούτα, συμπεριλαμβανομένου και του άγριου τριαντάφυλλου. Στην Τουρκία, το άγριο τριαντάφυλλο αποτελεί φυτικό

φάρμακο και παράλληλα, χρησιμοποιείται ως σνακ, μαρμελάδα ή χυμός. Στη συγκεκριμένη χώρα το άγριο τριαντάφυλλο χαίρει μεγάλης εκτίμησης για τις αρωματικές και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Επιπλέον, στην παραδοσιακή αυστριακή ιατρική οι καρποί του *Rosa canina L.*, εναλλακτική ονομασία του άγριου τριαντάφυλλου, έχουν χρησιμοποιηθεί ως τσάι για τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων και διαταραχών των νεφρών και του ουροποιητικού συστήματος. Τα ισχία χρησιμοποιούνται ως άρωμα στο Cockta, ένα αναψυκτικό που παρασκευάζεται στη Σλοβενία. Αξίζει να σημειωθεί πως βασική χρήση του άγριου τριαντάφυλλου είναι η κατανάλωσή του ως τσάι, το οποίο βρίσκει μεγάλη ζήτηση στη Βρετανία, αλλά χρησιμοποιείται πολύ και στη λαϊκή ιατρική στο Ιράν και σε άλλες χώρες, για το κοινό κρυολόγημα, τη γαστρική διαταραχή, τις πέτρες στη χολή και τη δυσκοιλιότητα. Τέλος, τα ισχία του είδους *Rosa canina L.* καταναλώνονται ή εφαρμόζονται τοπικά για ανακούφιση από το κρυολόγημα, τη γρίπη, τις λοιμώξεις, τις φλεγμονές και τον πόνο[3], [4], [6], [12].

Παρότι έχουν αναφερθεί όλες οι παραπάνω χρήσεις του άγριου τριαντάφυλλου, τόσο στη διατροφή, όσο και στη φαρμακευτική, η παγκόσμια κατανάλωση άγριου τριαντάφυλλου είναι ακόμα περιορισμένη. Μόλις τα τελευταία χρόνια, λόγω της μεγάλης στροφής στα υγιεινά τρόφιμα, το άγριο τριαντάφυλλο έχει συγκεντρώσει μεγάλη προσοχή. Από τότε που υιοθετήθηκαν τεχνικές ανάλυσης υψηλού επιπέδου και φυτοχημικής ανάλυσης, οι καρποί έχουν επικυρωθεί πως περιέχουν βρώσιμα συστατικά. Παράλληλα, αναδεικνύονται στοιχεία για το ότι το άγριο τριαντάφυλλο αποτελεί πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών και είναι ιδανικό υποψήφιο για διατροφική ενσωμάτωση, για άμεση κατανάλωση ή ως πρόσθετο τροφίμων. Ακόμη, διατροφικές αναλύσεις προτείνουν τη χρήση του ως λειτουργική τροφή και φυσική χρωστική στη τεχνολογία τροφίμων[4].

1.2.3 ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

Αναφορικά με τους καρπούς του άγριου τριαντάφυλλου, αυτοί αποτελούνται από 30-35% σπόρους και 65-70% υπάνθιο. Αναλυτικές μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία αρκετών θρεπτικών συστατικών στο άγριο τριαντάφυλλο. Το άγριο τριαντάφυλλο περιέχει την υψηλότερη ποσότητα ασκορβικού οξέος, ή εναλλακτικά βιταμίνης C, μεταξύ όλων των φρούτων και λαχανικών. Παράλληλα, εκτός της παρουσίας βιταμίνης C, το άγριο τριαντάφυλλο περιέχει υψηλή ποσότητα βιταμινών A, B1, B2, B6, Δ, E και K. Πέραν του ασκορβικού οξέος, χαρακτηριστικά οργανικά οξέα του καρπού είναι το μηλικό και το κιτρικό οξύ. Επιπρόσθετα, ο καρπός είναι πλούσιος σε καροτενοειδή, με κυριότερα το λυκοπένιο, τη β-κρυπτοξανθίνη, το β-καροτένιο, τη ρουβιξανθίνη και τη ζεαξανθίνη. Τα ενεργά συστατικά του τριαντάφυλλου είναι επίσης η πηκτίνη και τα σάκχαρα: γλυκόζη και φρουκτόζη. Το αιθέριο έλαιο του καρπού περιέχει αλκοόλες, αλδεΐδες, μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και εστέρες. Τα πιο άφθονα συστατικά είναι η βιτισπιράνη, το δεκαεξανοϊκό οξύ, το α-E-ακαριδιακό οξύ, η δοκοζάνη, η β-ιονόνη, η 2-επτανόνη, η επτανάλη και το μυριστικό οξύ. Οι σπόροι τριανταφυλλιάς έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με κυρίαρχα το λινολεϊκό οξύ (45-55%), το α-λινολενικό οξύ (18-32%) και το

ελαϊκό οξύ (13-20%). Τέλος, ο καρπός του άγριου τριαντάφυλλου περιέχει διάφορα μεταλλικά θρεπτικά συστατικά, όπως φώσφορο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο και ψευδάργυρο. Η σύσταση των μετάλλων παρουσιάζει ισχυρή εξάρτηση από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και εδαφικούς και γεωγραφικούς παράγοντες[4], [7]–[10], [12], [16]–[22].

Πιο αναλυτικά, οι καρποί του άγριου τριαντάφυλλου είναι συνήθως κόκκινοι ή πορτοκαλί, με φρουτώδη και καυτερή γεύση, παρόμοια με αυτή των κράνμπερις. Μπορούν να αξιοποιηθούν σε φρέσκια ή αποξηραμένη μορφή, ως πλούσια πηγή μετάλλων, βιταμινών, καροτενοειδών και αρωματικών συστατικών, βρίσκοντας εφαρμογή στη μαγειρική και τη διατροφή[3], [9], [20], [23]–[26].

Το έλαιο των καρπών του άγριου τριαντάφυλλου, το οποίο είναι, ως επί το πλείστον, προϊόν ψυχρής έκθλιψης από τους σπόρους των ειδών άγριας τριανταφυλλιάς, λόγω της δυνατότητας επούλωσης του δέρματος, είναι ένα πολύτιμο υλικό για την ανάπτυξη φυτικών καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης του δέρματος, όπως λοσιόν και κρέμες. Το έλαιο είναι μία από τις πλουσιότερες πηγές EFAs, δηλαδή λινελαϊκού και λινολενικού οξέος, με περιεκτικότητα που φτάνει το 70 με 80%. Παράλληλα, λόγω της περιεκτικότητας σε EFA, καροτενοειδή και βιταμίνη A (ρετινόλη), το έλαιο σπόρων άγριου τριαντάφυλλου δρα ως φυσικό φάρμακο περιποίησης του δέρματος, καθώς και ως ενυδατικός και αντιγηραντικός παράγοντας. Τέλος, είναι, επίσης, χρήσιμο για την επούλωση ουλών και τη μείωση της φωτογήρανσης και προσδίδει απαλότητα στο δέρμα[3], [4], [18], [27].

Η σκόνη του άγριου τριαντάφυλλου είναι πλούσια σε βιταμίνη C και προανθοκυανίνες και διατίθεται σε πολλά καταστήματα υγιεινής διατροφής, ως συμπλήρωμα διατροφής. Επιπρόσθετα, όμως, έχουν αξιολογηθεί αποτελέσματα για τη χρήση σκόνης άγριου τριαντάφυλλου στη γήρανση των κυττάρων και τη ρυτίδωση του δέρματος. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν πως η πρόσληψη της σκόνης αυτής βελτιώνει τις δερματικές παθήσεις, που προκαλούνται λόγω γήρανσης. Οι εμφανείς σταθεροποιητικές επιδράσεις του προϊόντος τριανταφυλλιάς στις κυτταρικές μεμβράνες των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της μακροζωίας των κυττάρων και στην παρεμπόδιση της γήρανσης του δέρματος [3], [6], [11].

Η ποσότητα των αποτελεσματικών ενώσεων ποικίλλει στα διαφορετικά μέρη του άγριου τριαντάφυλλου. Σε διάφορες μελέτες εξετάζονται τα διαφορετικά μέρη του φυτού (σπόροι, περίβλημα, φύλλα, κλωνάρι) προκειμένου να προσδιοριστούν οι βιοενεργές ενώσεις στο καθένα από αυτά. Αποτελέσματα των μελετών έδειξαν πως το φυτό περιέχει σημαντική ποσότητα βιταμίνης C, κυρίως στο περίβλημα, ενώ οι σπόροι περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου. Παράλληλα, η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα (FAs) στα τριαντάφυλλα με σπόρους είναι πολύ υψηλότερη από ότι σε αυτά απουσία σπόρων. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε FA στο άγριο τριαντάφυλλο με σπόρους ήταν τέσσερις φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη σε αυτό χωρίς σπόρους. Η περιεκτικότητα σε PUFA λινολεϊκό οξύ είναι περισσότερο από επτά φορές υψηλότερη στο προϊόν τριαντάφυλλου που περιέχει σπόρους, σε σύγκριση με το προϊόν που παράγεται μόνο από τα περιβλήματα. Τα παραπάνω αποδεικνύουν πως τα FA βρίσκονται κυρίως στους σπόρους του άγριου τριαντάφυλλου. Αντίθετα, η

περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και β-καροτένιο παρουσιάζεται η ίδια στο άγριο τριαντάφυλλο με και χωρίς τους σπόρους, ενώ οι ποσότητες τριτερπενοειδών, γαλακτολιπιδίων, λυκοπενίου και βιταμίνης E είναι υψηλότερες στο προϊόν που αποτελείται μόνο από το περίβλημα του άγριου τριαντάφυλλου, υποδεικνύοντας την κυριαρχία των συστατικών αυτών στο συγκεκριμένο τμήμα του καρπού. Ακόμη, υπάρχουν флаβονοειδή στον ίδιο βαθμό στους σπόρους και στα περιβλήματα του άγριου τριαντάφυλλου, ωστόσο η κατανομή αυτών είναι διαφορετική. Τέλος, όσον αφορά τα τριγλυκερίδια, στους σπόρους βρίσκονται το λινολεϊκό και το α-λινολενικό οξύ και αυτά δεν αποτελούν ελεύθερα FA[12], [26].

Ακόμη, τα φύλλα και οι μίσχοι του άγριου τριαντάφυλλου, που συνήθως απορρίπτονται, φαίνεται ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύτιμη πηγή флаβονοειδών, ιδιαίτερα γλυκοσιδών флаβόνων. Έπειτα από αναλύσεις, έχουν εντοπιστεί και ποσοτικοποιηθεί 40 φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα των φύλλων και των κλαδιών του άγριου τριαντάφυλλου. Μονομερείς και πολυμερείς κατεχίνες και εστέρες του γαλλικού οξέος, όπως η επιγαλλοκατεχίνη, είναι ουσίες που βρίσκονται, τόσο στα φύλλα, όσο και στα κλαδιά του φυτού. Επιπρόσθετα, υψηλή είναι η περιεκτικότητα σε ελλαγικό οξύ και από την ομάδα των флаβονοειδών, σημαντικές είναι οι ποσότητες κυανιδίνης και νεοχλωρογενικού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί πως, η κυρίαρχη βιταμίνη των φύλλων και των κλαδιών του φυτού είναι η βιταμίνη B6 και επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν 13 αμινοξέα σε αυτά τα μέρη του φυτού, με τα 9 να είναι απαραίτητα (βαλίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη, ιστιδίνη, λυσίνη και αργινίνη)[11], [14].

1.2.4 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί διάφορες έρευνες για τον προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχονται στο άγριο τριαντάφυλλο, *Rosa canina* L., κάνοντας χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, φασματομετρίας μάζας σε σειρά και αέριας χρωματογραφίας. Από αυτές τις έρευνες έχουν εντοπιστεί πολυάριθμες ενώσεις σε καρπούς *Rosa canina*. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητο να γίνουν μελλοντικές έρευνες για περαιτέρω ταυτοποίηση πρόσθετων ενώσεων, οι οποίες μπορεί στην πραγματικότητα να είναι υπεύθυνες για ορισμένες βιοδραστικές ιδιότητες του φυτού που παρουσιάζονται στις αντίστοιχες ιατρικές έρευνες. Επιπλέον, απουσιάζουν ποσοτικές έρευνες των συστατικών, και τέτοιες μελέτες μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες σε φαρμακευτικές θεραπείες, καθώς και για την ανάπτυξη σωστού ελέγχου της αναπαραγωγής και των μετασυλλεκτικών τεχνικών για το άγριο τριαντάφυλλο *Rosa canina*. Ορισμένες ενώσεις με βιοδραστικές ιδιότητες που περιέχονται στο άγριο τριαντάφυλλο φαίνονται στον Πίνακα 1[26].

Πίνακας 1: Ενώσεις με βιοδραστικές ιδιότητες, οι οποίες περιέχονται στο άγριο τριαντάφυλλο[26].

Compound type	Compound name	Systematic nomenclature and lipid number*
Triterpene acid	Ursolic acid ¹⁸	
	Oleanolic acid ¹⁸	
	Betulinic acid ¹⁸	
FAs	Lauric acid ^{19,20}	Dodecanoic acid (C 12:0)
	Myristic acid ^{20,21}	Tetradecanoic acid (C 14:0)
	Palmitic acid ¹⁹⁻²¹	Hexadecanoic acid (C 16:0)
	Palmitoleic acid ^{20,21}	(C 16:1 ω-7)
	Stearic acid ^{20,21}	Octadecanoic acid (C 18:0)
	Oleic acid ^{20,21}	(C 18:1 ω-9)
	Linoleic acid ¹⁹⁻²¹	All-cis-9,12-octadecadienoic acid (cis-C 18:2 ω-6)
	α-Linolenic acid ^{19,20}	All-cis-9,12,15-octadecatrienoic acid (cis-C 18:3 ω-3)
	Arachidic acid ^{19,20}	Eicosanoic acid (C 20:0)
	Behenic acid ²⁰	Docosanoic acid (C 22:0)
Galactolipids	Docosadienoic acid ¹⁹	All-cis-13,16-docosadienoic acid (cis-C 22:2 ω-6)
	GOPO ⁵	(2S)-1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9-12-15trienoyl]-3-O-β-D-galactopyranosyl glycerol

Οι φυτικές πολυφαινόλες αποτελούν μία ευρεία ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών και αποτελούν κοινό συστατικό της διατροφής. Είναι ευρέως διαδεδομένες και μπορεί να κυμαίνονται από απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, έως πολύπλοκα μόρια με πολυάριθμες φαινολικές ομάδες, όπως για παράδειγμα ακυλιωμένα φλαβονοειδή, γλυκοσίδες, προανθοκυανίνες ή ολιγομερείς υδρολυόμενες τανίνες. Οι πολυφαινόλες εμφανίζονται συνήθως σε συζευγμένη μορφή, συνδεδεμένες με τμήματα σακχάρων, αλλά και με άλλες ενώσεις, όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και ακόμη, και με άλλες πολυφαινόλες[9], [28]–[32].

Το ενδιαφέρον των φυτικών πολυφαινολών προέρχεται από την απόδειξη της ισχυρής αντιοξειδωτικής τους δράσης και του ευρέος φάσματος φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιαλλεργικών και αντιβακτηριδιακών δράσεων. Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών, τα οποία σχετίζονται με τα φλαβονοειδή και άλλα αντιοξειδωτικά, και του μειωμένου κινδύνου ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ορισμένοι τύποι καρκίνου[30], [32].

Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο σημαντικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών και βιοδραστικών ενώσεων στα φυτά. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι χημικές ουσίες που παράγονται από φυτά και οι λειτουργίες τους στην ανάπτυξη, τη φωτοσύνθεση, την αναπαραγωγή και άλλες πρωτογενείς διεργασίες δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές[32], [33]. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα ορισμένες κατηγορίες βιοδραστικών ενώσεων.

❖ Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που είναι ευρέως εξαπλωμένοι σε όλο το φυτικό βασίλειο. Αποτελούν ενώσεις οι οποίες προσδίδουν μοναδική γεύση και ιδιότητες που προάγουν την υγεία. Οι φαινολικές ενώσεις είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών και παράγονται ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το φως, η ψύξη και η ρύπανση, για την υπεράσπιση των τραυματισμένων φυτών. Αυτές οι ενώσεις σχηματίζουν μία ομάδα που περιλαμβάνει τα ευρέως διαδεδομένα οξέα, υδροξυβενζοϊκό και υδροξυκινναμικό. Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις ποικίλουν σε επίπεδο μοριακής δομής και χαρακτηρίζονται από υδροξυλιωμένους αρωματικούς δακτύλιους. Οι φαινολικές ενώσεις σε πολλά φυτά πολυμερίζονται σε μεγαλύτερα μόρια, όπως οι προανθοκυανίνες και οι λιγνίνες. Τέλος, φαινολικά οξέα μπορούν να προκύψουν σε φυτά-τρόφιμα ως γλυκοσίδες ή εστέρες με άλλες φυσικές ενώσεις, όπως στερόλες, αλκόολες και υδροξυλιπαρά οξέα[33], [34].

❖ Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία κατηγορία φαινολικών ενώσεων που απαντώνται ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο. Η χρήση των φλαβονοειδών οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελούν έγχρωμες ενώσεις, αν και παράλληλα είναι στοιχεία της διατροφής του ανθρώπου, μέσω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών. Τα φλαβονοειδή αποτελούν δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες, που ανήκουν στη φαινυλοπροπανοειδή ομάδα ενώσεων. Ο βασικός τους σκελετός αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων. Τα φλαβονοειδή μπορούν να έχουν διάφορους υποκαταστάτες, με πιο κοινούς τα σάκχαρα, καθώς τα περισσότερα φλαβονοειδή συναντώνται φυσικά ως γλυκοσίδες. Άλλοι κοινοί υποκαταστάτες είναι οι μεθυλιώσεις. Ο βασικός διαχωρισμός τους σε επιμέρους ομάδες βασίζεται στο αν η γέφυρα είναι ανοικτή, ή αποτελεί τμήμα ενός τρίτου ετεροκυκλικού δακτυλίου. Συνεπώς, μπορεί να γίνει μία αρχική διάκριση σε φλαβονοειδή ανοικτής και κλειστής γέφυρας. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή μπορούν να χωριστούν σε έξι επιμέρους υποκατηγορίες:

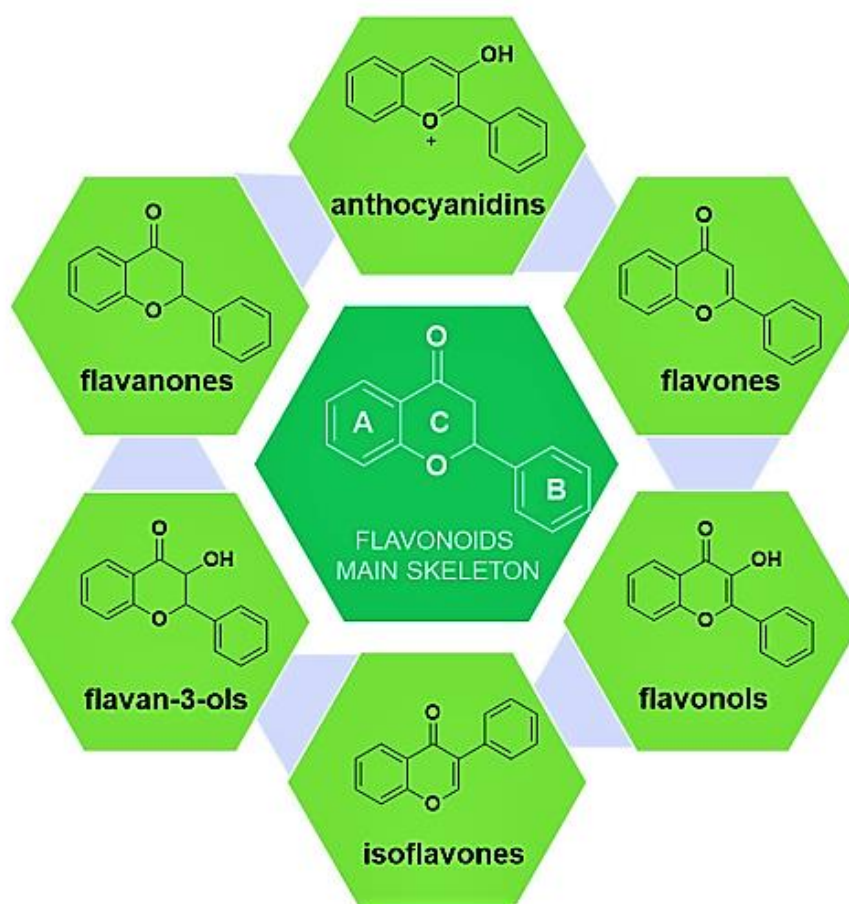
- Τις ανθοκυανιδίνες
- Τις φλαβόνες
- Τις φλαβανόλες
- Τις ισοφλαβόνες
- Τις φλαβαν-3-όλες
- Τις φλαβανόνες.

Η πιο διαδεδομένη ομάδα έγχρωμων φλαβονοειδών είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι β-γλυκοσίδες που περιέχουν σάκχαρα στη θέση 3. Οι ανθοκυανίνες ενεργούν ως ελκυστικοί παράγοντες, παρασύροντας τους επικονιαστές στα λουλούδια και τα φρούτα με οπτικά σήματα. Παράλληλα, λειτουργούν ως αποτρεπτικά μικροβίων και εντόμων. Αξίζει να σημειωθεί πως μία ακόμα κύρια λειτουργία των φλαβονοειδών είναι η προστασία των κυττάρων από την υπεριώδη ακτινοβολία, μέσω της συσσώρευσής τους στα επιδερμικά στρώματα, της αξιοποίησης της καταστροφικής ακτινοβολίας UV και παράλληλα, της ικανότητας να επιτρέπουν στα ορατά μήκη κύματος να περάσουν. Οι φλαβόνες και οι φλαβανόλες απορροφούν φως σε μικρότερα

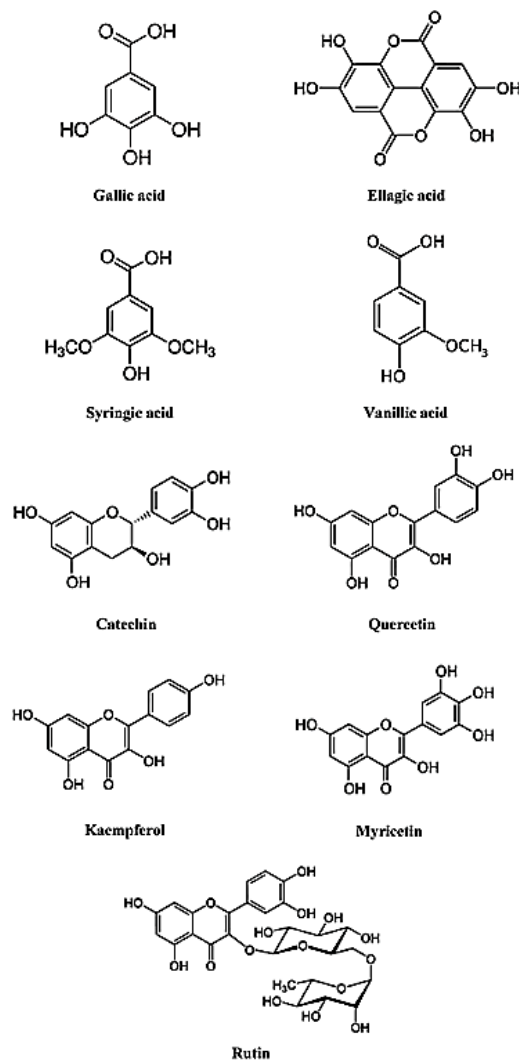
μήκη κύματος από τις ανθοκυανίνες και τα καροτενοειδή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι φλαβανόλες και οι φλαβόνες να μην είναι ορατές στο ανθρώπινο μάτι, παρά μόνο στα έντομα. Ακόμη, οι ισοφλαβόνες έχει αποδειχθεί πως έχουν διάφορες βιολογικές δράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν επίσης αντιμικροβιακές και εντομοκτόνες ιδιότητες[26], [33], [35], [36].

❖ Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν παράγωγες ενώσεις των προανθοκυανιδινών και των λευκοανθοκυανιδινών. Στη φύση έχουν εντοπιστεί περίπου 300 μέλη των ανθοκυανιδινών, συμπεριλαμβανομένων και των γλυκοζιτών τους, οι οποίοι ονομάζονται ανθοκυανίνες. Χάρη σε αυτές τις ενώσεις προσδίδεται το κόκκινο, ιώδες και κυανό χρώμα σε άνθη, φύλλα, φρούτα, καρπούς, ακόμα και ρίζες, και είναι ενώσεις που εντοπίζονται και στο άγριο τριαντάφυλλο[32], [33], [35].



Σχήμα 1: Φλαβονοειδής σκελετός και γενικές δομές των βασικών κατηγοριών φλαβονοειδών[37].



Σχήμα 2: Χημικοί τύποι των υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].

1.2.5 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

Η έλξη προς τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά αυξάνεται συνεχώς λόγω της αυξανόμενης ζήτησης, καθώς και του ενδιαφέροντος των καταναλωτών για αυτά τα φυτά για τις φαρμακευτικές, μαγειρικές και άλλες ανθρωπογενείς εφαρμογές. Καθώς οι καταναλωτές ενημερώνονται όλο και περισσότερο για θέματα υγείας, τροφίμων και διατροφής, συνειδητοποιούν επίσης τις δυνατότητες και τα οφέλη των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών και των μεταβολιτών τους. Υπάρχουν πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά, μεταξύ των οποίων τα αιθέρια έλαια.

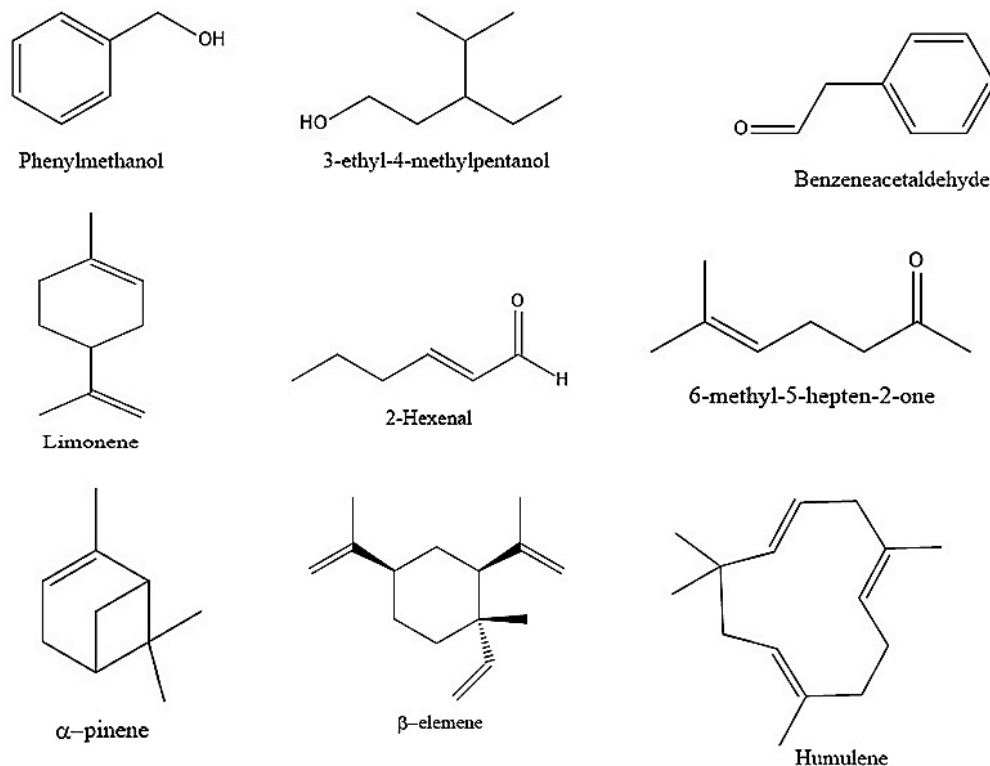
Ως αιθέρια έλαια ορίζονται τα προϊόντα που λαμβάνονται από φυτική πρώτη ύλη, είτε με απόσταξη με ατμό, είτε με μηχανικές διεργασίες από το υπάνθιο, είτε με ξηρή απόσταξη. Τα αιθέρια έλαια θεωρούνται αποτελεσματικά συμπληρώματα συνθετικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στη χημική βιομηχανία και τα μεμονωμένα συστατικά τους βρίσκουν πολύτιμες εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως η γεωργία, το

περιβάλλον και η ανθρώπινη υγεία. Παράλληλα, τα αιθέρια έλαια είναι αδιάλυτα σε ανόργανους διαλύτες, όπως το νερό, ενώ είναι διαλυτά σε οργανικούς, όπως αιθέρες και αλκοόλες. Ακόμη, αποτελούν πτητικά υγρά, με χαρακτηριστική οσμή, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην αρωματοποιία, την αρωματοθεραπεία και τη βιομηχανία καλλυντικών. Αξίζει να σημειωθεί πως χρησιμεύουν, επίσης, ως χημικά σήματα που επιτρέπουν στο φυτό να ελέγχει και να ρυθμίζει το περιβάλλον του: προσελκύουν τα έντομα για επικονίαση, αναστέλλουν τη βλάστηση των σπόρων κ.ο.κ. Υπάρχουν σε διάφορα μέρη των αρωματικών φυτών, όπως στα άνθη, στα φύλλα, στις ρίζες, στους σπόρους, στα φρούτα και στο φλοιό, όπως στο άγριο τριαντάφυλλο.

Αναφορικά με τη χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων, υπάρχουν περισσότερα από 200 συστατικά που υφίστανται στο μίγμα αγνών αιθέριων ελαίων. Γενικά, αυτά τα μίγματα περιέχουν φαινυλοπροπανικά παράγωγα ή τερπένια και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- ✓ Το πτητικό κλάσμα, το οποίο αποτελεί το 90 με 95% του συνολικού βάρους του ελαίου και περιέχει μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους. Παράλληλα, στο πτητικό κλάσμα μπορεί να υπάρχουν αλειφατικές αλκοόλες, εστέρες και αλδεΐδες.
- ✓ Το μη πτητικό υπόλειμμα, το οποίο αποτελεί το 1 με 10% του συνολικού βάρους του αιθέριου ελαίου και περιέχει λιπαρά οξέα, υδρογονάνθρακες, στερόλες, φλαβονοειδή και καροτενοειδή[38], [39].

Μερικές μελέτες έχουν αναφερθεί στην απόδοση και τη χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου του άγριου τριαντάφυλλου. Έπειτα από ανάλυση με τη χρήση μεθόδου αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (GC-MS), το αιθέριο έλαιο του άγριου τριαντάφυλλου περιέχει 97 συστατικά και κυρίως, βιτισπιράνη, α-ακαριδιακό οξύ, δωδεκανοϊκό οξύ, δεκαεξανοϊκό οξύ, δοκοζάνη, β-ιονόνη, 6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη, μυριστικό οξύ και λινολεϊκό οξύ. Σε άλλη μελέτη, η ανάλυση GC-MS αποκάλυψε ότι οι πτητικές ενώσεις του είδους *Rosa canina* είναι ένα πολύπλοκο μίγμα αλκοολών, αλδεϊδών, κετόνων, μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων. Μεταξύ των αλκοολών, η 2-εξεν-1-όλη και 1-εξανόλη προσδιορίζονται ως οι κύριες ενώσεις, ενώ η 2-εξενάλη είναι η κύρια αλδεΐδη. Μόνο δύο κετόνες εντοπίζονται στη συγκεκριμένη μελέτη του αιθέριου ελαίου: η 4-οκτεν-3-όνη και 6-μεθυλ-5-επτεν-2-όνη. Μεταξύ των μονοτερπενίων, το λεμονένιο κυριαρχεί, ακολουθούμενο από το α-πινένιο. Τέλος, μεταξύ των σεσκιτερπενίων, κυρίαρχα είναι το β-ελεμένιο και το α-χουμουλένιο[3], [7], [12], [40].



Σχήμα 3: Χημικοί σκελετοί των βασικών συστατικών του αιθέριου ελαίου άγριου τριαντάφυλλου[3].

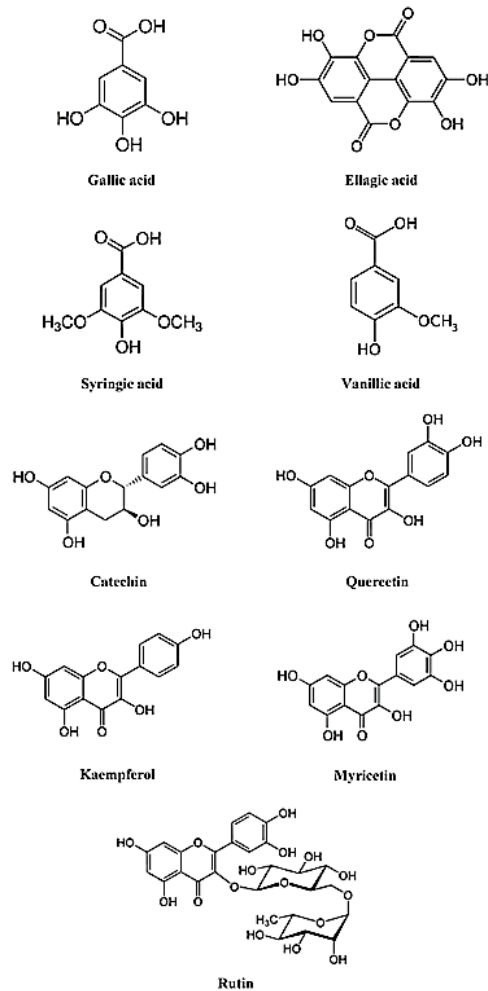
1.2.6 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

Η διαδικασία οξείδωσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πολλών ελεύθερων ριζών, γνωστών ως δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS. Αυτές οι μορφές μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στη μεμβράνη, τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και βλάβη στο DNA. Η αερόβια ζωή έχει εξελίξει αντιοξειδωτικά συστήματα για την καταστολή των ανεπιθύμητων επιπτώσεων των ελεύθερων ριζών. Μερικά από αυτά τα αντιοξειδωτικά παράγονται στο σώμα, ενώ άλλα λαμβάνονται μέσω διατροφής. Τα αντιοξειδωτικά, τα οποία λαμβάνονται μέσω διατροφής, προέρχονται είτε από φυσικές, είτε από συνθετικές πηγές. Τα κοινά συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν υψηλό κόστος παραγωγής και η χρήση τους σε τρόφιμα περιορίζεται από νομοθετικούς κανόνες. Επομένως, το ενδιαφέρον των ερευνητών τείνει να είναι προς την εύρεση νέων και ασφαλών αντιοξειδωτικών από φυσικές πηγές, τα οποία αφθονούν σε διάφορους τύπους φυτικών υλικών. Οι βιταμίνες A, E και C και οι φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των τανινών, των φλαβονοειδών και των λιγνινών, στα φυτά έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επιπλέον, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο δράοντας ως σαρωτές των ελεύθερων ριζών και αναστολείς της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και στην πρόληψη ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες είναι η υποκείμενη αιτία μιας σειράς σωματικών διαταραχών καρκίνου, αλλεργίας, διαβήτη, κατάθλιψης και άλλων[4], [17], [23], [28], [41]–[44].

Το άγριο τριαντάφυλλο, ή εναλλακτικά *Rosa canina L.*, είναι πλούσιο σε βιταμίνες, κυρίως βιταμίνη C και φαινολικές ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα (§1.2.3). Οι ευεργετικές ιδιότητες του συγκεκριμένου είδους μπορεί, σε κάποιο βαθμό, να σχετίζονται με τις φαινολικές ενώσεις και την υψηλή ποσότητα βιταμίνης C. Οι φαινολικές ενώσεις είναι ικανές να έχουν ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων των αντιμεταλλαξιογόνων και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων. Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ, ως υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό μέσα στον οργανισμό, έχει αντικαρκινογόνες και άλλες βιολογικές ιδιότητες. Παράλληλα, παρουσιάζει ρυθμιστική λειτουργία σε όλο το σώμα λόγω της εμπλοκής του στη σύνθεση ορμονών, παραγόντων απελευθέρωσης ορμονών και νευροδιαβιβαστών[4]–[6], [8], [15], [17], [20], [43].

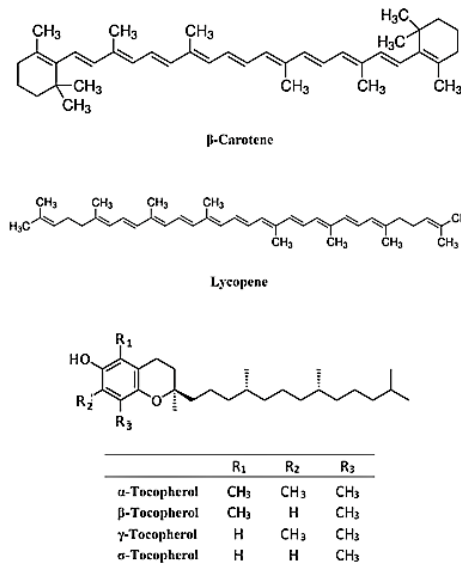
Πιο αναλυτικά, μεταξύ των υδατοδιαλυτών φυτοχημικών που περιέχονται στο άγριο τριαντάφυλλο, ξεχωρίζουν οι φαινολικές ενώσεις και το ασκορβικό οξύ. Η συμπερίληψη του ασκορβικού οξέος στη διατροφή είναι σημαντική, καθώς περιέχει οξειδωαναγωγική κατάσταση και παράγει οφέλη για την υγεία. Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν δείξει την ευεργετική επίδραση της βιταμίνης αυτής στη νόσο του Αλτσχάιμερ. Η συγκέντρωση αυτής της βιταμίνης στο άγριο τριαντάφυλλο εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες και έχει ευρύ φάσμα. Σε ορισμένες μελέτες, η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο *Rosa canina* έχει βρεθεί ίση με 600 mg/L, ενώ σε άλλες μελέτες έχουν βρεθεί, τόσο υψηλότερες, όσο και χαμηλότερες τιμές. Η διακύμανση αυτή πιθανότατα οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και στη γεωγραφική θέση από την οποία λήφθηκε η πρώτη ύλη του άγριου τριαντάφυλλου[8], [20], [34], [45].

Από την άλλη, από τις φαινολικές ενώσεις, το ελλαγικό οξύ έδειξε υψηλή αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινογόνο δράση σε πληθώρα αναλύσεων. Αυτή η ένωση λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό και είναι σε θέση να προκαλέσει απόπτωση σε καρκινογόνα κύτταρα. Τέλος, η κερκετίνη, η οποία είναι το πιο άφθονο φλαβονοειδές, και το παράγωγό της κερκετιν-3-O-γλυκουρονίδιο, αναστέλλει την υπερπαραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS, προκαλώντας τη χημειοπροστασία της μιτοχονδριακής λειτουργίας μέσω αντιοξειδωτικών δράσεων[19], [34].



Σχήμα 4: Χημικοί τύποι των υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].

Εκτός των υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών, υφίστανται και λιποδιαλυτά, όπως τα καροτενοειδή και οι τοκοφερόλες, αν και αυτές οι ενώσεις είναι λιγότερο μελετημένες και οι γνώσεις για αυτές είναι πιο περιορισμένες. Τα πιο άφθονα καροτενοειδή είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ακολουθούμενα από τη β-κρυπτοξανθίνη, τη ρουβιξανθίνη, τη ζεαξανθίνη και τη λουτεΐνη. Τα καροτενοειδή είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς δρουν ως προβιταμίνη Α και μπορούν να αποτρέψουν ορισμένες χρόνιες ασθένειες, ακόμα και τον καρκίνο. Οι τοκοφερόλες, τα α-,β-,γ- και δ- ισομερή και οι τοκοτριενόλες έχουν δραστηριότητα βιταμίνης Ε και είναι ενώσεις που παρουσιάζουν ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών. Αυτές οι ενώσεις δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως το Αλτσχάιμερ, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ορισμένοι τύποι καρκίνου[26], [34], [45].



Σχήμα 5: Χημικοί τύποι των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου[34].

Επιπλέον, πραγματοποιώντας σύγκριση του άγριου τριαντάφυλλου με άλλα λαχανικά και φρούτα, ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, το άγριο τριαντάφυλλο παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα σε πολλά άλλα φρούτα και λαχανικά. Παράλληλα, συγκρίνοντας τα διάφορα μέρη του φυτού *Rosa canina* (καρπός, πέταλα, λουλούδια και όζος) αποδεικνύεται πως υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση έχει ο όζος, υψηλότερη περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες και β-καροτένιο έχει ο καρπός και τέλος, τα πέταλα παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων[34].

Συμπερασματικά, το είδος *Rosa canina* έχει εμφανίσει, σε διάφορες μελέτες, αντιοξειδωτικές δράσεις σε όλες τις συγκεντρώσεις σε σχέση με την αναγωγική ισχύ, τη δραστηριότητα σάρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου και τις δοκιμές δραστηριότητας σάρωσης ριζών ανιόντος υπεροξειδίου. Τα παραπάνω υποδηλώνουν πως το άγριο τριαντάφυλλο μπορεί να δρα, όχι μόνο ως αντιοξειδωτικό, αλλά και ως προοξειδωτικό με τα αποτελέσματα να εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις του[5], [6].

1.2.7 ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά ορισμένες από τις δράσεις του άγριου τριαντάφυλλου, εκτός της αντιοξειδωτικής που αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα (§1.2.6).

✓ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Τα βακτήρια μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα και να οδηγήσουν σε πολλαπλά προβλήματα υγείας. Αντί να χρησιμοποιούνται χημικά πρόσθετα, είναι προτιμότερο να γίνεται χρήση φυσικών συστατικών για τον περιορισμό των παθογόνων βακτηρίων.

Η αντιβακτηριακή δράση του *R. Canina* έχει επιβεβαιωθεί από πολλές επιστημονικές μελέτες. Οι μελέτες αυτές έχουν αποδείξει τη σημαντική αντιβακτηριακή δράση, η

οποία προέρχεται από τις φαινολικές και ορισμένες άλλες ενώσεις του άγριου τριαντάφυλλου. Παράλληλα, έχει εξεταστεί η αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων του άγριου τριαντάφυλλου και η επίδραση του διαλύτη, αιθανόλη ή μεθανόλη, στη δράση αυτή. Επιπλέον, σε διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλοι τύποι μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων αρνητικών κατά Gram και μυκήτων. Η μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση εντοπίζεται στα αιθανολικά, έναντι των μεθανολικών, εκχυλίσματα και κυρίως κατά των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων[12]. Σε άλλες επιστημονικές έρευνες, αξιολογήθηκαν εκχυλίσματα υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου ως προς τη αντιμικροβιακή τους δράση έναντι ζυμομυκήτων και θετικών κατά Gram βακτηρίων. Και στη περίπτωση αυτών των μικροοργανισμών, τα εκχυλίσματα φανερώνουν ανασταλτικά αποτελέσματα στη δράση τους, τα οποία αποδίδονται στο φαινολικό τους περιεχόμενο[4]. Τέλος, το εκχύλισμα *R. canina* βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό και κατά της ανάπτυξης της ασθένειας του σταφυλόκοκκου (ανάπτυξη μεθικιλίνης)[4], [5], [11], [12], [34].

✓ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία ομάδα φυσιολογικών δυσλειτουργιών που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία που προκύπτει άμεσα από ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης, αντίσταση στην ινσουλίνη ή υπερβολική έκκριση γλυκαγόνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει ταξινομηθεί σε δύο τύπους (τύπου 1-T1D, τύπου 2-T2D) και τα τελευταία χρόνια είναι η πιο συχνή ενδοκρινική διαταραχή. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως η υπερπαραγωγή ROS κατέχει βασικό ρόλο στη σοβαρότητα των επιπλοκών του διαβήτη. Αρκετά αντιδιαβητικά φάρμακα, καθώς και η φυσική αντιοξειδωτική βιταμίνη E, έχουν χορηγηθεί στις ιατρικές πρακτικές. Ωστόσο, η πρόληψη των δευτερογενών επιπλοκών, καθώς και οι παρενέργειες των θεραπειών εμπόδισαν τη χρήση τους. Σε αυτό το πλαίσιο, το άγριο τριαντάφυλλο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε αντιοξειδωτικά, θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή επικουρική θεραπεία για το σακχαρώδη διαβήτη. Το άγριο τριαντάφυλλο χρησιμοποιείται παραδοσιακά στη θεραπεία του διαβήτη, κυρίως στο Ιράν. Είναι γνωστό πως οι καρποί του άγριου τριαντάφυλλου περιέχουν πτητικές ενώσεις, φαινολικές και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις, που μπορούν να αποδειχθούν αποτελεσματικές στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Η αντιδιαβητική δράση του συγκεκριμένου φυτού οφείλεται στο γεγονός πως μπορεί να λειτουργήσει ως αυξητικός παράγοντας για την παγκρεατική β-κυτταρική σειρά, παρέχοντας ένα νέο μηχανισμό για την παρατηρούμενη αντιδιαβητική δράση αυτού του φυσικού παράγοντα. Απαιτούνται, ωστόσο, περαιτέρω προκλινικές μελέτες για την αξιολόγηση του μηχανισμού δράσης[6], [12], [34].

✓ ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Τα εκχυλίσματα από τον καρπό και τους σπόρους του άγριου τριαντάφυλλου βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση στην αύξηση του σωματικού βάρους ή/και του βάρους του σπλαχνικού λίπους, χωρίς να επηρεάζεται η πρόσληψη τροφής. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη σημασία, τόσο των τμημάτων της 3-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της καμπερόλης, όσο και της π-κουμαροϋλικής κατά της παχυσαρκίας. Η ιδιότητα του άγριου τριαντάφυλλου κατά της παχυσαρκίας προκύπτει από την αύξηση της οξείδωσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και τους σκελετικούς

μύες. Παράλληλα, είναι αποδεδειγμένο πως το εκχύλισμα του άγριου τριαντάφυλλου μπορεί να παρουσιάσει ανασταλτική επίδραση στη συσσώρευση των λιπιδίων στα λιποκύτταρα. Η πρόσληψη 100 mg /kg εκχυλίσματος σε ημερήσια βάση για 12 εβδομάδες μπορεί να μειώσει το κοιλιακό σπλαχνικό λίπος σε παχύσαρκα άτομα και, τόσο το σωματικό βάρος, όσο και ο δείκτης μάζας σώματος παρουσιάζουν σημαντική μείωση σε σύγκριση με τα αρχικά επίπεδα[4]–[6], [12], [44].

✓ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Ο καρκίνος έχει αναδειχθεί ως η κυρίαρχη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια. Η έναρξη και η εξέλιξη του καρκίνου σχετίζεται στενά με τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ενεργών ειδών οξυγόνου, ROS. Η βλάβη που προκαλείται από τα ROS στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA παράγει μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εμφάνιση όγκου, ενώ βλάβες σε άλλα κυτταρικά συστήματα συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού φαινοτύπου. Τα καρκινικά κύτταρα, επίσης, είναι γνωστά για τα ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα ROS, λόγω του ρόλου αυτών των μορίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Προκειμένου να αποφευχθεί η βλάβη από το οξειδωτικό στρες, αυξάνονται, επίσης, τα αντιοξειδωτικά συστήματα των καρκινικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η ισορροπία οξειδοαναγωγής στον καρκίνο είναι αρκετά ευαίσθητη και η διακοπή πυροδοτεί τον κυτταρικό θάνατο. Ως εκ τούτου, πολλές στρατηγικές χημειοθεραπείας εστιάζουν σε μία ρήξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας.

Δεδομένου ότι τα φαρμακευτικά φυτά είναι μία φυσική πηγή αντιοξειδωτικών ενώσεων, πολλές μελέτες υπογραμμίζουν την αποτελεσματικότητα μιας μεγάλης ποικιλίας φυτών κατά του καρκίνου. Τα φυτικά φαινολικά είναι γνωστό ότι δημιουργούν αντίσταση στην καρκινογένεση. Από τη σκοπιά αυτή, τα εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου είναι πολλά υποσχόμενα. Οι πολυφαινόλες του άγριου τριαντάφυλλου, με κυρίαρχες τη κερκετίνη και το ελλαγικό οξύ, συμβάλλουν στην αντιπολλαπλασιαστική δράση των κυτταρικών σειρών HeLa, MCF7 και HT-29. Ακόμη, η προληπτική δράση κατά του καρκίνου μπορεί να ερμηνευθεί από την αφθονία του καροτενοειδούς λυκοπενίου, που είναι γνωστό πως σαρώνει τα ROS. Επιπρόσθετα, οι επιπτώσεις διαφόρων κλασμάτων του καρπού του *Rosa canina* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου έχουν εξεταστεί σε διάφορες μελέτες in-vitro. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αποδεικνύουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου στην αντιπολλαπλασιαστική δράση σε αυτό τον τύπο καρκινικών κυττάρων. Αξίζει να αναφερθεί πως, μία άλλη in-vitro μελέτη φανέρωσε τις αντικαρκινικές επιδράσεις των βιοδραστικών ενώσεων του άγριου τριαντάφυλλου στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του καρκίνου του μαστού. Μέσω αυτού προκύπτει το συμπέρασμα πως οι εστέρες της ξανθοφύλλης μπορεί να είναι υποψήφιοι για μελλοντική θεραπεία αυτού του τύπου καρκίνου. Τα παραπάνω υποδηλώνουν πως ορισμένα τυποποιημένα συμπληρώματα άγριου τριαντάφυλλου μπορούν να αποβούν ωφέλιμα για ασθενείς με καρκίνο, ή ακόμα και για αυτούς που ξεπέρασαν την ασθένεια[4]–[6], [12], [34], [46].

✓ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ

Οι επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος στο ίδιο το σώμα συμβαίνουν όταν η ομοιόσταση διακόπτεται από εσφαλμένο τρόπο ζωής ή ορμονικές αλλαγές, οι οποίες σχετίζονται με την ηλικία. Η ανοσολογική ενεργοποίηση μπορεί να μετρηθεί από το επίπεδο των T-λεμφοκυττάρων (CD3+, CD4+, CD8+), της ανοσοσφαιρίνης (IgG, IgM, IgA) και του συμπληρώματος C3, C4 στο αίμα και στον ορό. Με σκοπό να ξεπεραστούν οι δυσμενείς επιπτώσεις, απαιτείται τροποποίηση του παραγμένου ανοσοποιητικού συστήματος. Το άγριο τριαντάφυλλο έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενο από την άποψη αυτή[4], [6].

Η φλεγμονή είναι μία μορφή διαταραχής του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία προκαλείται για την εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών, την επούλωση τραυματισμών ή το αποτέλεσμα ευαισθητοποίησης. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η ασπιρίνη, είναι χημειοθεραπευτικά και συνήθως είναι ακριβά και παρουσιάζουν παρενέργειες. Για την ανακούφιση του πόνου συχνά χρησιμοποιείται σκόνη άγριου τριαντάφυλλου ως θεραπεία. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του άγριου τριαντάφυλλου έχουν μελετηθεί εκτενώς και μεταξύ των μερών του, οι σπόροι είναι οι κύριοι συνεισφέροντες στο αντιφλεγμονώδες προφίλ. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι βιοενεργά συστατικά, δρουν χειραγωγώντας την επαγωγίμη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, iNOS, και την 2-κυκλοοξυγενάση. Η αναστολή αυτών των ενζύμων μειώνει την παραγωγή NO και προλαμβάνει τη φλεγμονή. Συνολικά, τα παρόντα δεδομένα καταδεικνύουν την αντιφλεγμονώδη ιδιότητα του είδους *Rosa canina*, υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο του ως επικουρικό θεραπευτικό εργαλείο για τη διαχείριση ασθενειών που σχετίζονται με φλεγμονές[4], [6].

✓ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Ορισμένες μελέτες έχουν φανερώσει πως η κατανάλωση του καρπού του άγριου τριαντάφυλλου μπορεί να συμβάλει σε μία υγιή καρδιά. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η πρόσληψη άγριου τριαντάφυλλου οδήγησε σε σημαντική μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης, της ολικής χοληστερόλης πλάσματος, της LDL και της αναλογίας μεταξύ LDL/HDL. Επιπρόσθετα, προέκυψε το συμπέρασμα πως η καθημερινή κατανάλωση σκόνης τριαντάφυλλου μπορεί να μειώσει αισθητά το κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων σε παχύσαρκα άτομα, χωρίς παρενέργειες. Πιο συγκεκριμένα, καθημερινή κατανάλωση 40 g σκόνης τριαντάφυλλου για 6 εβδομάδες μειώνει σημαντικά τους καρδιαγγειακούς κινδύνους, μειώνοντας τη συστολική αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και την αναλογία λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας, LDL, προς λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, HDL[4], [12], [44].

✓ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) είναι μία χρόνια συστηματική νόσος που επηρεάζει το 22.7% του ενήλικου πληθυσμού στις ΗΠΑ. Αυτή η πάθηση μπορεί να προσβάλει άτομα όλων των ηλικιών και φύλων, αλλά παρατηρείται εντονότερα μεταξύ των 20 και 50 ετών και κυρίως σε γυναίκες, από ότι σε άντρες. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μία συστηματική φλεγμονώδης νόσος, η οποία οδηγεί σε διαβρώσεις του χόνδρου και

παραμόρφωση των οστών και των αρθρώσεων. Για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της εν λόγω νόσου, χρησιμοποιούνται μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, τροποποιητικά της νόσου αντιρευματικά φάρμακα και βιολογικοί παράγοντες. Ωστόσο, απαιτούνται νέα φάρμακα, διότι ορισμένοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται με επιτυχία στις παραδοσιακές θεραπείες και προβάλλουν σοβαρές παρενέργειες. Γι' αυτό, τα τελευταία χρόνια, διάφοροι ερευνητές έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στη μελέτη παραδοσιακών θεραπειών με στόχο την ανακάλυψη νέων δραστικών ενώσεων που υπάρχουν σε φυτικά εκχυλίσματα.

Το άγριο τριαντάφυλλο, και συγκεκριμένα το είδος *Rosa canina L.*, έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στην πρόληψη και τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Πιο αναλυτικά, η σκόνη άγριου τριαντάφυλλου έχει αποδειχθεί πως μειώνει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη ρευματοειδή φλεγμονή σε κλινικές δοκιμές. Αυτή η επίδραση σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητά του σε αντιφλεγμονώδη μόρια, όπως το γαλακτολιπίδιο GORO, το οποίο μπορεί να μειώσει τη χημειοταξία των πολυμορφοπυρηνικών λευκοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των μονοκύτταρων του αίματος, καθώς και τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, η οποία παράγεται στο ήπαρ, ως απόκριση στη φλεγμονή. Παράλληλα, το άγριο τριαντάφυλλο μειώνει την παραγωγή αρκετών βασικών προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπρόσθετα, αρκετά λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο άγριο τριαντάφυλλο, όπως τα τριτερπενικά οξέα, το ουρσολικό οξύ, το ολεανολικό οξύ και το βετουλινικό οξύ, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τη δραστηριότητα της κυκλοοξυγενάσης, η έκφραση της οποίας διευκολύνει την εισβολή αρθρικών ινοβλαστών στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και τη συσσώρευση τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης. Η φλεγμονώδης διαδικασία που προκαλείται από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα έχει, επίσης, συσχετιστεί με την αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS), τα οποία συμβάλλουν στη βλάβη των ιστών. Κατά συνέπεια, τα αντιοξειδωτικά θρεπτικά συστατικά, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από τις καταστροφικές επιδράσεις των ROS/RNS, οι οποίες παράγονται από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Τα παραπάνω αποτελούν μόνο ορισμένους από τους λόγους που το άγριο τριαντάφυλλο παρουσιάζει αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση, έναντι της ρευματοειδούς αρθρίτιδας[6], [12], [34].

✓ ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ

Άλλες πιθανές δράσεις του άγριου τριαντάφυλλου είναι ενάντια στην οστεοπόρωση, ενάντια στις νεφρικές διαταραχές, εμφανίζει νευροπροστατευτική δραστηριότητα, αντιδιαρροϊκή και αντιελκογόνο δράση, κυτταροτοξική δράση, καθώς και σημαντικά προβιοτικά αποτελέσματα. Ωστόσο, αξίζει να γίνει ιδιαίτερη αναφορά στη δράση του είδους *Rosa canina L.* ενάντια των δερματικών διαταραχών και γενικότερα, τη δράση του στο δέρμα[4]–[6], [12], [24], [34], [44].

Μία από τις πιο συχνές δερματικές διαταραχές είναι η ατοπική δερματίτιδα, AD, μία χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή, η οποία επηρεάζει κυρίως παιδιά. Οι θεραπείες για δερματικές βλάβες που σχετίζονται με αυτή την ασθένεια εστιάζουν σε μία κατασταλαμμένη φλεγμονώδη απόκριση, αλλά οι περισσότερες είναι απλώς προσωρινές,

λόγω των παρενεργειών που εμφανίζουν. Προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής για τους ασθενείς, χρειάζονται νέα φάρμακα κατά τις ατοπικής δερματίτιδας, προκειμένου να βρεθεί μία οριστική λύση σε αυτό το πρόβλημα, χωρίς επιβλαβείς επιπτώσεις. Εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου φαίνεται να ενδείκνυνται για τη συγκεκριμένη δράση.

Επιπρόσθετα, η γήρανση του δέρματος οφείλεται σε δύο, κυρίως, παράγοντες: αφενός, στη χρόνια γήρανση που σχετίζεται με το χρόνο και, αφετέρου, στη κοινώς αποκαλούμενη φωτογήρανση, η οποία προκαλείται από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Ο συνδυασμός και των δύο καταστάσεων οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητας του δερματικού φραγμού και στην απόκτηση χαρακτηριστικών, όπως ξηρότητα, ρυτίδες και κηλίδες. Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του τριαντάφυλλου το καθιστούν ένα πολλά υποσχόμενο βοήθημα στη μείωση των σημαδιών της γήρανσης του δέρματος.

Ιδιαίτερα έχει μελετηθεί η επίδραση της κερκετίνης του *Rosa canina* στη μελανογένεση σε κύτταρα μελανώματος ποντικού B16. Η κερκετίνη βρέθηκε να είναι ικανή να αναστέλλει τη δραστηριότητα της τυροσινάσης, του βασικού ενζύμου που ευθύνεται για τη μελάγχρωση του ανθρώπινου δέρματος, των μαλλιών και των ματιών. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον πως η μείωση της περιεκτικότητας σε μελανίνη δε σχετίζεται με τη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, και αυτό αποτελεί ένα σημαντικό σημείο για την πιθανή εφαρμογή του στη βιομηχανία καλλυντικών. Παράλληλα, η βιταμίνη C, η οποία είναι πλούσια στο άγριο τριαντάφυλλο, μπορεί να παρουσιάσει διπλό ρόλο στην προστασία του δέρματος, καθώς εκτός από αντιοξειδωτική δράση, εμπλέκεται άμεσα στο σχηματισμό του δέρματος και του κολλαγόνου. Επιπρόσθετα, η αντιφλεγμονώδης δράση ορισμένων συστατικών του *Rosa canina* σχετίζεται επίσης με την προστασία από τις φλεγμονές και από βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην επίδραση του *Rosa canina* στην αύξηση της μακροζωίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς εμποδίζουν τη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης. Βάσει όλων των παραπάνω, αλλά και άλλων λόγων, αιτιολογείται η θετική επίδραση του άγριου τριαντάφυλλου στην υγεία του δέρματος [34].

1.3 ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Η παγκόσμια στροφή προς την Πράσινη Χημεία είναι μία ολοκληρωμένη προσέγγιση προς τις συμβατικές χημικές πρακτικές. Ακολουθώντας αυτή την τάση, τόσο οι πρώτες ύλες, όσο και οι διαδικασίες, επαναξιολογούνται από την αρχή, συνδυάζοντας την έρευνα για πρώτες ύλες φυσικής προέλευσης, φιλικές προς το περιβάλλον και διαδικασίες απλές και οικονομικά αποδοτικές [37]. Η πράσινη τεχνολογία αναζητά νέους διαλύτες για να αντικαταστήσει κοινούς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι παρουσιάζουν εγγενή τοξικότητα και έχουν υψηλή πτητικότητα, οδηγώντας σε εξάτμιση πτητικών οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα [45], [47].

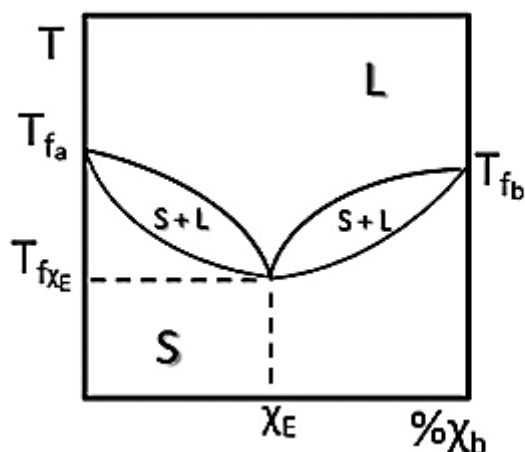
1.3.1 ΦΥΣΙΚΟΙ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (NaDES)

1.3.1.1 Ορισμός

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) αποτελούν μία νέα γενιά ιοντικών υγρών (ILs) και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (DES). Ενώ παρουσιάζουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα ιοντικά υγρά ή τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, η αλληλεπίδρασή τους με το νερό ρυθμίζει τα χαρακτηριστικά τους, επιτρέποντας στους ζωντανούς οργανισμούς να τους χρησιμοποιούν με διάφορους τρόπους[48], [49].

Αντίστοιχα με τα ιοντικά υγρά και τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες σχηματίζονται με την ανάμειξη δύο ή περισσότερων συστατικών, με τη διαφορά πως τα συστατικά αυτά είναι φυσικής προέλευσης, δηλαδή από φυσικές πηγές, και περιλαμβάνουν σάκχαρα, αλκόολες σακχάρων, αμινοξέα, οργανικά οξέα και οργανικές βάσεις. Οι συνδυασμοί δύο ή περισσότερων από αυτές τις ενώσεις, με την προσθήκη νερού σε ορισμένες μοριακές αναλογίες, δημιουργούν ένα ευτηκτικό υγρό[48], [49].

Πιο αναλυτικά, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) ή οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) λαμβάνονται με τη συμπλοκοποίηση μεταξύ ενός δέκτη και ενός δότη δεσμού υδρογόνου και αποτελούνται από μεγάλα, μη συμμετρικά ιόντα με χαμηλή ενέργεια πλέγματος. Η μετεγκατάσταση του φορτίου που λαμβάνει χώρα είναι υπεύθυνη για τη μείωση του σημείου τήξης του μίγματος, συγκριτικά με τα σημεία τήξης των συστατικών-πρώτων υλών από τα οποία παρασκευάζεται ο διαλύτης. Οι πιο κοινοί DES βασίζονται στη γλωριούχο χολίνη, τα καρβοξυλικά οξέα και άλλους δότες δεσμού υδρογόνου, όπως για παράδειγμα ουρία, κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ και γλυκερίνη[47], [50]–[53].



Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα φάσεων θερμοκρασιών τήξης διαφόρων μιγμάτων[47].

1.3.1.2 Αρχές Πράσινης Χημείας και Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) αντιπροσωπεύουν πλήρως τις αρχές της Πράσινης Χημείας. Αρχικά, η διαδικασία παρασκευής των NaDES αποτελεί απλώς ένα μίγμα δύο ή περισσότερων ενώσεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη κάποιας θερμότητας ή η διαλυτοποίηση των ενώσεων στο νερό, γεγονός που φανερώνει πως το νερό χρειάζεται να ανακτάται με εξάτμιση ή συμπύκνωση. Το παραπάνω υπογραμμίζει το γεγονός ότι δεν παράγονται απόβλητα κατά την παραγωγή του NaDES και ότι δε σχηματίζονται ανεπιθύμητα υποπροϊόντα. Λόγω του ότι οι NaDES αποτελούν ανάμιξη δύο ή περισσότερων συστατικών, η απόδοση της διαδικασίας παρασκευής τους μπορεί να θεωρηθεί ίση με 100%. Παράλληλα, ένας από τους πιο εφαρμοσμένους παράγοντες, προκειμένου να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα μιας διαδικασίας, είναι ο παράγοντας E. Ο παράγοντας E ορίζεται από τα συνολικά παραγόμενα απόβλητα διαιρεμένα με τη συνολική ποσότητα του προϊόντος. Στην περίπτωση των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, ο συγκεκριμένος παράγοντας μπορεί να θεωρηθεί ίσος με 0. Ακόμη, η οικονομία ατόμου είναι 100%, διότι η παρασκευή NaDES δεν περιλαμβάνει καμία χημική αντίδραση. Αναφορικά με την απόδοση άνθρακα, αυτή ορίζεται από την ποσότητα άνθρακα στο προϊόν διαιρεμένη με την ποσότητα άνθρακα στα αντιδρώντα, και μπορεί να θεωρηθεί ίση με 100%. Ωστόσο, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται θέρμανση, χρειάζεται να γίνουν πιο συγκεκριμένοι υπολογισμοί για την έμμεση χρήση άνθρακα[47].

1.3.1.3 Ιστορική Αναδρομή των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι ευτηκτικοί διαλύτες αναφέρονται σπάνια στη βιβλιογραφία μέχρι τις αρχές του 21^{ου} αιώνα. Στη δεκαετία του 1990 γίνονται μόνο μεμονωμένες αναφορές σχετικά με ειδικές εφαρμογές αυτών των υγρών μιγμάτων. Παρακάτω γίνεται μία σύντομη επισκόπηση των εφαρμογών και των μεγάλων θεμελιωδών μελετών που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα.

- ✓ Το 1994, ο Gill και οι συνεργάτες του ανέφεραν τα ευτηκτικά μίγματα ως υποστρώματα για ενζυμικές αντιδράσεις. Μέσω αυτής της έρευνας, προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα μπορούν να διατηρήσουν τη δραστηριότητά τους όταν βρίσκονται διαλυμένα σε ευτηκτικά μίγματα. Το εύρημα αυτό αποτελεί μεγάλο βήμα με σημαντικό αντίκτυπο σε μεγάλα συστήματα και νέες βιομηχανικές εξελίξεις.
- ✓ Το 1995, μία εργασία που δημοσιεύθηκε στο Nature, αποκάλυψε τη δυνατότητα χρήσης ευτηκτικών μιγμάτων ως εναλλακτική λύση για την κρυστάλλωση γαλακτώματος, η οποία παρέχει μία πιο οικονομική στρατηγική για το διαχωρισμό και τον καθαρισμό των μοριακών μιγμάτων.
- ✓ Το 1998, ο Stott και οι συνεργάτες του παρουσιάζουν την εργασία τους, η οποία κάνει αναφορά στη δυνατότητα ανάπτυξης συσκευών χορήγησης φαρμάκων, ιδιαίτερα για διαδερμική χορήγηση. Στην εν λόγω εργασία αναφέρονται μίγματα μιας φαρμακευτικής δραστικής ένωσης και διαφορετικών τερπενίων,

τα οποία χρησιμοποιούνται ως ενισχυτές της διείσδυσης του δέρματος. Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον στη συγκεκριμένη εργασία, το οποίο ανοίγει νέους ορίζοντες για μελλοντικές μελέτες σε φαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές, είναι η δυνατότητα σύζευξης μιας δραστικής ουσίας με ένα δεύτερο συστατικό και η παρασκευή βιοενεργών ευτηκτικών συστημάτων.

- ✓ Το 2004 παρουσιάστηκε η πρώτη υπόδειξη πως οι DES μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ευέλικτες εναλλακτικές λύσεις των ιοντικών υγρών. Από τη συγκεκριμένη χρονολογία και έπειτα, έχει πραγματοποιηθεί και έχει δημοσιευθεί πληθώρα ερευνών για τους DES και συγκεκριμένα, για τις φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών. Η γνώση των ιδιοτήτων των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών αποτελεί το πρώτο στάδιο για τη δημιουργία μιας βάσης, ώστε να προωθηθούν και να χρησιμοποιηθούν σε μία ευρεία γκάμα εφαρμογών.
- ✓ Έπειτα, ο Parnham και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τη δυνατότητα χρήσης ιοντικών υγρών ή/και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών μετά από ιονοθερμική σύνθεση. Η χρήση των DES ήταν σημαντική στη συγκεκριμένη εφαρμογή, μιας και το βασικό πλεονέκτημα τους είναι ότι καθώς η αντίδραση λαμβάνει χώρα, ένα από τα συστατικά του DES διασπάται και παρέχει το οργανικό πρότυπο που απαιτείται για την αντίδραση.
- ✓ Το 2007, έγινε η αναφορά της χρήσης DES στο πεδίο της ηλεκτροχημείας. Πιο συγκεκριμένα, μία ιδιαίτερη εφαρμογή σε αυτό το πεδίο έρευνας είναι η ηλεκτροαπόθεση μετάλλων, η οποία μπορεί να ωφεληθεί από την υψηλή διαλυτότητα των μεταλλικών αλάτων σε μη υδατικά διαλύματα και την υψηλή αγωγιμότητα των ιοντικών υγρών και των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

Οι DES έχουν αποκτήσει και αποκτούν ολοένα και περισσότερο επιστημονικό ενδιαφέρον και βρίσκουν θέση σε πληθώρα εφαρμογών[47].

Οι NaDES εισάγονται για πρώτη φορά από τους Choi et al. το 2013. Αποτελούν ένα ιδιαίτερα ανταγωνιστικό ερευνητικό πεδίο, όπως αποδεικνύεται από τη συνεχή αύξηση της επιστημονικής παραγωγής που ασχολείται με αυτά τα θέματα από το 2015[54].

1.3.1.4 Τύποι Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες ταξινομούνται ανάλογα με τη φύση του συμπλοκοποιητικού παράγοντα που χρησιμοποιείται. Βάσει αυτού υπάρχουν τέσσερις τύποι βαθέως ευτηκτικών διαλυτών:

- ✓ Οι DES τύπου I αποτελούνται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και χλωριούχο μέταλλο και μπορούν να θεωρηθούν ανάλογοι με τα συστήματα αλογονιδίου μετάλλου/άλατος ιμιδαζολίου. Παραδείγματα DES τύπου I αποτελούν τα τήγματα χλωροαργλικού/άλατος ιμιδαζολίου και DES που σχηματίζονται από άλατα ιμιδαζολίου και διάφορα αλογονίδια μετάλλων.
- ✓ Οι DES τύπου II αποτελούνται από άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και ένυδρο χλωριούχο μέταλλο. Το σχετικά χαμηλό κόστος πολλών ενυδατωμένων

μεταλλικών αλάτων, σε συνδυασμό με την εγγενή έλλειψη ευαισθησίας στον αέρα και την υγρασία, καθιστά βιώσιμη τη χρήση αυτών σε βιομηχανικές διεργασίες.

- ✓ Οι DES τύπου III αποτελούνται από ένα άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου και από ένα δότη δεσμού υδρογόνου HBD. Στο συγκεκριμένο τύπο, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως η χλωριούχος χολίνη και HBDs για πολλές εφαρμογές, όπως εκχύλιση και οργανική σύνθεση.
- ✓ Οι DES τύπου IV αποτελούνται από χλωριούχο μέταλλο και δότη δεσμού υδρογόνου HBD[50], [55].

Αξίζει να σημειωθεί πως, το ευρύ φάσμα των διαθέσιμων δοτών δεσμού υδρογόνου (HBD) φανερώνει πως αυτή η κατηγορία DES είναι ιδιαίτερα προσαρμόσιμη στην εκάστοτε ανάγκη[50].

1.3.1.5 Φυσικοχημικές Ιδιότητες των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των NaDES είναι οι ευέλικτες φυσικοχημικές τους ιδιότητες που μπορούν να προσαρμοστούν σε πληθώρα εφαρμογών και ιδιαίτερα σε στοχευμένες τεχνικές εκχύλισης[54]. Μεταβάλλοντας τα συστατικά και τις αναλογίες τους, οι NaDES παρουσιάζουν μεγάλες δυνατότητες ως διαλύτες και μπορεί να ληφθεί ένας μεγάλος αριθμός αυτών, καθιστώντας τα ένα νέο τύπο διαλυτών[50].

❖ ΠΗΤΗΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΞΗΣ

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, οι NaDES σχηματίζονται με την ανάμειξη δύο ή περισσότερων συστατικών ικανών να δημιουργήσουν μία νέα υγρή φάση, μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Αυτή η υγρή φάση χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο σημείο τήξης από αυτό των μεμονωμένων συστατικών. Η μείωση του σημείου τήξης προέρχεται από την αλληλεπίδραση HBD και HBA και πιο συγκεκριμένα, ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ των HBA και HBD και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals προκαλούν μετατόπιση του φορτίου, η οποία παρεμβαίνει στην ικανότητα των επιμέρους συστατικών να κρυσταλλώνονται και κατά συνέπεια, το σημείο τήξης του NaDES μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα των αρχικών ενώσεων [50], [56]. Παράλληλα, οι DES χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλή τάση ατμών και συνεπώς, χαμηλή πτητικότητα. Στη βιβλιογραφία εμφανίζεται πληθώρα DES με σημείο τήξης χαμηλότερο από τους 150 °C και έτσι, οι διαλύτες αυτοί είναι υγροί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Γενικά, για καθορισμένο άλας HBA, είναι κρίσιμη η επιλογή HBD στο σχηματισμό ενός NaDES με χαμηλό σημείο τήξης. Αντίστοιχα, για ένα καθορισμένο HBD, η φύση του HBA επηρεάζει επίσης το σημείο τήξης του NaDES. Τέλος, για συγκεκριμένα HBD και HBA, μία άλλη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει το σημείο τήξης των DES είναι η μοριακή αναλογία HBA/HBD [50].

❖ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ

Η πολικότητα αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο για ένα διαλύτη, καθώς καθορίζει τη διαλυτοποιητική του ικανότητα και κατά συνέπεια, την ικανότητα εκχύλισης και

ανάμειξης με άλλους διαλύτες[57], [58]. Αν και οι NaDES θεωρούνται φιλικό προς το περιβάλλον και εναλλακτικοί διαλύτες, έναντι των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών, πληροφορίες σχετικά με την πολικότητα αυτών δεν αναφέρονται πολύ συχνά στη βιβλιογραφία[50]. Μελέτες φανέρωσαν πως η πλειοψηφία των NaDES είναι υδρόφιλη, ενώ οι υδρόφοβοι NaDES είναι πιο περιορισμένοι σε αριθμό και δεν έχουν αξιοποιηθεί ιδιαίτερα[57]. Παράλληλα, έπειτα από έρευνες έγινε γνωστό πως οι NaDES με βάση τα οργανικά οξέα είναι πιο πολικοί, ακολουθούν οι NaDES με βάση τα αμινοξέα και ως λιγότερο πολικοί κρίνονται οι NaDES που αποτελούνται από σάκχαρα και πολυόλες, τα οποία παρουσιάζουν πολικότητα παραπλήσια με αυτή του νερού και της μεθανόλης. Αξίζει να σημειωθεί πως, η πολικότητα ενός NaDES μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την προσθήκη νερού[53], [54], [58].

❖ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Η πυκνότητα είναι μία θερμοφυσική ιδιότητα που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στους περισσότερους NaDES, η πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 1.35 g/cm³ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γεγονός που αποδεικνύει πως είναι υψηλότερη από την πυκνότητα του νερού. Ωστόσο, οι DES που περιέχουν μεταλλικά άλατα παρουσιάζουν υψηλότερες πυκνότητες, του εύρους 1.3-1.6 g/cm³ [50]. Η πυκνότητα των DES παρουσιάζει γραμμική μείωση, τόσο με τη θερμοκρασία, όσο και με την περιεκτικότητα σε νερό[54], [58]. Γενικά, οι διαφορές στην πυκνότητα εξηγούνται από τη θεωρία των οπών, καθώς οι NaDES αποτελούνται από κενό χώρο. Έπειτα από μελέτες είναι γνωστό πως η πυκνότητα των NaDES που αποτελούνται από ένα HBD που περιέχει ομάδα υδροξυλίου αυξάνεται με την αύξηση των ομάδων αυτών και μειώνεται με την εισαγωγή αρωματικών ομάδων. Επιπρόσθετα, για την περίπτωση των διοξέων DES, μία παράμετρος που επηρεάζει την πυκνότητα αυτών είναι το μήκος της αλυσίδας, όπου έχει παρατηρηθεί πως αύξηση του μήκους της αλυσίδας οδηγεί σε μείωση της πυκνότητας[50].

❖ ΙΞΩΔΕΣ

Το ιξώδες των NaDES αποτελεί μία πολύ σημαντική παράμετρο που χρήζει ιδιαίτερης μελέτης. Είναι γνωστό πως το ιξώδες των συγκεκριμένων διαλυτών είναι συχνά υψηλό, με τιμές μεγαλύτερες από 100 cP, και παράλληλα, οι περισσότεροι NaDES παρουσιάζουν υψηλότερο ιξώδες από πολλούς συμβατικούς οργανικούς διαλύτες[58]. Τα ιξώδη των ευτηκτικών μιγμάτων επηρεάζονται, κυρίως, από τη χημική φύση των συστατικών του DES, καθώς και από την αναλογία αυτών. Το υψηλό ιξώδες αποδίδεται συχνά στην παρουσία μιας εκτεταμένης αλληλεπίδρασης δεσμού υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, που οδηγεί σε χαμηλότερη κινητικότητα των ελεύθερων ειδών εντός του DES. Παράλληλα, το υψηλό ιξώδες των DES οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ή στις αλληλεπιδράσεις van der Waals, στο μεγάλο μέγεθος ιόντων και στον πολύ μικρό όγκο κενού των περισσότερων DES και τέλος, στον ελεύθερο όγκο. Αξίζει να αναφερθεί η συσχέτιση της θεωρίας των οπών με το ιξώδες, η οποία φανερώνει πως το ιξώδες συσχετίζεται με τη διαθεσιμότητα οπών στο ρευστό, οι οποίες επιτρέπουν την κατάλληλη ιοντική κίνηση, και βάσει αυτής μπορούν να ληφθούν DES με χαμηλό ιξώδες, κάνοντας χρήση μικρών κατιόντων ή φθοριούχων HBD. Μία άλλη σημαντική παράμετρος που συμβάλει στην τιμή του ιξώδους είναι η περιεκτικότητα σε νερό, η οποία κρίνεται ιδιαίτερη σημαντική, καθώς πολλοί τύποι DES είναι εξαιρετικά

υγροσκοπικοί. Αποτελέσματα μελετών υπογράμμισαν πως είναι εφικτή η μείωση του ιζώδους με προσθήκη ελεγχόμενων ποσοτήτων νερού, οι οποίες δε θα επηρεάσουν τις υπόλοιπες ιδιότητες των DES[50], [53], [58].

❖ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗ ΤΑΣΗ

Η επιφανειακή τάση είναι μία σημαντική ιδιότητα, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως σε εφαρμογές γαλακτωμάτων και τασιενεργών. Έχει παρατηρηθεί πως η επιφανειακή τάση είναι αξιοσημείωτα υψηλή και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισχύ των διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ του HBD και του αντίστοιχου άλατος. Η φύση του κατιόντος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιφανειακή τάση και πιο συγκεκριμένα, ένα κατιόν που περιέχει μία ομάδα υδροξυλίου οδηγεί σε ένα DES με υψηλή επιφανειακή τάση. Επιπρόσθετα, η θερμοκρασία και το μοριακό κλάσμα άλατος έχουν αντίκτυπο στην ιδιότητα αυτή. Έπειτα από μελέτες σε διάφορους DES, η επιφανειακή τάση παρουσίασε αύξηση με τη μείωση της θερμοκρασίας και του μοριακού κλάσματος, λόγω της εξασθένησης του δεσμού υδρογόνου[50], [58].

❖ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Οι ιοντικές αγωγιμότητες των DES είναι σχετικά χαμηλές και συσχετίζονται με το ιζώδες αυτών. Τα περισσότερα από αυτά παρουσιάζουν ιοντική αγωγιμότητα μικρότερη από 1 mS/cm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η αγωγιμότητα ενός NaDES μπορεί να προσαρμοστεί μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία ή την περιεκτικότητα σε νερό. Σε μελέτες, έχει παρατηρηθεί πως με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται γραμμική αύξηση της αγωγιμότητας, ενώ σε άλλες μελέτες, η επίδραση της θερμοκρασίας έχει περιγραφεί σύμφωνα με τη συμπεριφορά τύπου Arrhenius. Αναφορικά με την επιρροή της περιεκτικότητας σε νερό, παρατηρείται ένα σχήμα καμπάνας στη σχέση μεταξύ της αγωγιμότητας και της περιεκτικότητας σε νερό. Τέλος, έχει αποδειχθεί πως η ιοντική αγωγιμότητα μπορεί να ρυθμιστεί και μέσω μεταβολής της μοριακής αναλογίας άλατος/HBD[50], [58].

❖ pH

Το pH των DES ποικίλλει ανάλογα με τα συστατικά από τα οποία προέρχεται. Οι DES που έχουν ως βάση το γαλακτικό οξύ, όπως αυτοί που αναφέρονται παρακάτω και μελετώνται στην παρούσα διπλωματική εργασία, εμφανίζουν εξαιρετικά χαμηλές τιμές pH, χαμηλότερες από 2.5, λόγω της ύπαρξης του γαλακτικού οξέος, δηλαδή της παρουσίας οξέος[59].

❖ ΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΑΘΛΑΣΗΣ

Ο δείκτης διάθλασης είναι μία σημαντική ιδιότητα για κάθε διαλύτη, που όμως αναφέρεται σπάνια στην περίπτωση των ιοντικών υγρών και των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Έχει παρατηρηθεί πως, οι τιμές του δείκτη διάθλασης παρουσιάζουν γραμμική μείωση με αύξηση της θερμοκρασίας[58].

1.3.1.6 Μέθοδοι παρασκευής Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι DES ή οι NaDES που χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών αποτελούνται, συνήθως, από μία ένωση αποδέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA) και μία ένωση δότη

δεσμού υδρογόνου (HBD), όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη υποενότητα (§1.3.1.1). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι παρασκευής ανάλογα με το μίγμα, την περιεκτικότητα σε νερό και την προβλεπόμενη εφαρμογή[60]. Οι DES/NaDES μπορούν να παρασκευαστούν με τρεις κύριες μεθόδους:

- ✓ Θερμική ανάμειξη, στην οποία τα HBA και HBD αναμιγνύονται με καθορισμένη μοριακή αναλογία και θερμαίνονται σε θερμοκρασία έως 80 °C με συνεχή μαγνητική ανάδευση για 1-2 ώρες μέχρι να σχηματιστεί ένα διαυγές ομοιογενές υγρό[55]. Στη μέθοδο αυτή, η θέρμανση και η ανάδευση μπορούν να ενταθούν με χρήση μικροκυμάτων και παράλληλα, συχνά προστίθεται νερό ως τρίτη ένωση, προκειμένου να μειωθεί το ιξώδες και να προωθηθεί η υγροποίηση των στερεών οργανικών ενώσεων[37], [49], [57], [58], [60]
- ✓ Εξάτμιση υπό κενό, στην οποία τα συστατικά γνωστής μοριακής αναλογίας διαλύονται σε νερό και στη συνέχεια εξατμίζονται στους 50 °C, υπό μειωμένη πίεση, χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξάτμιστή και τελικά, διατηρούνται σε ξηραντήρα μέχρι να ληφθεί σταθερό βάρος
- ✓ Λυοφιλίωση, κατά την οποία τα συστατικά διαλύονται σε νερό με γνωστή αναλογία και στη συνέχεια, υποβάλλονται σε λυοφιλίωση μέχρι να σχηματιστεί ένα διαυγές παχύρρευστο υγρό[37], [49], [55], [57], [58].

Συνολικά, σύμφωνα με τη θερμική σταθερότητα των επιλεγμένων συστατικών, οι DES/NaDES θα πρέπει να παρασκευάζονται σε υψηλή θερμοκρασία, αλλά όχι μεγαλύτερη από 100 °C. Για την αποφυγή της επίδρασης της υψηλής θερμοκρασίας, έχει προταθεί μία διαφορετική μέθοδος παρασκευής των DES/NaDES, με χρήση της μεθόδου λειοτρίβησης, κατά την οποία δύο συστατικά αναμειγνύονται και αλέθονται σε θερμοκρασία δωματίου με γουδί, μέχρι να παραχθεί ένα ομοιογενές υγρό[55], [57].

Η παρασκευή του NaDES με θέρμανση και ανάδευση είναι η πιο κοινή μέθοδος στη βιβλιογραφία. Αυτή η μέθοδος δεν είναι μόνο οικονομική, αλλά παράλληλα επιτρέπει τον εύκολο έλεγχο της θερμοκρασίας στο σχηματισμό του NaDES, γεγονός που κρίνεται εξέχουσας σημασίας στην περίπτωση των θερμικά ασταθών συστατικών, όπως για παράδειγμα σε σάκχαρα[57].

Η μέθοδος σύνθεσης μπορεί να επιλεγεί με γνώμονα το κόστος, δηλαδή την επικράτηση χαμηλότερων θερμοκρασιών, την ταχύτητα ή την αποτελεσματικότητα, δηλαδή τη χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών ή και μεθόδων υψηλής ενέργειας (υπέρηχοι, μικροκύματα), ή τον περιορισμό από τις ιδιότητες των αντιδραστηρίων. Ένα τέτοιο παράδειγμα περιορισμού από τις ιδιότητες των αντιδραστηρίων είναι οι θερμοευαίσθητες ουσίες, οι οποίες ενδέχεται να απαιτούν λυοφιλίωση, αντί για θέρμανση και ανάδευση[37].

1.3.1.7 Σύγκριση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών και Ιοντικών Υγρών

Τα ιοντικά υγρά αποτελούν συντηγμένα άλατα, υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, των οποίων το τεράστιο δυναμικό προκύπτει από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των υγρών, δηλαδή από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (ιξώδες, πυκνότητα, υδροφιλία,

διαλυτότητα), οι οποίες μπορούν να συντονιστούν με το συνδυασμό διαφορετικών κατιόντων και ανιόντων. Τα IL έχουν βρει εφαρμογές σε διάφορους τομείς και εξυπηρετούν πολύ διαφορετικούς σκοπούς. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες για βιοκαταλυτικές διεργασίες, ως διαλύτες εκχύλισης, για ηλεκτροχημικές εφαρμογές κ.ο.κ. Ωστόσο, ο πράσινος χαρακτήρας των IL συχνά αμφισβητείται, κυρίως λόγω της κακής βιοαποικοδομησιμότητας, βιοσυμβατότητας και βιωσιμότητάς τους. Παράλληλα, είναι ακριβά και τοξικά και απαιτούν οργανικούς διαλύτες για τη σύνθεσή τους [37], [47], [49], [55], [58].

Τόσο τα ιοντικά υγρά, όσο και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι γνωστά ως νεοτερικοί διαλύτες. Τα IL και οι DES μπορούν να διαφοροποιηθούν ως προς τη σύνθεση και τη μέθοδο παρασκευής τους. Ένα IL αποτελείται από ένα κατιόν (οργανικό) και ένα ανιόν (ανόργανο), ενώ υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι DES που διαφέρουν ως προς τη σύνθεση. Η παρασκευή των IL περιλαμβάνει αραίωση των πρώτων υλών σε οργανικό διαλύτη, ακολουθούμενη από ανάμειξη, θέρμανση, ανάδευση και τέλος, διαχωρισμό και πλύση του στερεού υπολείμματος. Η παρασκευή των DES διαφέρει από αυτή των IL και παρουσιάζεται σε προηγούμενη ενότητα (§1.3.1.6) [55], [58].

Ανταγωνιζόμενα με τα ιοντικά υγρά, οι DES ευνοούνται, καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό φθηνότεροι στην παραγωγή, λιγότερο τοξικοί και προσφέρουν μεγάλη ποικιλία. Οι NaDES αποτελούν τα μετέπειτα βήματα των ιοντικών υγρών, διότι μπορούν να σχηματιστούν από πράσινες πηγές, μπορεί να είναι πολικοί ή μη πολικοί, υδρόφιλοι ή υδρόφοβοι και μπορούν να προσαρμοστούν σε οποιαδήποτε κατάσταση [37].

	ionic liquids	deep eutectic solvents
Distinguished Characterizations		
constituent	salt	salt, sugar, organic acid, amino acid, etc.
composition	single salt	mixture
intermolecular force	ionic bonding	hydrogen bonding
molecular force	strong	weak
free energy content		1–5 kcal/mol
intermolecular distance	<1.2 Å	2–5 Å
conductivity	often moderate to poor	
vapor pressure	low	low
cytotoxicity	positive for many	hard to detect
Identical Characterizations		
melting point	below arbitrary temperature, e.g., 100 °C, and some are liquid at or below room temperature	
viscosity	positive linear correlation with temperature	
solvating properties	a range of polar and nonpolar compounds	
mobility	depends on the size of mobile species and the availability of holes of appropriate dimensions	

Σχήμα 7: Σύγκριση ιδιοτήτων ιοντικών υγρών και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών [53].

1.3.1.8 Πλεονεκτήματα των Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτημάτων των NaDES, όπως:

- ✓ αμελητέα πτητικότητα,
- ✓ μη ευφλεκτότητα,
- ✓ ικανότητα διάλυσης ποικίλων ενώσεων,
- ✓ χημική και θερμική σταθερότητα,
- ✓ ρυθμιζόμενο ιξώδες,
- ✓ παραμονή σε υγρή κατάσταση σε ευρεία κλίμακα θερμοκρασιών.

Παράλληλα, οι NaDES παρασκευάζονται με φθηνές, απλές και ταχείες διαδικασίες, δίνοντας προϊόντα υψηλής καθαρότητας και χωρίς τη δημιουργία απορριμμάτων. Κύριο πλεονέκτημά τους είναι ότι συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες και εμφανίζουν σημαντικά χαμηλή τοξικότητα [37], [47], [51], [52], [56]–[58].

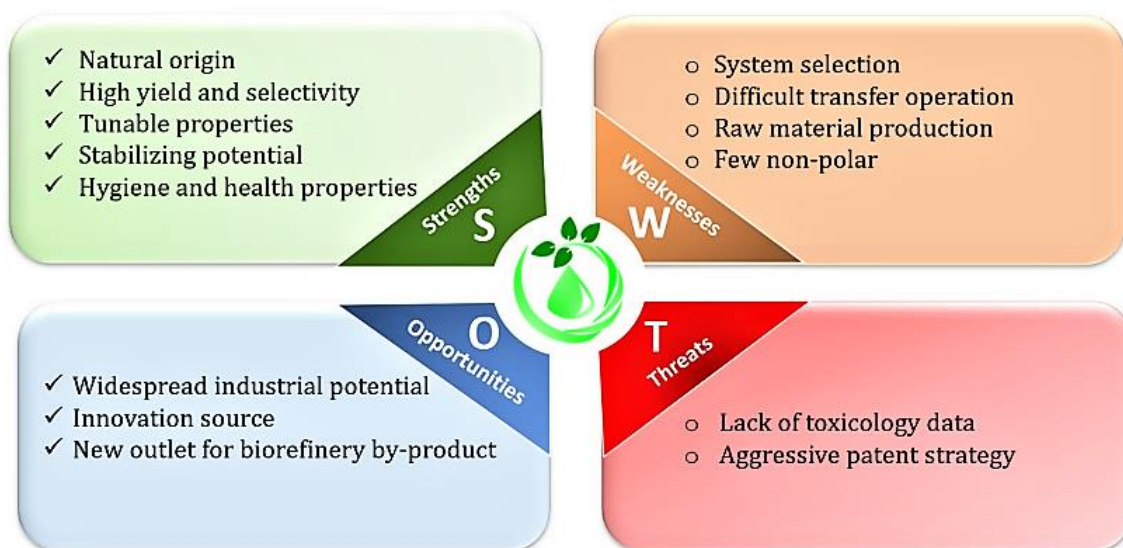
1.3.1.9 Ανάλυση Δυνατών σημείων, Αδυναμιών, Ευκαιριών και Απειλών (SWOT) για τους Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Η ανάλυση SWOT αποτελεί ένα εργαλείο στρατηγικού σχεδιασμού για εξέταση, διερεύνηση και προσδιορισμό διαφορετικών παραγόντων που μπορεί να έχουν αρνητικό ή θετικό αντίκτυπο στην αναλυόμενη διαδικασία.

- Πλεονεκτήματα των NaDES: Οι NaDES απεικονίζονται ως βιώσιμοι, χαμηλού κόστους και βιοαποικοδομήσιμοι διαλύτες, λόγω της φυσικής προέλευσης των συστατικών τους. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των NaDES είναι πρωτογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται συνήθως σε τρόφιμα, καλλυντικά ή φαρμακευτικά προϊόντα. Πολυάριθμες μελέτες έδειξαν υψηλότερες επιδόσεις εκχύλισης, ως προς την απόδοση και την εκλεκτικότητα, των NaDES σε σύγκριση με συμβατικούς διαλύτες, και μία ενισχυμένη σταθερότητα των βιοενώσεων, τόσο κατά την εκχύλιση, όσο και κατά την αποθήκευση. Παράλληλα, οι NaDES είναι συμβατοί με σύγχρονες διαδικασίες εκχύλισης, όπως εκχύλιση με υπερήχους ή μικροκύματα. Τέλος, έχουν σχεδόν μηδενική τάση ατμών, γεγονός που συνεπάγεται λιγότερη ατμοσφαιρική ρύπανση.
- Αδυναμίες των NaDES: Σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη και την ευρεία χρήση των NaDES είναι η μεγάλη ποικιλία των υπαρχόντων συστημάτων και η χαμηλή διαθεσιμότητα εργαλείων πρόβλεψης επιλογής. Συνήθως, απαιτείται τεχνογνωσία για την επιλογή ενός NaDES, χωρίς εκτεταμένο προκαταρκτικό έλεγχο. Παράλληλα, βασική αδυναμία των διαλυτών αυτών είναι πως μόνο λίγοι από αυτούς είναι αφιερωμένοι σε μη πολικούς μεταβολίτες, παρά την επείγουσα ανάγκη για πιο πράσινες εναλλακτικές λύσεις. Επιπρόσθετα, η πυκνότητα και το ιξώδες αποτελούν ιδιότητες που θα μπορούσαν να

αποτελέσουν εμπόδιο και να διαταράξουν τη μεταφορά, περιορίζοντας έτσι τη βιομηχανική εφαρμογή.

- Ευκαιρίες των NaDES: Οι μοναδικές φυσικές ιδιότητες των NaDES μπορούν να οδηγήσουν σε καινοτόμες διαδικασίες ή προσεγγίσεις για την άρση των σημερινών τεχνολογικών φραγμών που περιορίζουν τη βιομηχανική εξάπλωσή τους. Ταυτόχρονα, η αυξανόμενη ζήτηση για πρώτη ύλη NaDES αποτελεί μία νέα διέξοδο για υποπροϊόντα, η οποία θα τονώσει την ανάπτυξη διαδικασίας του βιοδυλιστηρίου.
- Απειλές των NaDES: Η απουσία ή η έλλειψη δεδομένων σχετικά με τις πραγματικές τοξικολογικές επιπτώσεις των NaDES αποτελεί εξέχουσα απειλή για τη χρήση τους, ιδιαίτερα στον κλάδο της υγείας. Παρότι οι NaDES είναι λιγότερο τοξικοί από τους συμβατικούς διαλύτες, αυτό δεν αποτελεί απόδειξη ότι δεν μπορούν να παρουσιάσουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, ειδικά όσον αφορά τη χρόνια χρήση. Μία ακόμα σημαντική απειλή αφορά το γεγονός ότι οι περισσότεροι συνδυασμοί και εφαρμογές των NaDES κατοχυρώνονται με διπλώματα ευρεσιτεχνίας και νέα διπλώματα ευρεσιτεχνίας δημοσιεύονται κάθε μήνα[54].



Σχήμα 8: Ανάλυση SWOT για τους φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες[54].

1.3.1.10 Προοπτικές των Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Τις τελευταίες δεκαετίες η έννοια «πράσινο» απέκτησε μία νέα σημασία στη χημεία. Ο ορισμός της αειφόρου ανάπτυξης και της Πράσινης Χημείας αλλάξαν το τρόπο σκέψης διαδικασιών και μεθόδων. Κρίσιμο σημείο αποτελεί η αναζήτηση εναλλακτικής λύσης για τους παραδοσιακούς διαλύτες, λόγω της χαμηλής βιοαποικοδομησιμότητάς τους, της υψηλής τους τοξικότητας και του κόστους τους. Οι NaDES παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων, τα οποία αναφέρονται σε προηγούμενη υποενότητα (§1.3.1.8), με βασικότερα από αυτά την απλή, φιλική προς το περιβάλλον και φθηνή προετοιμασία.

Επί του παρόντος, η χρήση των NaDES ως διαλύτες εκχύλισης για φαινολικές ενώσεις είναι η πιο μελετημένη εφαρμογή τους, συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη και τις ικανότητες σταθεροποίησης και το «ταλέντο» εκχύλισης, αυτοί οι διαλύτες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας για τα επόμενα χρόνια. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αναφορές για την εφαρμογή των διαλυτών αυτών σε διεργασίες διαχωρισμού, επομένως, οι διαχωρισμοί αποτελούν ένα πεδίο μελλοντικής έρευνας[49]. Πιο αναλυτικά, οι προοπτικές των NaDES απαριθμούνται παρακάτω.

- ✓ Τα τελευταία χρόνια οι NaDES αποτελούν εξέχον θέμα στα καλλυντικά, καθώς η χρήση τους ως διαλύτες εκχύλισης ανοίγει το εύρος των επιλογών σε μία εντυπωσιακή σειρά νέων τύπων εκχυλισμάτων με βελτιωμένες βιοδραστικότητες και ενδιαφέρουσες ιδιότητες για τη σύνθεσή τους σε προϊόντα περιποίησης δέρματος. Αναμένεται, λοιπόν, στο άμεσο μέλλον να αναπτυχθούν πολυάριθμες νέες εφαρμογές NaDES στη βιομηχανία καλλυντικών.
- ✓ Ένας άλλος τομέας εφαρμογής είναι τα τρόφιμα, ιδιαίτερα σε γεύσεις και αρώματα, δεδομένης της χαμηλής διαλυτότητάς τους. Οι NaDES μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη αρωμάτων και αρωματικών εκχυλισμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των διαλυτών, τόσο για τις καλλυντικές, όσο και για τις εφαρμογές τροφίμων, είναι η αυξημένη σταθερότητα των ενώσεων που υφίστανται στα εκχυλίσματα NaDES, με συνέπεια την πιθανή αποφυγή της χρήσης συντηρητικών.
- ✓ Οι φαρμακευτικές εφαρμογές δεν είναι ακόμα ευρέως κοινές, αν και η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων στους NaDES έχει αποδειχθεί και αξίζει περαιτέρω έρευνα. Η αυξημένη διαλυτότητα πληθώρας φαρμάκων σε NaDES μπορεί να επιτρέψει την επέκταση του εύρους των καμπυλών δόσης-απόκρισης. Το παραπάνω αποτελεί βάση για την ανάπτυξη νέων σκευασμάτων και όλες αυτές οι εφαρμογές απευθύνονται σε μικρά μόρια με ενδιαφέρουσες ιδιότητες που είναι δύσκολο να διαλυτοποιηθούν.
- ✓ Το γεγονός ότι οι NaDES είναι πιθανώς σημαντικοί σε μία ποικιλία διεργασιών σε κύτταρα και οργανισμούς αποτελεί πηγή έμπνευσης για τη διερεύνηση διαφόρων εφαρμογών. Μεταξύ αυτών, η μεγάλη ικανότητα διαλυτοποίησης των μακρομορίων φαίνεται να είναι ένα από τα πιο ελκυστικά χαρακτηριστικά τους. Οι NaDES θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη φύση ως μέσα στα οποία μπορούν να συμβούν διάφορα βιοσυνθετικά στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν αδιάλυτες στο νερό πρόδρομες ενώσεις. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι οι NaDES μπορούν να εφαρμοστούν σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν βιομετατροπές με διάφορα ένζυμα. Περαιτέρω μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση θα παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς με υψηλότερα επίπεδα πρόδρομων ουσιών σε διάλυμα, η κινητική του ενζύμου θα ήταν διαφορετική[47]–[49], [54], [55], [57], [58], [60].

1.3.1.11 Εφαρμογές Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι NaDES προσφέρουν ατελείωτες ευκαιρίες στην ανάπτυξη μεθόδων, με προοπτικές βελτίωσης σε διαφορετικά βήματα και υποστάδια της συνολικής αναλυτικής διαδικασίας. Βρίσκουν εφαρμογή σε πληθώρα ερευνητικών πεδίων, ιδίως ως διαλύτες για εκχύλιση και σύνθεση, αλλά και για βιοκατάλυση, διαχωρισμό αερίων, στην επιστήμη των υλικών και στην ηλεκτροχημεία[49]. Πιο συγκεκριμένα, παραδείγματα εφαρμογών NaDES είναι η εκχύλιση δραστικών ενώσεων από φαρμακευτικά φυτά, η διαλυτοποίηση φαρμακευτικών προϊόντων, η παραγωγή φυτικών εκχυλισμάτων ως συστατικά καλλυντικών, οι αγροχημικές εφαρμογές κ.ο.κ [48], [49]. Ορισμένες από τις κυριότερες εφαρμογές των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών απαριθμούνται παρακάτω.

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

Η βιομετατροπή με χρήση ενζύμων έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ως μέρος της ανάπτυξης πιο οικολογικών διαδικασιών. Ο εξαιρετικά εκλεκτικός χαρακτήρας και η ισχυρή καταλυτική ικανότητα των ενζύμων συνδυάζεται με την ικανότητά τους να ανανεώνονται και τη βιοαποικοδομησιμότητά τους, καθώς και την ικανότητά τους να λειτουργούν σε ήπιες συνθήκες λειτουργίας (θερμοκρασία περιβάλλοντος, χαμηλή πίεση και ουδέτερο pH). Το κύριο εμπόδιο για την ευρεία χρήση των ενζύμων είναι η χαμηλή παραγωγικότητα και η σταθερότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι πιο συνήθεις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της σταθερότητας του ενζύμου είναι οι χημικές τροποποιήσεις ή η ακινητοποίηση σε στερεά υποστρώματα, που όμως αυτές οι τεχνικές απαιτούν συχνά μη βιώσιμα συνθετικά αντιδραστήρια[54]. Το πρώτο ένζυμο, το οποίο μελετήθηκε ως προς τη θερμοσταθερότητά του σε υδατικά μέσα NaDES ήταν η λακκάση, η οποία βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές ως πράσινος καταλύτης σε πολλαπλά πεδία[54], [58].

Μέχρι σήμερα είναι ελάχιστες οι αναφορές που έχουν πραγματοποιηθεί στην εισαγωγή των NaDES σε συστήματα βιοκαταλυτικής αντίδρασης. Οι αναφορές που έχουν ήδη γίνει διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτές που αφορούν σύστημα ελεύθερου ενζύμου και σε αυτές που αφορούν σύστημα ολόκληρων κυττάρων[58].

Έπειτα από μελέτες, οι οποίες ξεκίνησαν το 2011, έχει γίνει γνωστό πως η προσθήκη NaDES επιδρά τόσο στη δραστικότητα, όσο και στη σταθερότητα του ενζύμου, ανάλογα με την επιλογή και το περιεχόμενο αυτού. Παράλληλα, είναι γνωστό πως ορισμένοι NaDES έχουν τη δυνατότητα να επιταχύνουν ενζυμικές αντιδράσεις, αυξάνοντας τις σταθερές K_m και k_{cat} . Αναφορικά με τη σταθερότητα, αυτή αυξάνεται έπειτα από την προσθήκη NaDES, και μάλιστα, σε ορισμένες μελέτες αυτή γίνεται διπλάσια. Συνεπώς, η προσθήκη NaDES αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο σταθεροποίησης του ενζύμου, το οποίο είναι εξαιρετικά ευεργετικό για τις κλινικές εφαρμογές[58].

Το αντίκτυπο των NaDES στην ενζυματική απόδοση μπορεί να ποικίλλει από ένζυμο σε ένζυμο, ανάλογα με διάφορους παράγοντες, όπως η δομή της πρωτεΐνης και του καταλυτικού μηχανισμού. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελούν ευρήματα προκαταρκτικών ερευνών και ενώ τυπικά υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ της δραστηριότητας και της σταθερότητας του ενζύμου και της προσθήκης NaDES, αναμφίβολα χρειάζεται να γίνουν περισσότερες έρευνες, ώστε να προκύψει κάποιο

συμπέρασμα σχετικά με το πως οι NaDES επηρεάζουν την ενζυματική απόδοση [47], [48], [58].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η βιομάζα είναι μία ευρεία κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει όλα τα οργανικά υλικά, φυτικά ή ζωικά. Σε γενικότερους όρους, ως βιομάζα ορίζεται το βιολογικό υλικό το οποίο λαμβάνει πολλαπλές μορφές: ολόκληρος οργανισμός, όργανο, παραπροϊόν ή υποπροϊόν[54]. Η λιγνινοκυτταρινική βιομάζα είναι η πιο άφθονη διαθέσιμη πρώτη ύλη στη Γη για παραγωγή βιοκαυσίμων και κυρίως βιοαιθανόλης. Αποτελείται από πολυμερή υδατανθράκων (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη) και ένα φαινολικό πολυμερές (λιγνίνη). Η προεπεξεργασία της λιγνινοκυτταρινικής βιομάζας είναι ένα προαπαιτούμενο βήμα και ο διαχωρισμός της λιγνίνης από την κυτταρίνη και τα κλάσματα ημικυτταρίνης είναι κρίσιμος για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες συχνά περιλαμβάνουν τη χρήση οργανικών διαλυτών, που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήρια και στη βιομηχανία, και οι οποίοι θέτουν σημαντικές ανησυχίες για θέματα ασφάλειας, υγείας και μόλυνσης του περιβάλλοντος. Οι NaDES έχουν δοκιμαστεί ως διαλύτες για λιγνίνη, άμυλο και κυτταρίνη και η διαλυτότητα αυτών μπορεί να προσαρμοστεί επιλέγοντας προσεκτικά τη φύση και την αναλογία των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του NaDES. Η προεπεξεργασία της βιομάζας με NaDES έχει πλεονεκτήματα όπως η μη απαίτηση του βήματος αποτοξίνωσης μετά τη διαδικασία, καθώς δεν παράγονται προϊόντα αποικοδόμησης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στο συνολικό κόστος της διαδικασίας [58]. Παράλληλα, οι NaDES που χρησιμοποιούνται στη διεργασία μπορούν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν, γεγονός που τους καθιστά ικανούς να ενσωματωθούν σε μία βιώσιμη διαδικασία βιοδιυλιστηρίου[54], [57].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΕ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑ

Η διαλυτοποίηση των μακρομορίων αποτελεί εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία. Ωστόσο, ορισμένοι NaDES έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι διαλύουν πολύ αποτελεσματικά πολυσακχαρίτες, DNA, RNA ή πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων[48].

Στο παρελθόν είχε μελετηθεί η χρήση ιοντικών υγρών και βαθέως ευτηκτικών διαλυτών για τη διάλυση πολυμερών. Η κυτταρίνη, το πιο άφθονο πολυμερές στη Γη, είναι αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους διαλύτες. Λόγω αυτού, η διαλυτοποίησή της σε ιοντικά υγρά και βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες έχει αποτελέσει αντικείμενο πληθώρας μελετών[48].

Παράλληλα, οι NaDES έχουν δοκιμαστεί και για τη διάλυση νουκλεοτιδίων. Έχουν διεξαχθεί μελέτες για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης RNA σε υδατικό διφασικό σύστημα, συνδυασμένο με βαθέως ευτηκτικό διαλύτη. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί η υψηλή διαλυτότητα και σταθερότητα του DNA σε DES που αποτελείται από χλωριούχο χολίνη με γλυκερόλη και αιθυλενογλυκόλη. Προκαταρκτικά αποτελέσματα μελετών έχουν αποκαλύψει πως οι NaDES έχουν μεγάλες δυνατότητες ως μέσα αποθήκευσης δειγμάτων DNA και RNA[48].

Τέλος, οι NaDES έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διαλυτοποίηση ή τη σταθεροποίηση πρωτεϊνών. Παράδειγμα αυτού αποτελεί ο προσδιορισμός της

γλουτένης, η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά μπορεί να διαλυτοποιηθεί σε NaDES φρουκτόζη-κιτρικό οξύ. Εκτός από τη διαλυτοποίηση της γλουτένης, ο NaDES εμπόδιζε και την οξείδωση αυτής[48].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η αντιβακτηριακή φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία μορφή φωτοθεραπείας για βακτηριακή μόλυνση, που περιλαμβάνει φως και μια φωτοευαισθητοποιητική χημική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μοριακό οξυγόνο για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Ο συνδυασμός NaDES με φωτοευαισθητοποιητές, αντί της διαμόρφωσης αυτών σε υδατικά παρασκευάσματα, έχει δείξει ότι μπορεί να ενισχύσει σημαντικά τη φωτοτοξικότητά τους έναντι των βακτηριακών κυττάρων[58].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ

Τα τελευταία χρόνια, τα ιοντικά υγρά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ηλεκτροχημική ανάλυση λόγω της μοναδικότητας των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής ιοντικής αγωγιμότητας, των ευρύτερων ηλεκτροχημικών παραθύρων, του χαμηλού κόστους και της φιλικότητας προς το περιβάλλον. Πρόσφατα, οι DES έχουν επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία στον τομέα αυτό. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES είναι παρόμοιες με αυτές των ιοντικών υγρών και ως εκ τούτου, αυτοί βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών στην ηλεκτροχημεία.

Μία ιδιαίτερη εφαρμογή στο πεδίο αυτό είναι η ηλεκτροαπόθεση μετάλλων, η οποία μπορεί να ωφεληθεί από την υψηλή διαλυτότητα των μεταλλικών αλάτων σε μη υδατικά διαλύματα και την υψηλή αγωγιμότητα των ιοντικών υγρών και των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Οι NaDES με βάση τη χλωριούχο χολίνη έχουν αξιολογηθεί επιτυχώς για την ηλεκτροαπόθεση διαφορετικών μετάλλων και κραμάτων και για την ενίσχυση των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων[49].

Μία άλλη εφαρμογή των NaDES είναι η χρήση τους ως ενισχυτικοί παράγοντες για την ηλεκτροχημική ανίχνευση βιοδραστικών υλικών, όπως οι πολυφαινόλες. Η μέθοδος με χρήση NaDES παρουσιάζει πλεονεκτήματα όπως η βιωσιμότητα, η απλότητα, η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος και η καλή σταθερότητα[58].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Τα προϊόντα που προάγουν την υγεία, όπως τα θρεπτικά και τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα συμπληρώματα διατροφής, λαμβάνονται με εκχύλιση με διαλύτες από φυτά και είναι ευρέως διαδεδομένα. Ωστόσο, υπάρχουν δύο βασικά ζητήματα που δημιουργούν ανησυχία: η ασφάλεια του διαλύτη και η βιοδιαθεσιμότητα του προϊόντος[58]. Αναφορικά με την ασφάλεια, λόγω της ευελιξίας, της μη τοξικότητας και της βιοαποικοδομησιμότητάς τους, οι NaDES έχουν ήδη βρει εφαρμογή στο βιοϊατρικό τομέα. Είναι γνωστό πως οι NaDES μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα, τη διείσδυση και την απορρόφηση μοντέλων φαρμάκων. Ο συνδυασμός NaDES με βιοενεργά μόρια, όπως η ιβουπροφαίνη και η μενθόλη, με βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές φυσικής βάσης και υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, είναι μία βιώσιμη εναλλακτική λύση για την παραγωγή συστημάτων χορήγησης φαρμάκων και για άλλες βιοϊατρικές εφαρμογές[47]. Παράλληλα, προκαταρκτικές μελέτες έχουν καταδείξει ήδη τη δυνατότητα χρήσης NaDES ως παράγοντα διαλυτοποίησης και σύνθεσης για

την αύξηση της απορρόφησης των ελάχιστα βιοδιαθέσιμων φυσικών προϊόντων[58]. Η μεγάλη διαλυτοποιητική ισχύς και η εγγενής έλλειψη τοξικότητας επέτρεψε στους NaDES να εισαχθούν και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η ιδέα ανάπτυξης νέων σκευασμάτων χρησιμοποιώντας NaDES ως έκδοχα, που ενισχύουν τη διαλυτότητα, φαίνεται πολλά υποσχόμενη[48], [53], [58].

❖ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Στο πλαίσιο της Πράσινης Χημείας, η οικολογική εκχύλιση υιοθετεί αυτές τις αρχές στοχεύοντας όλο και περισσότερο σε φυσικά εκχυλίσματα, για την ενίσχυση τόσο των πρωτογενών, όσο και των δευτερογενών μεταβολιτών. Η εκχύλιση φυσικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας, η οποία περιέχει πολλά επιμέρους στάδια, με συμπεριλαμβανόμενα την προεπεξεργασία που διεξάγεται πριν την εκχύλιση, και την επεξεργασία που ακολουθεί την εκχύλιση. Τα στάδια αυτά καταναλώνουν χρόνο, ενέργεια και διαλύτες και παράγουν σημαντική ποσότητα αποβλήτων. Παράλληλα, ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης, το εκχύλισμα μπορεί να είναι μολυσμένο, μετουσιωμένο ή να περιέχει υπολείμματα διαλύτη, μειώνοντας έτσι την ασφάλειά του. Λόγω όλων των παραπάνω, η οικολογική εκχύλιση, η οποία ορίζεται ως ο σχεδιασμός και η χρήση διεργασιών με μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και με χρήση εναλλακτικών και ανανεώσιμων διαλυτών, κρίνεται εξέχουσας σημασίας, ώστε να διασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα εκχυλίσματος και ταυτόχρονα, η ασφάλεια αυτού[54].

Οι NaDES αποτελούν πράσινους διαλύτες με ικανότητα χρήσης τους ως παράγοντες σταθεροποίησης και ενδιαφέρουσες προοπτικές για την εκχύλιση. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, που αναφέρονται και σε προηγούμενες ενότητες, όπως η αμελητέα πτητικότητα, το ρυθμιζόμενο ιξώδες, η βιωσιμότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα, καθώς και η υψηλή ισχύς διαλυτοποίησης, τόσο των πολικών, όσο και των μη πολικών ενώσεων, τα καθιστούν εξαιρετική επιλογή για χρήση ως διαλύτες εκχύλισης, με μεγάλες δυνατότητες στην εκχύλιση πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών φυτών για την άμεση εφαρμογή τους σε φαρμακευτικά, καλλυντικά σκευάσματα, καθώς και ως πρόσθετα τροφίμων[47], [49], [53], [58].

Οι NaDES έχουν εφαρμοστεί κυρίως για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων, και η εκχύλιση διαφόρων χρωστικών ουσιών, καροτενοειδών και φλαβονοειδών είναι τα αντικείμενα μελέτης πολλών ερευνών. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των NaDES είναι η δυνατότητα παραγωγής εξατομικευμένων διαλυτών, συμβατών με τη χημική φύση των υπό μελέτη αναλυτών[47], [49].

❖ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ NaDES

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 1223/2009, ως καλλυντικό προϊόν ορίζεται κάθε ουσία ή μίγμα που προορίζεται να τεθεί σε επαφή με τα εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, μαλλιά, νύχια, χείλη) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, με σκοπό αποκλειστικά ή κυρίως τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, την αλλαγή της εμφάνισής τους, την προστασία τους, τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση των οσμών του σώματος[60].

Την τελευταία δεκαετία, με την αυξανόμενη περιβαλλοντική ευαισθητοποίηση και την εκπαίδευση των καταναλωτών, κυρίως λόγω των ψηφιακών τεχνολογιών και των

κοινωνικών δικτύων, η ζήτηση για φυσικά καλλυντικά έχει αυξηθεί σημαντικά. Αποτέλεσμα αυτού αποτελεί η πίεση στη βιομηχανία για την παροχή πιο βιώσιμων πρώτων υλών φυσικής προέλευσης. Δεδομένου του ευρέος φάσματος συστατικών που απαιτούνται για τη σύνθεση καλλυντικών (έλαια, μαλακτικά, επιφανειοδραστικά, συντηρητικά, παράγοντες υφής, χρωστικές ουσίες, αρώματα), η πρόκληση για μια πράσινη μετάβαση είναι τεράστια[60].

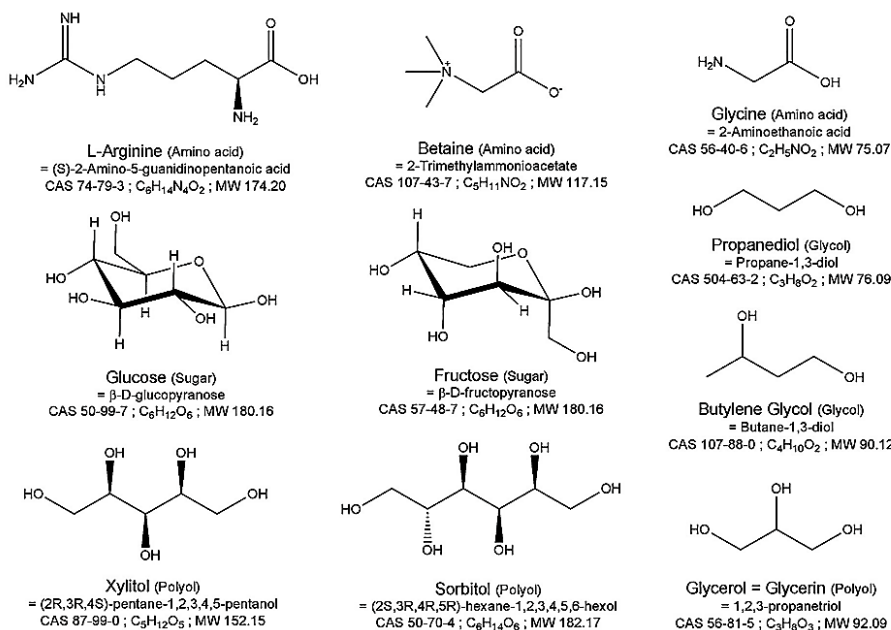
Η πράσινη πρόκληση δεν είναι τόσο εφικτή, όσο πιθανή και αν φαίνεται. Μέχρι πρόσφατα, μία φυσικής προέλευσης πρώτη ύλη ήταν αρκετή για να χαρακτηριστεί ένα βοτανικό εκχύλισμα ως «φυσικό». Ωστόσο, οι προσδοκίες έχουν γίνει πολύ μεγαλύτερες και η φυσικότητα ενός εμπορικά διαθέσιμου εκχυλίσματος φυτού πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως σύνολο πρώτης ύλης, τύπου καλλιέργειας, οικολογικού σχεδιασμού, διαλυτών βιολογικής βάσης και συντηρητικών[60].

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν μία βιώσιμη εναλλακτική λύση των παραδοσιακών διαλυτών. Οι ιδιότητες αυτών των διαλυτών μπορούν να προσαρμοστούν με την προσθήκη νερού, και παράλληλα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες εκχύλισης, αντικαθιστώντας τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, χάρη στο υψηλό δυναμικό εκχύλισης και την καλή σταθερότητα. Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλία των συστατικών που μπορούν να εισέλθουν στην προετοιμασία των NaDES, και γενικότερα των DES, οι προοπτικές που προσφέρουν αυτά τα μίγματα για την ανάπτυξη νέων βιομηχανικών διεργασιών εκχύλισης είναι εντυπωσιακές. Παρατίθενται εκατοντάδες μίγματα που χρησιμοποιούνται για την επιτυχή εκχύλιση πολλών τύπων ενώσεων διαφορετικής πολικότητας, όπως φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, στιλβένια, ταννίνες, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, φλαβόνες, λιγνάνες ή τοκοφερόλες[60].

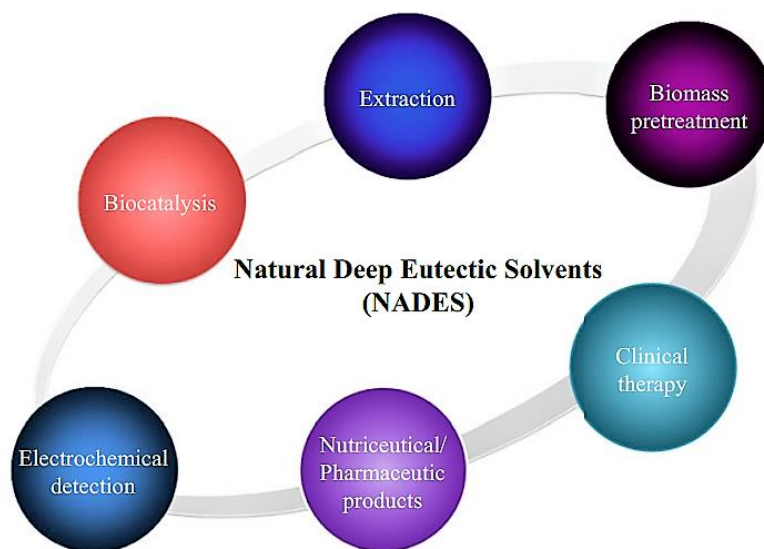
Αξίζει να σημειωθεί πως, η χρήση της χλωριούχου χολίνης, η οποία εμφανίζεται ως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ένωση για σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, και των παραγώγων της, απαγορεύεται στα καλλυντικά στην Ευρώπη, βάσει του Ευρωπαϊκού κανονισμού για τα καλλυντικά ΕΚ αριθ. 1223/2009. Συνεπώς, κανένα μίγμα διαλυτών που περιέχει χλωριούχο χολίνη δεν μπορεί να βρει χρήση ως διαλύτης εκχύλισης για εκχυλίσματα καλλυντικών φυτών. Σε αυτό το πλαίσιο, υπάρχει ανάγκη σχεδιασμού νέων μιγμάτων NaDES συμβατών με καλλυντικές εφαρμογές και αξιολόγησης της απόδοσης εκχύλισης φυτών σε σύγκριση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες[60].

Για τη χρήση των NaDES σε καλλυντικές εφαρμογές, αυτοί οι διαλύτες πρέπει να πληρούν, αφενός τις αρχές της Πράσινης Χημείας και, αφετέρου να συμμορφώνονται με τους βιομηχανικούς περιορισμούς. Οι λέξεις-κλειδιά στο πλαίσιο αυτό είναι το μοναδικό φυτοχημικό προφίλ και η απόδοση εκχύλισης, τουλάχιστον ισοδύναμη με αυτή των συμβατικών διαλυτών. Αρχικά, οι ουσίες που χρησιμοποιούνται χρειάζεται να επιτρέπονται για καλλυντική χρήση και επομένως, κατά κύριο λόγο δεν πρέπει να εμφανίζονται στο Παράρτημα II του Ευρωπαϊκού Κανονισμού Καλλυντικών ΕΚ αριθ. 1223/2009. Έπειτα, οι ουσίες αυτές θα πρέπει να έχουν βιολογική βάση και να είναι διαθέσιμες σε λογικό κόστος σε βιομηχανική κλίμακα. Παράλληλα, οι διαλύτες οφείλουν να επιδεικνύουν χαρακτηριστικά των μιγμάτων NaDES, δηλαδή υπερμοριακή δομή. Ακόμη, τα μίγματα απαιτείται να έχουν χαμηλό ή ρυθμιζόμενο

ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτρέπεται η ομοιογενής διασπορά του φυτικού υλικού και ο εύκολος διαχωρισμός στερεού/υγρού. Δεν μπορεί να παραληφθεί το γεγονός ότι αυτά τα μίγματα πρέπει να επιδεικνύουν μακροπρόθεσμη σταθερότητα, συμπεριλαμβανομένης της μικροβιακής σταθερότητας, μόνα τους ή συνδυαστικά με συστήματα «πράσινων» συντηρητικών. Φυσικά, οι διαλύτες θα πρέπει να είναι συμβατοί με τις κλασικές συνθέσεις καλλυντικών όπως λοσιόν, κρέμες ή τζελ. Τέλος, είναι εξέχουσας σημασίας να παρουσιάζουν εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας[60].



Σχήμα 9: Φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή NaDES με στόχο τη χρήση σε καλλυντικές εφαρμογές[60].



Σχήμα 10: Εφαρμογές βαθέως εντηκτικών διαλυτών[58].

1.4 ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Τα καλλυντικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για την προστασία του δέρματος από εξωγενείς και ενδογενείς επιβλαβείς παράγοντες και ενισχύουν την ομορφιά και την ελκυστικότητα του δέρματος. Η χρήση καλλυντικών, όχι μόνο αναπτύσσει μία ελκυστική εξωτερική εμφάνιση, αλλά παράλληλα, βοηθά στην επίτευξη της μακροζωίας και τη μείωση των δερματικών παθήσεων. Τα συνθετικά ή φυσικά συστατικά που υφίστανται στη σύνθεση περιποίησης του δέρματος, τα οποία υποστηρίζουν την υγεία, την υφή και την ακεραιότητα του δέρματος, ενυδατώνουν το δέρμα και διατηρούν την ελαστικότητά του, μέσω της μείωσης του κολλαγόνου τύπου I και μέσω της φωτοπροστασίας που προκαλούν. Αυτές οι ιδιότητες των καλλυντικών οφείλονται στην παρουσία συστατικών που συμβάλλουν, τόσο στη μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών στο δέρμα, όσο και στη διαχείριση των ιδιοτήτων του δέρματος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα καλλυντικά προϊόντα αποτελούν τη βέλτιστη επιλογή για τη μείωση των δερματικών διαταραχών, όπως η υπερμελάγχρωση, η γήρανση του δέρματος, οι ρυτίδες του δέρματος και η τραχιά υφή αυτού. Ακόμη, η ζήτηση φυτικών καλλυντικών επεκτείνεται ταχύτατα, λόγω της διαθεσιμότητας νέων συστατικών, της ζήτησης των καταναλωτών και της καλύτερης κατανόησης της φυσιολογίας του δέρματος. Τα φυτικά μέρη, τα οποία χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά παρασκευάσματα, οφείλουν να παρουσιάζουν ποικίλες ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντισηπτικές, μαλακτικές, αντιβακτηριδιακές κ.ο.κ. Τέλος, τα φυτικά προϊόντα παρατηρείται ότι παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες, από τις αντίστοιχες που παρατηρούνται σε προϊόντα που περιέχουν συνθετικούς παράγοντες[61].

1.4.1 ΚΡΕΜΕΣ

Μία μορφή καλλυντικών προϊόντων αποτελούν οι κρέμες. Οι κρέμες είναι στερεά ή ημιστερεά γαλακτώματα (w/o ή o/w), τα οποία περιέχουν μίγματα ελαίου και νερού και η ομογενοποίηση των οποίων επιτυγχάνεται με χρήση κατάλληλων γαλακτωματοποιητών. Τα γαλακτώματα είναι κινητικά σταθεροποιημένα, αλλά θερμοδυναμικά ασταθή διεσπαρμένα συστήματα, τα οποία ορίζονται ως μικροσκοπικές διασπορές υγρών σταγονιδίων που περιέχονται σε άλλο υγρό, με διάμετρο η οποία κυμαίνεται από 0.5 έως 100 μm . Η πλειοψηφία των γαλακτωμάτων αποτελείται από δύο κύρια υγρά. Ωστόσο, ορισμένα συστήματα είναι πιθανό να περιέχουν και στερεά σωματίδια μέσα τους.

Ένα γαλάκτωμα σχηματίζεται όταν δύο μη αναμιξίμα υγρά, συνήθως το ένα λιπόφιλης και το άλλο υδρόφιλης φύσης, αναδεύονται μηχανικά. Κατά τη διαδικασία ανάδευσης, και τα δύο υγρά τείνουν να σχηματίζουν φάσεις. Κατά την προσθήκη ενός επιφανειοδραστικού στοιχείου στο σύστημα, αυτό τείνει να σταθεροποιηθεί, σχηματίζοντας μία συνεχή και μία διασκορπισμένη φάση, με την τελευταία να παρουσιάζει σχήμα σταγονιδίων. Όσο διαρκεί η προαναφερθείσα διαδικασία ανάδευσης, σχηματίζονται σταγονίδια και στις δύο φάσεις, με τις συνεχείς φάσεις να σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της μεγάλης αστάθειας εντός των σταγονιδίων. Η

συνεχής φάση είναι γνωστή ως εξωτερική φάση και περιβάλλει τη διεσπαρμένη, εσωτερική, φάση στο σύστημα. Ανάλογα με τη φύση των σχηματισμένων σταγόνων, τα γαλακτώματα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Γαλακτώματα ελαίου σε νερό (oil in water, o/w)
- Γαλακτώματα νερού σε έλαιο (water in oil, w/o)
- Γαλακτώματα ελαίου σε έλαιο (oil in oil, o/o).

Παράλληλα, υπάρχουν και τα πολλαπλά γαλακτώματα, μέσα στα οποία τα διασπαρμένα σωματίδια αποτελούν τα ίδια γαλακτώματα. Παράδειγμα αυτού του τύπου γαλακτώματος είναι το διπλό γαλάκτωμα νερού σε έλαιο σε νερό (water in oil in water, w/o/w), που διαθέτει μία υδατική συνεχή φάση και μία διεσπαρμένη φάση, η οποία αποτελείται από γαλάκτωμα νερού σε έλαιο, ή αντιστρόφως, γαλάκτωμα ελαίου σε νερό σε έλαιο (oil in water in oil, o/w/o)[62]–[64].

Τα γαλακτώματα κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φαρμακευτική βιομηχανία και τη βιομηχανία καλλυντικών, καθώς επιτρέπουν τη χρήση μη αναμίξιμων συστατικών στο ίδιο παρασκεύασμα. Επιπλέον, επιτρέπουν τον ιδανικό έλεγχο των ρεολογικών ιδιοτήτων των παρασκευασμάτων, λόγω της μετατόπισης των σχετικών αναλογιών και των επιπέδων διασποράς των λιπόφιλων και των υδρόφιλων φάσεων που περιέχονται στη σύνθεσή τους. Επιπρόσθετα, μία διακύμανση στη συγκέντρωση των συστατικών τους δεν επηρεάζει σημαντικά τη θερμοδυναμική δραστηριότητα, επιτρέποντας, έτσι, τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα των δραστικών ενώσεων που περιέχονται στη σύνθεσή τους[63].

1.4.2 ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν αμφίφιλες ενώσεις, οι οποίες περιέχουν, τόσο υδρόφιλα, όσο και υδρόφοβα μέρη, τα οποία αναφέρονται ως κεφαλή και ουρά, αντίστοιχα. Τα επιφανειοδραστικά είναι δραστικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται στα απορρυπαντικά και τα σαπούνια και μειώνουν την επιφανειακή τάση ή τη διεπιφανειακή τάση, στις διεπιφάνειες αέρα-νερού και νερού-ελαίου. Ειδικότερα, τα βιοεπιφανειοδραστικά μπορούν να ληφθούν από διαφορετικά υλικά, χαμηλού κόστους, που διατίθενται σε μεγάλες ποσότητες. Παράλληλα, διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των επιφανειοδραστικών που προέρχονται από συνθετικές χημικές ουσίες, όπως η χαμηλή τοξικότητα, η βιοδιαθεσιμότητα, η φιλικότητα προς το περιβάλλον, το pH κ.ο.κ. Έτσι, αποτελούν ασφαλή και πιο ικανοποιητική εναλλακτική των χημικών επιφανειοδραστικών, ιδιαίτερα στα τρόφιμα, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καλλυντικά. Οι επιθυμητές και αποτελεσματικές ιδιότητες των επιφανειοδραστικών ουσιών περιλαμβάνουν τη μείωση της επιφανειακής τάσης και την ενίσχυση της διαλυτότητας[65].

Οι γαλακτωματοποιητές αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία επιφανειοδραστικών ουσιών, οι οποίοι προστίθενται σε συστήματα διασποράς, όπως είναι τα γαλακτώματα, με στόχο να ενώσουν τις δύο φάσεις του γαλακτώματος και να αυξήσουν τη σταθερότητά του. Ο γαλακτωματοποιητής μπορεί να είναι καθοριστικός του τύπου του γαλακτώματος. Για παράδειγμα, αν ο γαλακτωματοποιητής διαλύεται πιο εύκολα σε

νερό, δημιουργεί γαλάκτωμα τύπου o/w, ενώ αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο γαλακτωματοποιητής παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τη λιπαρή φάση, τότε προκύπτει γαλάκτωμα τύπου w/o[64].

Μία παράμετρος ύψιστης σημασίας για την ανάπτυξη φαρμακευτικών γαλακτωμάτων είναι η αξιολόγηση της κρίσιμης υδρόφιλης-λιπόφιλης ισορροπίας τους (HBL). Το εν λόγω σύστημα αναπτύχθηκε από τον Griffin τη δεκαετία του 1950, ως προσπάθεια να δώσει μία μερική απάντηση στην αναζήτηση ενός ιδανικού επιφανειοδραστικού για τη σταθεροποίηση ενός δεδομένου συστήματος. Στο σύστημα HBL, κάθε επιφανειοδραστική ουσία ανάλογα με την υδρόφιλη-λιπόφιλη τάση της, ταξινομείται βάσει της τιμής HBL. Οι υδρόφιλες επιφανειοδραστικές ουσίες εμφανίζουν υψηλή τιμή HBL, ενώ οι αντίστοιχες λιπόφιλες έχουν τιμές που κυμαίνονται από 1 έως 10. Επιπρόσθετα, οι επιφανειοδραστικές ουσίες που εμφανίζουν ισορροπία μεταξύ των λιπόφιλων και υδρόφιλων μερών τους, είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές για χρήση ως γαλακτωματοποιητές, καθώς τείνουν να συγκεντρώνονται στη διεπιφάνεια ελαίου/νερού. Τέλος, το επιλεγμένο σύστημα πρέπει να είναι αυτό που συνδυάζει υψηλότερη σταθερότητα και μικρότερη ποσότητα επιφανειοδραστικών ουσιών[63].

1.4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΚΡΕΜΩΝ

Τα καλλυντικά προϊόντα οφείλουν να είναι αποτελεσματικά και σταθερά. Ωστόσο, αναπόσπαστο κριτήριο αποτελεί και η αποδοχή από τον καταναλωτή, η οποία χρειάζεται να επιβεβαιωθεί. Η αισθητηριακή ανάλυση μπορεί να διακρίνει τα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αποδοχή των καταναλωτών και να υποδείξει πως τα αντιλαμβάνονται και, κατά συνέπεια, να καθοδηγήσει την ανάπτυξη νέων καλλυντικών προϊόντων στην επιτυχία. Σύμφωνα με τους Elezoniū et al., τα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αποδοχή του καταναλωτή βασίζονται, αρχικά, στη συσκευασία της κρέμας και έπειτα, στη μυρωδιά, την εμφάνιση και της υφή αυτής (αφή και αίσθηση). Επομένως, ακολούθως της ανάπτυξης μιας σύνθεσης, οι ερευνητές και οι εταιρείες καλλυντικών οφείλουν να πραγματοποιήσουν μία αισθητηριακή αξιολόγηση με εκπαιδευμένα πάνελ ή πάνελ καταναλωτών. Παρά το γεγονός ότι η αισθητηριακή ανάλυση αντιπροσωπεύει πολύτιμο εργαλείο, είναι οικονομικά δαπανηρή και χρονοβόρα. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται ορισμένες εργασίες που μελετούν την εφαρμογή της ενόργανης ανάλυσης, για την ανίχνευση μεταβολών στα συστατικά εισόδου. Οι καλλυντικές ιδιότητες, όπως οι βέλτιστες μηχανικές ιδιότητες, η επαρκής ρεολογική συμπεριφορά και η κατάλληλη πρόσφυση, μπορούν να μελετηθούν με ανάλυση οργάνων. Άλλα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων της εμφάνισης, της οσμής, της υπολειπόμενης λιπαρότητας μετά την εφαρμογή της κρέμας και της αίσθησης που προκαλείται από την εφαρμογή αυτής, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές[66].

Πληθώρα μεθόδων αξιολόγησης κρεμών υφίσταται, τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Αρχικά, η κρέμα μπορεί να αξιολογηθεί ως προς το τύπο γαλακτώματος στον οποίο ανήκει. Μία συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η μέθοδος υπό δοκιμή βαφής, όπου κόκκινη βαφή αναμιγνύεται με την κρέμα και

εξετάζεται στο μικροσκόπιο. Αν τα σφαιρίδια διασποράς εμφανίζονται με το χρώμα της βαφής, τότε η κρέμα είναι τύπου o/w, ενώ σε αντίθετη περίπτωση η κρέμα είναι τύπου w/o. Παράλληλα, μπορεί να ελεγχθεί η κρέμα ως προς τη σταθερότητά της, μέσω επιταχυνόμενης δοκιμής σταθερότητας, όπου σκευάσματα κρέμας τοποθετούνται σε διαφορετικά θερμοκρασιακά περιβάλλοντα για ορισμένους χρόνους. Φυσικά, σημαντικό μέρος της αξιολόγησης μίας κρέμας αποτελεί η αξιολόγηση ορισμένων ιδιοτήτων της. Ορισμένες ιδιότητες που εξετάζονται είναι το pH, το οποίο οφείλει να έχει αντίστοιχη τιμή με αυτή της επιδερμίδας, το ιξώδες, η ομοιογένεια, η οποία προσδιορίζεται μέσω οπτικής παρατήρησης και αφής, η εμφάνιση της κρέμας, η οποία κρίνεται μέσω του χρώματος και της τραχύτητάς της, η μαλακότητα και η ολισθηρότητά της και τέλος, η ικανότητα εξάπλωσης και η υγρασία της. Σημαντικές είναι και οι ιδιότητες που εξετάζονται έπειτα από την εφαρμογή της κρέμας στην επιδερμίδα. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχεται το επίχρισμα που σχηματίζεται στο δέρμα, καθώς και η ευκολία αφαίρεσης της κρέμας που εφαρμόστηκε με πλύση του συγκεκριμένου μέρους με νερό. Τέλος, συχνά διεξάγονται έλεγχοι ερεθισμού, καθώς και δοκιμές μικροβιακού ορίου σε καλλυντικές κρέμες[67].

1.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

1.5.1 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η εκχύλιση αποτελεί το πρώτο βήμα για το διαχωρισμό των επιθυμητών φυσικών προϊόντων από τις πρώτες ύλες. Οι μέθοδοι εκχύλισης περιλαμβάνουν εκχύλιση με διαλύτη, μέθοδο απόσταξης, συμπίεση και εξάχνωση σύμφωνα με την αρχή της εκχύλισης.

Η εκχύλιση με διαλύτη είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Η εκχύλιση φυσικών προϊόντων προχωρά μέσω των ακόλουθων σταδίων:

- ✓ Διείσδυση του διαλύτη στη στερεά μήτρα
- ✓ Διάλυση της ουσίας/ των ουσιών στο διαλύτη
- ✓ Διάχυση της διαλυμένης ουσίας/ των διαλυμένων ουσιών εκτός της στερεάς μήτρας
- ✓ Συλλογή εκχυλισμένων διαλυμένων ουσιών.

Οι παράγοντες που ενισχύουν τη διαχυτότητα και τη διαλυτότητα στα παραπάνω βήματα είναι ποικίλοι. Οι ιδιότητες του διαλύτη, το μέγεθος των σωματιδίων των πρώτων υλών, η αναλογία διαλύτη προς στερεό, η θερμοκρασία εκχύλισης και η διάρκεια εκχύλισης είναι μόνο κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση εκχύλισης.

Η επιλογή του διαλύτη είναι κρίσιμη για την εκχύλιση. Η επιλεκτικότητα, η διαλυτότητα, το κόστος και η ασφάλεια χρειάζεται να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των διαλυτών. Με βάση την αρχή της ομοιότητας και της αλληλεπίδρασης (όμοιο διαλύει όμοιο), οι διαλύτες με πολικότητα παραπλήσια της πολικότητας της διαλυμένης ουσίας είναι πιθανό να εμφανίζουν υψηλότερη απόδοση και αντίστροφα.

Οι αλκοόλες, αιθανόλη και μεθανόλη, είναι καθολικοί διαλύτες στην εκχύλιση για φυτοχημική έρευνα.

Γενικότερα, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο καλύτερο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται κατά την εκχύλιση. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ενισχύεται από το μικρό μέγεθος σωματιδίων, λόγω ενισχυμένης διείσδυσης των διαλυτών και διάχυσης των διαλυμένων ουσιών. Παράλληλα, οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη διάχυση. Ωστόσο, πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσουν απώλεια διαλυτών, οδηγώντας σε εκχυλίσματα ανεπιθύμητων ακαθαρσιών και αποσύνθεση των θερμοευαίσθητων συστατικών. Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση της διάρκειας εκχύλισης σε ένα ορισμένο χρονικό εύρος. Μετά την επίτευξη της ισορροπίας της διαλυμένης ουσίας, εντός και εκτός του στερεού υλικού, η αύξηση του χρόνου δεν επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία διαλύτη προς στερεό, τόσο υψηλότερη είναι η απόδοση εκχύλισης. Βέβαια, μία πολύ υψηλή αναλογία διαλύτη προς στερεό πιθανό να προκαλέσει υπερβολική ποσότητα διαλύτη, η οποία απαιτεί πολύ χρόνο για συμπύκνωση[68]–[70].

Για τις διεργασίες εκχύλισης διαλύτες όπως νερό, αιθανόλη, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο, εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιούν, γενικά, οργανικούς διαλύτες και απαιτούν μεγάλο όγκο διαλύτη και υψηλό χρόνο εκχύλισης. Οι σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης, ή εναλλακτικά μη συμβατικές, έχουν εφαρμοστεί στην εκχύλιση φυσικών προϊόντων και προσφέρουν ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερη κατανάλωση οργανικού διαλύτη, μικρότερο χρόνο εκχύλισης και βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης. Ορισμένες από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκχύλισης, συμβατικές ή μη συμβατικές, είναι[31], [68], [69]:

- ✓ Διαβροχή (maceration)
- ✓ Φιλτράρισμα ή διύληση (percolation)
- ✓ Χώνευση (digestion)
- ✓ Έγχυση (infusion)
- ✓ Αφέψηση (decoction)
- ✓ Αναρροή (reflux)
- ✓ Βάμμα (tincture)
- ✓ Υγρή εκχύλιση υπό πίεση
- ✓ Εκχύλιση Soxhlet
- ✓ Απόσταξη μεθυδρατμών
- ✓ Υδροαπόσταξη
- ✓ Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό
- ✓ Εκχύλιση με υπερήχους
- ✓ Εκχύλιση με μικροκύματα
- ✓ Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία
- ✓ Ενζυμική εκχύλιση
- ✓ Εκχύλιση στερεάς φάσης.

1.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Ο υπέρηχος αναφέρεται σε ηχητικά κύματα πέρα από το εύρος ακουστικών συχνοτήτων, δηλαδή μεγαλύτερων των 20 kHz. Όταν ο υπέρηχος διέρχεται από ένα υγρό μέσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ των υπερηχητικών κυμάτων, του υγρού και του διαλυμένου αερίου οδηγεί σε ένα φαινόμενο γνωστό ως ακουστική σπηλαιώση. Η ακουστική σπηλαιώση μπορεί να δημιουργηθεί σε υγρά στην περιοχή συχνοτήτων από 20 kHz έως και μεγαλύτερες του 1 MHz. Η εφαρμογή ενός ακουστικού πεδίου αναγκάζει μία ελεύθερη φυσαλίδα να ταλαντώνεται γύρω από την ακτίνα ισορροπίας της. Κατά τη φάση της συστολής, η συγκέντρωση του αερίου μέσα στη φυσαλίδα αυξάνεται και το αέριο διαχέεται έξω από τη φυσαλίδα. Ομοίως, κατά τη φάση της διαστολής, η συγκέντρωση μειώνεται και το αέριο διαχέεται στη φυσαλίδα. Αξίζει να σημειωθεί πως περισσότερο αέριο εισέρχεται κατά τη διαστολή, από ότι φεύγει κατά τη συστολή. Συνεπώς, σε έναν πλήρη κύκλο, υπάρχει αύξηση της ποσότητας αερίου μέσα στη φυσαλίδα, η οποία ονομάζεται διορθωμένη διάχυση. Η διορθωμένη διάχυση και η συνένωση φυσαλίδων οδηγεί στην ανάπτυξη φυσαλίδων προς ένα εύρος μεγέθους συντονισμού. Όταν οι φυσαλίδες φτάσουν στο εύρος μεγεθών συντονισμού, μεγαλώνουν στο μέγιστο μέγεθος εντός ενός ακουστικού κύκλου και έπειτα, καταρρέουν βίαια, δημιουργώντας συνθήκες πολύ υψηλών θερμοκρασιών εντός των φυσαλίδων που έχουν καταρρεύσει. Εντός των φυσαλίδων σπηλαιώσης δημιουργούνται ρίζες υψηλής αντίδρασης. Εάν το νερό είναι το μέσο, δημιουργούνται πρωτογενείς ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου. Παρουσία, όμως, άλλων διαλυμένων πτητικών ουσιών, όπως αλκοόλες, δημιουργείται ποικιλία ριζών. Παράλληλα, η σπηλαιώση δημιουργεί βίαιες φυσικές δυνάμεις που περιλαμβάνουν μικροπίδακες, δυνάμεις διάτμησης, κρουστικά κύματα και αναταράξεις[71].

Η εκχύλιση θρεπτικών ουσιών από φυτά ή σπόρους απαιτεί τη χρήση κατάλληλου διαλύτη και μία μέθοδο που διασφαλίζει ότι το υλικό έχει επαρκή επαφή με το διαλύτη. Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων χρησιμοποιεί υπερηχητικό κύμα ενέργειας κατά την εκχύλιση. Αποτελεί μία νέα μέθοδο εκχύλισης αποτελεσματική και παράλληλα φιλική προς το περιβάλλον με συχνότητες υπερηχητικών κυμάτων 20-1000 kHz. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με υπερήχους αποδίδεται, κυρίως, στην ακουστική σπηλαιώση. Ο υπέρηχος, δημιουργώντας σπηλαιώση, λόγω των κύκλων διαστολής και συστολής του υλικού, όπως αναλύεται και παραπάνω, επιταχύνει τη διάλυση και τη διάχυση της διαλυμένης ουσίας, καθώς και τη μεταφορά θερμότητας, η οποία βελτιώνει την απόδοση εκχύλισης. Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, που αυξάνουν τη διαλυτότητα και τη διαχυτότητα, και πιέσεις, που διευκολύνουν τη διείσδυση και τη μεταφορά μάζας, στη διεπιφάνεια μεταξύ ενός υγρού μέσου που υποβάλλεται σε υπερήχους και μιας στερεής μήτρας, σε συνδυασμό με τις οξειδωτικές ρίζες που παράγονται κατά την ηχόλυση (sonolysis), επιφέρουν υψηλή εκχυλιστική ισχύ. Τα φαινόμενα της μικροεκτόξευσης (microjetting) και μικροροής (microstreaming), που αποδίδονται στην ακουστική σπηλαιώση, προκαλούν αποσάθρωση στερεών υλικών και διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αυτό το φαινόμενο περιλαμβάνει αύξηση της επαφής μεταξύ του διαλύτη και του περιεχομένου του κυττάρου και ενισχύει τη μεταφορά μάζας του περιεχομένου του κυττάρου από το υλικό στο διαλύτη. Επιπλέον, καθώς το μέγεθος των φυσαλίδων, που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ακουστικής

σπηλαίωσης, είναι πολύ μικρό συγκριτικά με το συνολικό όγκο του υγρού, η θερμότητα που παράγεται κατά την κατάρρευση της φυσαλίδας διαχέεται γρήγορα, χωρίς αισθητή αλλαγή στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ακόμη, οι θερμοκρασίες του διαλύματος είναι πιθανό να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με υπερήχους με δύο αντίθετες επιδράσεις της θερμοκρασίας. Η υποβοηθούμενη από υπερήχους εκχύλιση μπορεί αφενός να αυξήσει την απόδοση εκχύλισης σε χαμηλές θερμοκρασίες, αφετέρου, όμως, η διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου υλικού μπορεί να αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος[17], [54], [56], [57], [71]–[76].

Απαριθμώντας τα πλεονεκτήματα της χρήσης υπερήχων, αυτά είναι:

- ✓ Αυξημένη μεταφορά μάζας
- ✓ Καλύτερη διείσδυση διαλύτη
- ✓ Λιγότερη εξάρτηση από το χρησιμοποιούμενο διαλύτη
- ✓ Εκχύλιση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες
- ✓ Ταχύτεροι ρυθμοί εκχύλισης
- ✓ Μεγαλύτερες αποδόσεις.

Αναλυτικότερα, αξίζει να σημειωθεί πως στην εκχύλιση με υπερήχους οι θερμοκρασίες κυμαίνονται σε εύρος από τη θερμοκρασία δωματίου έως τους 70 °C. Υψηλότερες θερμοκρασίες δε συνιστώνται λόγω της επιτρεπόμενης αποδόμησης ή ισομερισμού των θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, αυτός απαιτείται να επιλέγεται κατάλληλα ώστε, αφενός να αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης και, αφετέρου να μειώνεται η εισροή ενέργειας. Από πολλές μελέτες έχει βρεθεί πως βέλτιστος χρόνος εκχύλισης είναι τα 30 λεπτά[71], [74].

Άλλα αποδεδειγμένα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με χρήση υπερήχων περιλαμβάνουν την υψηλή αναπαραγωγικότητα, το υψηλό επίπεδο αυτοματισμού, τη συνολική μείωση, τόσο στη χρήση διαλυτών, όσο και στην κατανάλωση ορυκτής ενέργειας και την αύξηση της καθαρότητας της αναλυόμενης ουσίας. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ιδιαίτερα ελκυστική από βιομηχανική άποψη, καθώς μπορεί να προστεθεί σε μία υπάρχουσα σειρά διεργασιών, με ελάχιστες αλλαγές.

Παρά την πληθώρα των πλεονεκτημάτων της συγκεκριμένης μεθόδου, η βελτιστοποίηση των λειτουργικών παραμέτρων των υπερήχων, όπως το μέγεθος του δείγματος, το μέγεθος των σωματιδίων, ο τύπος και η συγκέντρωση του διαλύτη, η ισχύς και η συχνότητα των υπερήχων, ο χρόνος και η θερμοκρασία της εκχύλισης και η αναλογία υγρού/στερεού, είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη υψηλής απόδοσης εκχύλισης. Οι συνθήκες βελτιστοποίησης ποικίλλουν ανάλογα με τη φύση του υλικού και της αναλυόμενης ουσίας που ενδιαφέρει. Τέλος, η εφαρμογή της υποβοηθούμενης από υπερήχους εκχύλισης έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση διαφόρων κατηγοριών συστατικών τροφίμων, όπως αρώματα, λιπίδια και έλαια, χρωστικές ουσίες, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, μέταλλα, χημικές προσμίξεις, σταθεροποιητές, καθώς και μία σειρά βιοδραστικών ενώσεων, όπως ανθοκυανίνες, καροτενοειδή, φλαβονοειδή και φαινόλες[71].

1.5.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ

Η τεχνολογία των μικροκυμάτων βρίσκει πολλαπλές χρήσεις σε χημικά πεδία, όπως σύνθεση οργανικών, ανόργανων και οργανομεταλλικών ενώσεων, κατάλυση, εκχύλιση με διαλύτη, ξήρανση δείγματος, μέτρηση υγρασίας, προσρόφηση και εκρόφηση αναλυόμενης ουσίας, καθαρισμός δειγμάτων κ.ο.κ. Η χρήση μικροκυμάτων μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του χρόνου που απαιτείται για την ολοκλήρωση ορισμένων από τις παραπάνω διεργασίες και αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για πληθώρα τύπων δειγμάτων. Στην υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση, η ενέργεια των μικροκυμάτων εφαρμόζεται σε θερμικούς διαλύτες, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με δείγματα, κυρίως στερεά, επιτυγχάνοντας την κατανομή των ενώσεων-στόχων που ενδιαφέρουν, από το δείγμα στο διαλύτη. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται σε κλειστά ή ανοιχτά δοχεία, όπου το δείγμα και ο διαλύτης συνδυάζονται και στη συνέχεια εκτίθενται σε ενέργεια μικροκυμάτων. Ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται σημαντικά κατά την εφαρμογή μικροκυμάτων, καθώς με τα μικροκύματα το μίγμα δείγματος/διαλύτη θερμαίνεται απευθείας, ενώ με τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης, απαιτείται μια πεπερασμένη περίοδος για τη θέρμανση του δοχείου, προτού μεταφερθεί η θερμότητα στο διάλυμα. Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, η υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση μπορεί να μειώσει τον απαιτούμενο χρόνο εκχύλισης σε λιγότερο από 20 λεπτά και την κατανάλωση διαλύτη κάτω από 20 mL. Παράλληλα, επιτρέπει τη δυνατότητα ταυτόχρονης επεξεργασίας πολλαπλών δειγμάτων, βελτιώνοντας δραστικά την απόδοση του δείγματος. Επιπλέον, οι ανακτήσεις που επιτυγχάνονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι, ως επί το πλείστον, συγκρίσιμες ή και υψηλότερες από τις αντίστοιχες που παρέχονται με εναλλακτικές μεθόδους. Συνεπώς, η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων συμμορφώνεται σε μεγάλο βαθμό με τα ελάχιστα κριτήρια που απαιτούνται για τις σύγχρονες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων και παρέχει μία πολύ ελκυστική εναλλακτική λύση στις συμβατικές προσεγγίσεις.

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα που αποτελούνται από δύο ταλαντευόμενα πεδία: ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο. Τα δύο πεδία λειτουργούν κάθετα μεταξύ τους και η κατεύθυνση διάδοσης ποικίλλει ημιτονοειδώς. Η ενέργεια των μικροκυμάτων είναι μία μη ιονίζουσα ακτινοβολία με εύρος συχνοτήτων μεταξύ 300 και 300000 MHz, που προκαλεί μοριακή κίνηση με δύο μηχανισμούς: τη μετανάστευση ιόντων και την περιστροφή των διπόλων. Το μαγνητικό πεδίο παράγει την άμεση δράση των κυμάτων στο υλικό, το οποίο είναι ικανό να απορροφήσει ένα μέρος της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας και να τη μετατρέψει σε θερμότητα. Όλοι οι φούρνοι μικροκυμάτων, ανεξαρτήτως πηγής ή χρήσης, λειτουργούν σε σταθερή συχνότητα 2.45 GHz. Τα μικροκύματα θερμαίνουν τα μόρια μέσω του διπλού μηχανισμού της ιοντικής αγωγιμότητας και της περιστροφής του διπόλου. Η ιοντική αγωγιμότητα και η περιστροφή του διπόλου λαμβάνουν χώρα συνήθως ταυτόχρονα, τόσο στο διαλύτη, όσο και στο δείγμα, γεγονός που μετατρέπει αποτελεσματικά την ενέργεια των μικροκυμάτων σε θερμική ενέργεια. Η μετανάστευση των διαλυμένων ιόντων προκαλεί συγκρούσεις μεταξύ των μορίων, καθώς υπάρχει αλλαγή της κατεύθυνσης των ιόντων όσες φορές αλλάζει πρόσημο το πεδίο. Η περιστροφή του διπόλου σχετίζεται με την εναλλακτική κίνηση των πολικών

μορίων, τα οποία προσπαθούν να ευθυγραμμιστούν με το ηλεκτρικό πεδίο. Η διπολική πόλωση, ή εναλλακτικά η πόλωση προσανατολισμού, είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός θέρμανσης στην εκχύλιση με μικροκύματα.

Αξίζει να σημειωθεί πως, η επίδραση της ενέργειας των μικροκυμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση, τόσο του διαλύτη, όσο και της μήτρας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο διαλύτης που επιλέγεται παρουσιάζει υψηλή διηλεκτρική σταθερά, έτσι ώστε να απορροφά έντονα την ενέργεια των μικροκυμάτων. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, αν και είναι αρκετά σπάνιο, μπορεί να θερμανθεί μόνο η μήτρα του δείγματος, με σκοπό οι διαλυμένες ουσίες να απελευθερώνονται σε ψυχρό διαλύτη. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν πολικοί διαλύτες όπως, εξάνιο και χλωροφόρμιο, οι οποίοι παράγουν καθόλου ή ελάχιστη θερμότητα κατά την έκθεσή τους σε μικροκύματα. Συνεπώς, η μήτρα πρέπει να αποτελεί καλό διηλεκτρικό υλικό και να αλληλεπιδρά με τα μικροκύματα[54], [56], [57], [68], [69], [74], [75], [77].

1.5.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Η εκχύλιση φυτοχημικών συστατικών όπως φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, τανίνες, αλκαλοειδή, τερπενοειδή, στεροειδή και γλυκοσίδες από διαφορετικά φυτικά υλικά (φύλλα, καρποί, σπόροι, ρίζες) είναι ένα αρχικό βήμα για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών και την απομόνωση φυτοχημικών ενώσεων, οι οποίες είναι, ως επί το πλείστον, βιοενεργά φυσικά προϊόντα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγές για την ανάπτυξη φαρμακευτικών συστατικών. Κατά την εκχύλιση με διαλύτες, ο διαλύτης οφείλει να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: υψηλή επιλεκτικότητα (πολικότητα σύμφωνα με την ένωση στόχο), ασφάλεια (χαμηλή τοξικότητα, μη εκρηκτικότητα και μη ευφλεκτότητα), εύκολο διαχωρισμό από τις ενώσεις-στόχους, χαμηλό ιξώδες (διευκολύνει τη μεταφορά μάζας), χαμηλή θερμοκρασία βρασμού (αποτρέπει την αποικοδόμηση ενώσεων) και χαμηλό κόστος. Ορισμένοι από τους συμβατικούς πτητικούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση φυτών περιλαμβάνουν πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο, τολουόλιο, διαιθυλαιθέρα, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη, βουτανόλη, αιθανόλη και μεθανόλη, κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας. Γενικότερα, οι διαλύτες αυτοί χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες και το γεγονός αυτό αυξάνει το κόστος της εκχύλισης. Παράλληλα, η χρήση οργανικών διαλυτών είναι σχετικά τοξική, λόγω ακατάλληλων διαδικασιών εκχύλισης και πιθανότητας παρουσίας υπολειμματικών διαλυτών στα εκχυλίσματα που παράγονται. Η πτητικότητα των διαλυτών, τους καθιστά δυνητικούς ατμοσφαιρικούς ρύπους που συμβάλλουν στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Συνεπώς, η χρήση «πράσινου» διαλύτη θα μπορούσε να ξεπεράσει τους περιορισμούς των συμβατικών οργανικών διαλυτών.

Οι «πράσινοι» διαλύτες είναι εναλλακτικοί διαλύτες που πληρούν τα «πράσινα» κριτήρια, επομένως είναι φιλικό προς το περιβάλλον και σχετικά ασφαλείς. Ανάμεσα στα πολλά πλεονεκτήματά τους είναι ότι είναι εύκολο να παρασκευαστούν, είναι λιγότερο επικίνδυνοι, είναι ανακυκλώσιμοι και βιοαποικοδομήσιμοι. Μεταξύ αυτών των διαλυτών, οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες λαμβάνουν τη μεγαλύτερη προσοχή από τους ερευνητές. Ορισμένες φυσικές ενώσεις από φυτά, όπως πιπερίνη και

κουρκουμίνη, που εκχυλίστηκαν με συμβατικές μεθόδους εκχύλισης έδειξαν χαμηλή διαλυτότητα, κακή σταθερότητα, χαμηλή προσρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα και κακή βιοδιαθεσιμότητα. Οι NaDES, ως διαλύτες εκχύλισης, μπορούν να αυξήσουν τη διαλυτότητα και τη βιοδραστικότητα αυτών των ενώσεων και η χρήση τους μπορεί, παράλληλα, να αυξήσει τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής των ενώσεων στα εκχυλίσματα. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως και η βιοδιαθεσιμότητα των ενώσεων σε NaDES παρουσιάζεται αυξημένη[78]–[80].

1.5.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

1.5.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες

Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η διαδικασία εκχύλισης κρίνεται εξαιρετικά σημαντική, καθώς οι στοχευόμενες ενώσεις προσροφούνται στη μήτρα του δείγματος με φυσική προσρόφηση και χημικές αλληλεπιδράσεις. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να διευκολύνει τη μείωση της αντοχής αυτών των αλληλεπιδράσεων, και συνεπώς την αύξηση της εκρόφησης. Μπορεί, ακόμα, να διευκολύνει την αύξηση της διάλυσης των ενώσεων στο διαλύτη κατά την εκχύλιση, τη μείωση του ιξώδους, τη μείωση της πυκνότητας, τη μείωση της επιφανειακής τάσης DES/NaDES και την αύξηση της διαχυτότητας. Πιο συγκεκριμένα, το ιξώδες ενός DES ή NaDES μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από δύο παράγοντες: την περιεκτικότητα σε νερό και τη θερμοκρασία. Μία μικρή αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να μειώσει το ιξώδες ενός DES/NaDES. Ωστόσο, μία σημαντική αύξηση στα επίπεδα της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει τους χημικούς δεσμούς και τη δομή των στοχευμένων ενώσεων, οδηγώντας σε θερμική αποικοδόμηση ή/και οξείδωση των στοχευμένων φαινολικών ενώσεων, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το επιθυμητό εύρος θερμοκρασιών για τις εκχυλίσεις είναι από τη θερμοκρασία δωματίου, 25 °C, έως περίπου 60 °C. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν την απαίτηση σε ενέργεια, αφαιρώντας έτσι από τον πράσινο χαρακτήρα των εκχυλίσεων, και μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο, τόσο το DES, όσο και την ουσία στόχο. Τέλος, οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες αποδεικνύεται ότι μειώνουν την απόδοση σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω μείωσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ένωσης στόχου και του διαλύτη, ανεξάρτητα από τη θερμική αντοχή του καθενός, που εξακολουθεί να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα[37], [55], [81], [82].

1.5.5.2 Επίδραση της μοριακής δομής και της σύστασης του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση

Η μοριακή δομή του DES/NaDES αναφέρεται στα συστατικά που χρησιμοποιούνται στη σύνθεσή του. Είτε είναι δυαδικό, είτε τριμερές σύστημα, τα μόρια που περιέχονται

στο DES είναι υπεύθυνα για τις μοναδικές του ιδιότητες. Σε εκχυλίσεις, αναφέρεται ότι η πολικότητα του DES είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη διαλυτότητα. Οι ερευνητές συνήθως τείνουν να ξεκινούν με την προετοιμασία ενός ευρέως φάσματος DES/NaDES, που αποτελούνται από διαφορετικούς δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου και στη συνέχεια, να εξετάζουν για την εκχύλιση, ποιος δότης θα οδηγήσει σε διαλύματα με διαφορετικές πολικότητες. Είναι ευρέως γνωστή η αρχή «όμοιο διαλύει όμοιο». Οι διάφορες ενώσεις-στόχοι έχουν διαφορετικούς βαθμούς πολικότητας με βάση τη δομή τους. Ομοίως, οι DES ή NaDES θα έχουν διαφορετικές πολικότητες με βάση τα HBA και HBD από τα οποία αποτελούνται. Η απόδοση εκχύλισης μιας συγκεκριμένης ένωσης είναι υψηλότερη σε ένα διαλύτη που εμφανίζει διαμοριακές δυνάμεις παρόμοιες σε ισχύ με την ίδια την ένωση. Ένα χρήσιμο κριτήριο που μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό ενός κατάλληλου συστήματος διαλυτών είναι μέσω του υπολογισμού και του προσδιορισμού της ελεύθερης ενέργειας διαλυτοποίησης για μία συγκεκριμένη ένωση, σε ένα συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω υπολογιστικής μοντελοποίησης.

Επιπλέον, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι μοριακές αλληλεπιδράσεις, τόσο των HBD, όσο και των HBA με το στόχο, καθώς και το υπόβαθρο. Οποιοσδήποτε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του DES και μιας άλλης παρουσίας στο σύστημα ενδέχεται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης σε μεγάλο βαθμό, οδηγώντας δυνητικά σε επανασχεδιασμό της εκχύλισης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό που προέρχεται από τους Cui et. Al, όπου μία αλλαγή στην αναλογία μεταξύ του δότη και του δέκτη οδήγησε σε μείωση της απόδοσης. Αυτή η μείωση δεν οφειλόταν σε αλλαγή της πολικότητας ή σε κάποιο αντίστοιχο παράγοντα, αλλά στο ανιόν χλωρίου, το οποίο έφεραν η χολίνη και η βεταΐνη και το οποίο αντέδρασε με το στόχο. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, όσον αφορά την αναλογία HBA/HBD, φαίνεται ότι μία αύξηση στην περιεκτικότητα του δότη δεσμού υδρογόνου οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του DES/NaDES. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραλείπεται η εξάρτηση της αναλογίας HBA/HBD με την επιφανειακή τάση, καθώς και τη βασικότητα του διαλύτη, οι οποίες επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ του διαλύτη και των ενώσεων-στόχων. Επιπλέον, μία αύξηση των ομάδων υδροξυλίου σε οποιοδήποτε συστατικό του DES προάγει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου που αποδίδουν ένα σημαντικά πιο σταθερό DES[37], [55].

1.5.5.3 Επίδραση του ιξώδους του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση

Το συνήθως υψηλό ιξώδες των DES ή NaDES είναι το κύριο μειονέκτημα που μπορεί να περιορίσει τη χρήση τους ως διαλύτες εκχύλισης, καθώς εμποδίζει τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα εκχύλισης. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της διαδικασίας εκχύλισης μπορεί να μειωθεί το ιξώδες, καθώς με αύξηση της θερμοκρασίας τα μόρια αποκτούν αρκετή κινητική ενέργεια, ικανή να υπερνικήσει τις διαμοριακές δυνάμεις, οδηγώντας σε εξασθένηση των δυνάμεων van der Waals και των αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα την καλή ικανότητα ροής του DES και κατά συνέπεια, την καλύτερη δυνατότητα εκχύλισης. Ωστόσο, αυτή η επιλογή δεν είναι

πάντα η ιδανική, καθώς καταναλώνεται ενέργεια και ορισμένα ευαίσθητα στη θερμότητα φυτοχημικά μπορεί να μην «ανέχονται» την αυξημένη θερμοκρασία.

Ένας απλός τρόπος ώστε να ξεπεραστεί το εν λόγω πρόβλημα είναι η χρήση ενός συνδιαλύτη στο μέσο εκχύλισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός ο συνδιαλύτης είναι το νερό, το οποίο διατηρεί τον πράσινο χαρακτήρα της διεργασίας. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί, επίσης, οργανικοί διαλύτες, όπως η μεθανόλη. Μέσω αυτού του τρόπου, το ιξώδες μειώνεται και η εκχύλιση διευκολύνεται. Σε εργασία των Koutsoukos et al., το νερό χρησιμοποιήθηκε ως συνδιαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από την πρόπολη με χρήση NaDES ChCl/τριαιθυλενογλυκόλη που περιέχει 20% νερό. Οι ερευνητές μελέτησαν τα ιξώδη 20 DES και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ιξώδες αυξάνεται σημαντικά όταν είναι εφικτοί περισσότεροι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των στοιχείων του DES[83] .

Η ποσότητα του προστιθέμενου νερού σε ένα DES αποτελεί ένα παράγοντα που χρειάζεται να παρακολουθείται προσεκτικά όταν ο DES ή ο NaDES εφαρμόζεται ως διαλύτης εκχύλισης. Η ποσότητα νερού εξετάζεται εκτενώς σε επόμενη υποενότητα (§1.5.5.4).

Τέλος, μία άλλη προσέγγιση για να ξεπεραστεί το «εμπόδιο» του υψηλού ιξώδους είναι η αξιοποίηση του τεράστιου αριθμού πιθανών συνδυασμών φυσικών ενώσεων, από τις οποίες μπορεί να παραχθεί ένας NaDES, προκειμένου να σχεδιαστούν διαλύτες χαμηλού ιξώδους. Ερευνητές εισήγαγαν μία νέα ιδέα – το σχεδιασμό λιγότερο πολικών NaDES, με χαμηλότερο ιξώδες, με την ανάμειξη λιπαρών οξέων διαφορετικού μήκους αλκυλικής αλυσίδας ή με συνδυασμό μενθόλης με διάφορα οργανικά οξέα[37], [81].

1.5.5.4 Επίδραση της περιεκτικότητας σε νερό του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση

Οι DES/NaDES είναι ιδιαίτερα ιξώδη και παχύρρευστα υγρά. Αυτό μπορεί να αποβεί σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης αυτών, καθώς το υψηλό ιξώδες τους περιορίζει την εκχύλιση ενώσεων από φυσικές πηγές. Στην πραγματικότητα, το παραπάνω μπορεί να προκαλέσει πολλές πρακτικές προκλήσεις κατά τον χειρισμό αυτών των διαλυτών σε διαφορετικές διεργασίες. Για να ξεπεραστεί το ζήτημα που αναφέρεται παραπάνω, προστίθεται νερό στους DES και NaDES. Η παρουσία νερού μπορεί να επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύτη, συμπεριλαμβανομένου του ιξώδους, της αγωγιμότητας, της πολικότητας, της πυκνότητας και της δραστηρότητας του νερού. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα σημαντικό η προσθήκη νερού να γίνεται εντός συγκεκριμένου εύρους ποσοστού νερού, ώστε να μην επηρεάζει τη δομή του DES/NaDES. Σύμφωνα με την ανάλυση NMR, λογικές ποσότητες νερού δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δομή των συστατικών του διαλύτη και ακόμη, τα φάσματα των καθαρών διαλυτών και εκείνων που αναμιγνύονται με συγκεκριμένες ποσότητες νερού είναι σχεδόν πανομοιότυπα.

Η αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό οδηγεί σε μείωση του ιξώδους των DES/NaDES. Γενικά, οι NaDES είναι πιο ιξώδεις από τους συνηθισμένους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τις εκχυλίσεις. Το ιξώδες τους οφείλεται στις

εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου που υπάρχουν μεταξύ των συστατικών. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό του διαλύματος εκχύλισης μπορεί να μειώσει τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών των συστατικών. Επιπλέον, η υδάτινη δραστηριότητα των DES/NaDES αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε νερό. Ωστόσο, μία υψηλή και σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας αυτής μπορεί να αποδυναμώσει την αρχική δομή DES/NaDES και να την αποσυνθέσει. Παράλληλα, μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη διάλυση.

Οι NaDES που περιέχουν νερό παρουσιάζουν υψηλή πολικότητα, λόγω της παρουσίας του νερού. Η αύξηση της πολικότητας μπορεί να παρουσιάσει σημαντική επίδραση στην ικανότητα διαλυτοποίησης του NaDES. Όσον αφορά την πυκνότητα, έχει βρεθεί σε διάφορες μελέτες πως αυτή μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό. Η εύλογη αύξηση των ποσοστών νερού μπορεί να αυξήσει την πολικότητα του μέσου και να μειώσει την επιφανειακή τάση, επιτρέποντας στο διαλύτη να διεισδύσει περισσότερο στη μήτρα και έτσι, να οδηγήσει σε αύξηση της μεταφοράς μάζας, οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, αξίζει να υπογραμμιστεί πως η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των αλληλεπιδράσεων των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του HBD και του HBA, καθώς και μεταξύ του NaDES και της ένωσης-στόχου. Συνεπώς, αποτελεί σημαντικό κίνδυνο το γεγονός μεγάλα ποσοστά νερού εντός του διαλύτη να μειώσουν την πιθανότητα ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου μεταξύ δότη και δέκτη, καταστρέφοντας έτσι την υπερμοριακή δομή του NaDES και οδηγώντας σε αναποτελεσματική εκχύλιση των στοχευόμενων ενώσεων[37], [52], [55], [81], [82].

1.5.5.5 Επίδραση της αναλογίας πρώτης ύλης/ διαλύτη στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι DES/NaDES χρησιμοποιούνται ως διαλύτες πράσινης εκχύλισης, είναι πολύ σημαντικό να ληφθεί υπόψη ο όγκος του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και η μάζα του φυτικού υλικού που χρησιμοποιείται, καθώς η χρήση μεγάλης ποσότητας διαλύτη κατά την εκχύλιση δεν υποστηρίζει τις αρχές της πράσινης χημείας. Το παραπάνω μπορεί, ακόμη, να οδηγήσει σε επιπλοκές στις πειραματικές εργασίες και παράλληλα, στην παραγωγή απορριμμάτων. Από την άλλη πλευρά, η χρήση μικρού όγκου διαλύτη εκχύλισης μπορεί να εισάγει έναν ανεπιθύμητο περιοριστικό παράγοντα που οδηγεί σε ατελή εκχύλιση των στοχευόμενων ενώσεων. Βάσει των παραπάνω, γίνεται φανερό πως η διερεύνηση και η βελτιστοποίηση της αναλογίας στερεού προς διαλύτη εκχύλισης κρίνεται εξέχουσας σημασίας.

Οι διαφορές στην απόδοση εκχύλισης λόγω μεταβολών στην αναλογία στερεού προς διαλύτη σχετίζονται με την ικανότητα εκχύλισης του διαλύτη. Η χρήση μεγάλου όγκου διαλύτη έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη εκχύλιση ενώσεων, λόγω της υψηλότερης ικανότητας εκχύλισης. Σε αντίθεση με το παραπάνω, η χρήση μικρών όγκων διαλύτη μπορεί να αυξήσει το χρόνο που απαιτείται για αποτελεσματική εκχύλιση. Σύμφωνα με μελέτες στην εκχύλιση ενώσεων από το φυτό *Equisetum palustre*, παρατηρήθηκε πως η αύξηση της αναλογίας στερεού προς διαλύτη εκχύλισης έως 1:25 αύξησε

σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση αυτής της αναλογίας έως 1:30 δεν οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης, καθώς η υπερβολική προσθήκη διαλύτη εκχύλισης μπορεί να επιφέρει μείωση της ενέργειας σπηλαίωσης. Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως και η αλόγιστη αύξηση της ποσότητας του διαλύτη μπορεί να οδηγήσει, είτε σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα και μείωση της απόδοσης, είτε να μην οδηγήσει σε κάποιο αποτέλεσμα, καθώς η απόδοση έχει σταθεροποιηθεί [52], [55], [81], [82].

1.5.5.6 Επίδραση του χρόνου στην εκχύλιση με Βαθέως Ευτηκτικό Διαλύτη

Ο χρόνος εκχύλισης είναι επίσης ένας προφανής παράγοντας, ο οποίος επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης αυξάνουν το κόστος, ενώ οι μικρότεροι χρόνοι εκχυλίσεις διατρέχουν τον κίνδυνο να «αφήσουν» σημαντικές ποσότητες ουσιών-στόχων στο δείγμα, καθιστώντας τη διεργασία αναποτελεσματική. Οι περισσότερες διεργασίες εκχύλισης που έχουν εξεταστεί έχουν χρόνους εκχύλισης που κυμαίνονται σε εύρος 20 λεπτά με 2 ώρες, ενώ σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί πως η μέγιστη απόδοση εκχύλισης βρίσκεται στο διάστημα ανάμεσα στα 30 και τα 60 λεπτά. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραληφθεί πως το είδος της εκχύλισης είναι αυτό που ορίζει τον απαραίτητο χρόνο εκχύλισης. Για παράδειγμα, εκχυλίσεις που συνδυάζονται με μεθόδους που υποβοηθούν την ενέργεια, όπως η θέρμανση, οι υπέρηχοι ή τα μικροκύματα, απαιτούν μικρότερο χρόνο εκχύλισης, αλλά περισσότερη ενέργεια για τη διεξαγωγή τους. Συνολικά, η χρήση των DES επιτρέπει αναμφισβήτητα σύντομους χρόνους εκχύλισης, για όλες τις μεθόδους εκχύλισης που χρησιμοποιούνται [37], [81], [82].

1.5.5.7 Επίδραση του pH του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση

Η οξύτητα και η βασικότητα των DES είναι δυνατό να επηρεάσουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη και, επομένως, να επηρεάσουν την εκχύλιση των διαλυμένων ουσιών-στόχων από τη μήτρα του δείγματος. Οι Duan et al. αναφέρουν πως οι DES με βάση τα καρβοξυλικά οξέα είναι σημαντικά πιο αποτελεσματικοί από τους DES με βάση τα σάκχαρα, τις αλκοόλες και τα αμίδια για την εκχύλιση αλκαλοειδών από φυτικά υλικά και το γεγονός αυτό οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ οξέος και αλκανίου. Δεδομένου ότι τα φλαβονοειδή, συνήθως, διαθέτουν υδροξυλομάδες φαινόλης και έχουν ασθενή οξύτητα, οι Zhao et al. προτείνουν DES με βάση οξύ, έναντι των DES με βάση αμίνη, για επίτευξη υψηλότερης απόδοσης εκχύλισης [82].

Το επίπεδο του pH του συστήματος μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να υπαγορεύει τη μορφή της ένωσης-στόχου, επηρεάζοντας, τελικά, τη διαλυτότητά της στο DES/NaDES. Ορισμένα συστατικά του DES μπορεί, επίσης, να επηρεαστούν από το ίδιο το pH, αλλάζοντας την πολικότητα ή τη γενική τους συμπεριφορά, με ευεργετικά ή ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η μορφή του στόχου μπορεί να μεταβάλει εντελώς το σχεδιασμό της εκχύλισης, δεδομένου ότι ένας διαλύτης με εντελώς διαφορετική

πολικότητα θα εκχυλιστεί με διαφορετικό DES από αυτό που είχε αρχικά προγραμματιστεί [37].

Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχει γίνει αντιληπτό πως οι τιμές του pH των DES διαφέρουν σημαντικά. Συγκεκριμένα, οι DES που περιέχουν κιτρικό οξύ και ουρία είναι πολύ όξινοι, με τιμές pH 1-2.91 και ήπια βασικοί, με τιμές pH 8.78-10.48, αντίστοιχα, ενώ άλλοι διαλύτες είναι ουδέτεροι με τιμές pH 6.91-7.74. Για παράδειγμα, η εκχύλιση κατεχινών εξαρτάται σημαντικά από το pH και έχει βρεθεί πως DES με ουδέτερα pH είναι αυτοί που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης. Συμπερασματικά, το pH ενός δεδομένου διαλύτη DES εκχύλισης μπορεί να συσχετιστεί εν μέρει με την ικανότητα εκχύλισης[37], [51].

1.5.5.8 Επίδραση της πολικότητας του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη στην εκχύλιση

Η πολικότητα διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τα φυτικά υλικά, καθώς αυτή η ιδιότητα είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα διαλυτοποίησης των DES. Για συγκεκριμένο HBA, η πολικότητα στα συστήματα DES εξαρτάται από τις χημικές δομές που επιλέγονται ως HBD. Ο προσδιορισμός της πολικότητας μπορεί να γίνει μέσω του συντελεστή κατανομής σε σύστημα n-οκτανόλης/νερού[82].

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι οι NaDES μπορούν να εκχυλίσουν, τόσο υδρόφιλες, όσο και υδρόφοβες φυτοθρεπτικές ενώσεις, ανάλογα με τα συστατικά τους. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον πως οι υδρόφιλοι NaDES μπορούν να διαλύσουν ορισμένες λιπόφιλες ενώσεις, σε αντίθεση με τους συμβατικούς διαλύτες, όπως το νερό. Σύμφωνα με τους Dai et al., τα ευτηκτικά μίγματα με συστατικά οργανικού οξέος έχουν γενικά την υψηλότερη πολικότητα, ακολουθούμενα από εκείνα που βασίζονται σε αμινοξέα. Από την άλλη, NaDES με συστατικά πολυαλκοολών και σακχάρων εμφανίζουν τη χαμηλότερη πολικότητα [80].

Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε απόβλητα φλούδας εσπεριδοειδών έχει προκύψει το συμπέρασμα πως οι αποδόσεις εκχύλισης εμφανίζουν ισχυρή εξάρτηση από τις πολικότητες των DES με βάση αμίδια, αλκοόλες και καρβοξυλικά οξέα. Η ισχυρή αυτή συσχέτιση αιτιολογείται από την αρχή «όμοιο διαλύει όμοιο». Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών, ειδικά αυτά που εμφανίζονται στις φλούδες, είναι λιγότερο πολικές ενώσεις, λόγω των πολλαπλών μεθοξυλικών τους ομάδων. Η χαμηλή απόδοση εκχύλισης με DES με βάση τα σάκχαρα προκαλείται κυρίως από τις ασθενείς αλληλεπιδράσεις τους με τα φλαβονοειδή-στόχους[82].

1.5.5.9 Λειτουργία του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη ως πρόσθετου/ ή πρόσθετα στους Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες

Οι DES έχουν δοκιμαστεί και ως πρόσθετα σε παραδοσιακά συστήματα εκχύλισης ή ανάλυσης. Επιπρόσθετα, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός των DES με τα ιοντικά υγρά. Οι παρόμοιες ιδιότητες τους, οι παρόμοιες δομές και

συμπεριφορές τους ως διαλύτες έκανε φανερό πως ο συνδυασμός των DES με τα ιοντικά υγρά είναι αναπόφευκτος.

Τα πρόσθετα που συνυπάρχουν με το DES στις εκχυλίσσεις περιλαμβάνουν άλλα συστατικά, τα οποία σχηματίζουν τριμερή συστήματα, τα οποία στοχεύουν στην απομόνωση πολλαπλών ενώσεων, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα μιας μόνο εκχύλισης. Οι DES μπορούν να κατασκευαστούν από πληθώρα συστατικών, όπως έχει επιχειρηθεί σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι ακόμα και ένα προσεκτικά σχεδιασμένο και συνθετικό τριμερές σύστημα DES θα είναι πιο αποτελεσματικό από ένα δυαδικό, μεγαλύτερης απλότητας. Συνεπώς, ανάλογα με την ένωση-στόχο, ένα τρίμερες σύστημα μπορεί, είτε να είναι καλύτερη, είτε χειρότερη επιλογή. Με άλλα λόγια, άλλα πρόσθετα μπορούν με την προσθήκη τους να υποβοηθήσουν την εκχύλιση μιας ουσίας ή οποιαδήποτε άλλη δράση, ενώ σε άλλα συστήματα, οποιαδήποτε προσθήκη μπορεί να εμποδίσει την εκχύλιση[37].

1.5.6 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ DES ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Λόγω της υπεροχής των φυσικών συστατικών τους, οι NaDES υποστηρίζουν την πράσινη τεχνολογία και μπορούν να εφαρμοστούν στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Έχει αποδειχθεί πως, αυτοί οι διαλύτες παράγουν αποτελεσματικά εκχυλίσματα φυτικών μεταβολιτών, με υψηλότερες αποδόσεις από εκείνες των συμβατικών οργανικών διαλυτών. Λόγω της πράσινης φύσης τους, έχει αυξηθεί σημαντικά η ζήτηση αυτών των διαλυτών σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με αυτό των συμβατικών οργανικών διαλυτών. Επιπλέον, η υψηλή σταθεροποίηση και διαλυτοποίηση των NaDES μπορεί να τους καταστήσει εξαιρετικούς υποψήφιους για να αντικαταστήσουν τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Ωστόσο, κύρια αδυναμία τους είναι το ιξώδες και οι διακυμάνσεις στους τύπους των συστατικών που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των μιγμάτων τους [31], [80].

Οι NaDES χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση φυσικών ουσιών από τη μήτρα, ως καταλύτες σε ενζυμικές ή χημικές διεργασίες και ως φορείς για αδιάλυτες ενώσεις για φαρμακευτικές εφαρμογές. Ως διαλύτες εκχύλισης, οι NaDES έχουν δύο μηχανισμούς δράσης. Συγκεκριμένα, ο πρώτος μηχανισμός αφορά την άμεση δράση, δηλαδή την αλληλεπίδραση με ενώσεις-στόχους, συνήθως μέσω δεσμών υδρογόνου. Ο δεύτερος μηχανισμός, αφορά την έμμεση δράση, δηλαδή την καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος και την απελευθέρωση της ένωσης-στόχου από τη φυτική μήτρα. Στο δεύτερο μηχανισμό οι NaDES λειτουργούν ως διαλύτες προεπεξεργασίας[80].

Ως διαλυτότητα ορίζεται η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε ένα διαλύτη, σε ισορροπία με την αδιάλυτη διαλυμένη ουσία, σε μία καθορισμένη θερμοκρασία και πίεση. Η διαλυτότητα αποτελεί μία σημαντική πτυχή της εκχύλισης και προάγοντας ή αναστέλλοντας συγκεκριμένες μοριακές αλληλεπιδράσεις. Οι διαλύτες μπορούν να επηρεάσουν τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα μιας διαλυμένης ουσίας. Οι

διαφορετικοί NaDES προκαλούν διαφορές στην πολικότητα, το ιξώδες και την ικανότητα διάλυσης και το γεγονός αυτό σχετίζεται με την απόδοση εκχύλισης. Σύμφωνα με τους Cao et al., η υψηλή διαλυτότητα σχετίζεται με τις φυτοχημικές αλληλεπιδράσεις των NaDES, όπως τις αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και δεσμών υδρογόνου.

Αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η εκχύλιση φυτικών μεταβολιτών χρησιμοποιώντας NaDES και βελτιστοποιημένες συνθήκες εκχύλισης είχε ως αποτέλεσμα καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες με συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Το παραπάνω οφείλεται στην υψηλότερη διαλυτότητα των ενώσεων στους NaDES. Για παράδειγμα, σε διάφορες μελέτες έχει εξεταστεί η διαλυτότητα της καθαρής κουρκουμίνης σε DES που περιέχει χλωριούχο χολίνη σε σύγκριση με τη διαλυτότητα αυτής σε νερό. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι DES αυξάνουν τη διαλυτότητα της κουρκουμίνης έως και 13000 φορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε νερό. Ένα ακόμη παράδειγμα είναι αυτό της εκχύλισης αλκαλοειδών boldine με NaDES από L-προλίνη και οξαλικό οξύ. Η εκχύλιση με χρήση NaDES παρουσιάστηκε πιο αποτελεσματική από την αντίστοιχη με χρήση μεθανόλης.

Ωστόσο, ένα από τα μειονεκτήματα των NaDES σε σύγκριση με τους συμβατικούς διαλύτες είναι το υψηλό τους ιξώδες. Το ιξώδες των NaDES επηρεάζεται από τους δεσμούς υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Η υψηλή τιμή ιξώδους μπορεί να μειώσει το συντελεστή διάχυσης των αναλυτών, οδηγώντας σε χαμηλή μεταφορά μάζας και μεγάλους χρόνους εκχύλισης. Αυτή η κατάσταση μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα της ένωσης-στόχου στο NaDES και να έχει αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες υποενότητες (§1.5.5.1, 1.5.5.3, 1.5.5.4), τα παραπάνω προβλήματα μπορούν να λυθούν, είτε με προσθήκη νερού, είτε με αύξηση της θερμοκρασίας. Ακόμη, η ικανότητα του NaDES να διαλύει ενώσεις-στόχους στα φυτά μπορεί να τροποποιηθεί προσαρμόζοντας τον τύπο των συστατικών του διαλύτη, τη μοριακή αναλογία αυτών και την περιεκτικότητα σε νερό, κάτι το οποίο δεν είναι εφικτό κατά την επιλογή ενός συμβατικού οργανικού διαλύτη. Τέλος, είναι πολύ σημαντική και η επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού NaDES και μεθόδου εκχύλισης για την αύξηση της διαλυτότητας της ένωσης-στόχου στο NaDES [60], [80], [84].

Οι τύποι των συστατικών NaDES, διαφορετικής σύνθεσης, παράγουν διάφορες φυσικές ιδιότητες που μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικές ικανότητες εκχύλισης. Ανάμεσα σε πολυάριθμους NaDES που έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες μελέτες, οι περισσότεροι από αυτούς έδειξαν αυξημένη σταθερότητα και σε υψηλές θερμοκρασίες, μεγαλύτερες των 200 °C. Οι ιδιότητες των NaDES, όπως η χημική και η θερμική σταθερότητα, συνδέονται επίσης με την αποθήκευση των φυσικών ενώσεων. Η σταθεροποιητική ικανότητα των NaDES για τις ενώσεις-στόχους είναι απαραίτητη για περαιτέρω εφαρμογές σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα. Για παράδειγμα, μία από τις χρήσεις των NaDES είναι για σταθεροποίηση φυτικών φυσικών χρωστικών, όπως της καρθαμίνης, η οποία σε υδατικό διάλυμα είναι εξαιρετικά ασταθής, ενώ σε NaDES η σταθερότητά της είναι αυξημένη. Συνεπώς, ο NaDES με χλωριούχο ξυλιτόλη που χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή, ασκεί

προστατευτική δράση στην καρθαμίνη, σε σύγκριση με το νερό. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η σταθερότητα της σκόνης κουρκουμίνης, η οποία ήταν ιδιαίτερα σημαντική σε NaDES από χλωριούχο χολίνη και γλυκερόλη, σε αντίθεση με την αντίστοιχη σε μεθανόλη. Υπάρχει ακόμα πληθώρα παραδειγμάτων αναφορικά με τη σταθεροποιητική ικανότητα που εμφανίζουν οι NaDES, η οποία υποδηλώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτού του τύπου διαλυτών και φυτοχημικών μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των ενώσεων αυτών σημαντικά[79], [80], [84].

Η διαλυτότητα και η σταθερότητα των βιοδραστικών ενώσεων των φυτών είναι από τα βασικά κριτήρια για την εξασφάλιση επαρκούς βαθμού βιοδραστικότητας για ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δε συσχετίζονται πάντα και δεν είναι απλή η ερμηνεία τους, επομένως απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Οι περισσότερες δοκιμές βιοδραστικότητας πραγματοποιούνται σε εκχυλίσματα NaDES μέσω δοκιμών *in vitro*, όπως αντιοξειδωτική δράση, αναστολή ενζύμων, δοκιμές κυτταροκαλλιέργειας. Η πλειοψηφία των δοκιμών αυτών απέδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των εκχυλισμάτων με συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Τα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή, μπορούν να εκχυλιστούν αποτελεσματικά με χρήση NaDES. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με NaDES μπορεί να διεξαχθεί μέσω κυτταροκαλλιέργειας, μέσω αντιοξειδωτικής δράσης έναντι του DPPH ή μέσω άλλων μεθόδων. Είναι μεγάλος ο αριθμός παραδειγμάτων όπου τα εκχυλίσματα με NaDES παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα με συμβατικούς διαλύτες. Το γεγονός αυτό πιθανό να αιτιολογείται από τις αλληλεπιδράσεις που μπορούν να αναπτυχθούν υπό μορφή δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου του ασκορβικού οξέος και ενός συστατικού του NaDES, όπως για παράδειγμα η χλωριούχος χολίνη. Αυτή η αλληλεπίδραση με τα συστατικά των NaDES βοηθά στην αύξηση της ικανότητας διαλυτοποίησης. Ακόμη, ως υγρή φάση, οι NaDES είναι απαραίτητοι για τη διάλυση υδρόφιλων βιοδραστικών ενώσεων και τα εκχυλίσματα που παράγονται από NaDES παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στα οποία χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης το νερό. Επιπρόσθετα, τα συστατικά των NaDES επιδεικνύουν αυξημένη προστασία των αντιοξειδωτικών συστατικών έναντι της υψηλής θερμοκρασίας και του pH, με το χρόνο ημιζωής αυτών να παρατείνεται κατά 4.17-25% και η αντιοξειδωτική δύναμη των εκχυλισμάτων σχετίζεται με τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, ιδιαίτερα δεσμούς υδρογόνου, που σταθεροποιούν την ένωση-στόχο. Σε κάθε περίπτωση, κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας και η αξιολόγηση του «καθαρού» NaDES αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση, για παράδειγμα στην εμφάνιση αποχρωματισμού σε διάλυμα DPPH, ώστε να επιβεβαιώνεται πως η βιοδραστική ένωση είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης[60], [80], [84].

Στην εκχύλιση φυτών, οι NaDES με βάση οργανικά οξέα παράγουν συχνά καλές αποδόσεις σε υδρόφιλες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ομάδων. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι σχετίζεται με την αύξηση της βιολογικής δραστηριότητας των φυτικών εκχυλισμάτων. Ωστόσο, η υψηλή οξύτητα των οργανικών οξέων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς μερικές φορές μπορεί να αποτελεί πρόβλημα στις *in vitro* δοκιμές δραστηριότητας, τόσο σε ενζυμικές αναλύσεις, όσο και σε δοκιμές σε κυτταρική καλλιέργεια. Τέλος, είναι πολύ σημαντικό

να αξιολογηθούν οι βιολογικές επιπτώσεις και των εκχυλισμάτων, αλλά και των «καθαρών» NaDES, διότι στην περίπτωση που αποδειχθεί τοξικός ο διαλύτης, τότε η βιολογική επίδραση της βιοδραστικής ένωσης θα μπορούσε να επηρεαστεί[80].

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ορισμένοι φυτικοί μεταβολίτες παρουσιάζουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα. Το γεγονός αυτό αποτελεί πιθανό εμπόδιο στην ανάπτυξη ενεργών φυτικών μεταβολιτών, ως φάρμακα, λόγω χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολικά υψηλή δόση και πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών. Οι NaDES έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ως διαλύτες για μια πληθώρα, τόσο πολικών, όσο και άπολων οργανικών ενώσεων. Η αυξημένη διαλυτότητα μιας ουσίας στους NaDES μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης για χορήγηση από το στόμα. Και στην περίπτωση αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας ορισμένων ενώσεων, είναι πολυάριθμα τα παραδείγματα τα οποία φανερώνουν το γεγονός πως οι NaDES παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα από άλλους οργανικούς διαλύτες. Ορισμένα από αυτά τα παραδείγματα είναι η βιοδιαθεσιμότητα της κουρκουμίνης σε NaDES χλωριούχου χολίνης-γλυκερόλης, των αλκαλοειδών βερβερίνης σε NaDES προλίνης-ουρίας σε σύγκριση με την αντίστοιχη του υδατικού εναιωρήματος και της ρουτίνης σε NaDES προλίνη-γλουταμικό οξύ σε σύγκριση με την αντίστοιχη του υδατικού εναιωρήματος. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί και το παράδειγμα της χρήσης NaDES από χλωριούχο χολίνη με προπυλενογλυκόλη ή γαλακτικό οξύ έναντι της αιθανόλης και του νερού για την εκχύλιση πράσινης πρόπολης[80].

Συμπερασματικά, δεν πρέπει να παραληφθεί να αναφερθεί πως τα εκχυλίσματα με NaDES μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε εφαρμογές, τόσο της φαρμακευτικής, όσο και των καλλυντικών. Τυπικά, η εκχύλιση φυσικών ενώσεων πραγματοποιείται μέσω μίας διαδικασίας που περιέχει πολλές λειτουργικές μονάδες, συμπεριλαμβανομένης της προεπεξεργασίας και της επεξεργασίας έπειτα από την εκχύλιση, που είναι η βασική μονάδα. Σε περίπτωση που η διεργασία δεν είναι βελτιστοποιημένη, αυτά τα βήματα καταναλώνουν χρόνο, ενέργεια και διαλύτες και παράγουν σημαντική ποσότητα αποβλήτων. Επιπρόσθετα, ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης, το εκχύλισμα μπορεί να είναι μολυσμένο, ή να περιέχει υπολειμματικό διαλύτη, γεγονός που μειώνει την ασφάλειά του. Ως εκ τούτου, η χρήση NaDES στη θέση ενός συμβατικού διαλύτη, παρά την ύπαρξη του πρόσθετου σταδίου της προετοιμασίας του διαλύτη, εξαλείφει το στάδιο της απομάκρυνσης αυτού μετά την εκχύλιση, καθώς οι διαλύτες αυτοί αναγνωρίζονται ως βιοσυμβατοί και ασφαλείς[54], [84].

1.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – DESIGN OF EXPERIMENT

Ο πειραματικός σχεδιασμός, ή εναλλακτικά Design of Experiments (DoE), καθορίζει την κατανομή και τη μέθοδο των πειραμάτων για την ικανοποίηση των στόχων. Διάφοροι παράγοντες καθορίζονται από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των αποτελεσματικότερων πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί και στο σχεδιασμό. Η χαρακτηριστική τιμή και οι συντελεστές του DoE είναι

ισοδύναμοι με τις μεταβλητές της αντικειμενικής συνάρτησης και τις σχεδιαστικές μεταβλητές του σχεδιασμού. Γενικότερα, είναι πολυάριθμα τα λάθη που εμπλέκονται στα πειράματα. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος DoE στο σχεδιασμό, οι συναρτήσεις αξιολογούνται αριθμητικά. Η αριθμητική μέθοδος δεν παρουσιάζει τέτοια σφάλματα και αποτελεί μία ντετερμινιστική μέθοδο[85].

1.6.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Η μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης αναπτύχθηκε από τους Box και Wilson το 1951 για να βοηθήσει τη βελτίωση των διαδικασιών παραγωγής στη χημική βιομηχανία. Σκοπός ήταν η βελτιστοποίηση των χημικών αντιδράσεων, για να επιτευχθεί, για παράδειγμα, υψηλή απόδοση και καθαρότητα του προϊόντος, με όσο το δυνατόν χαμηλότερο κόστος. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης διαδοχικών πειραματισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η διάρκεια της αντίδρασης και η αναλογία των αντιδρώντων. Η ίδια μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση ή τη βελτιστοποίηση οποιασδήποτε απόκρισης που επηρεάζεται από τα επίπεδα ενός ή περισσότερων ποσοτικών παραγόντων[86], [87].

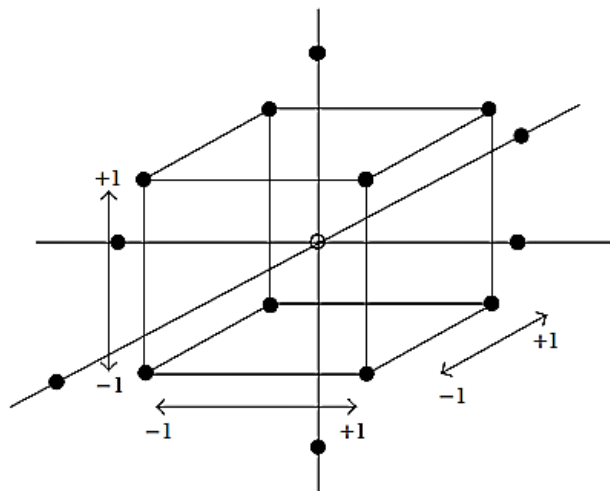
Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης, RSM, αποτελεί ένα συνδυασμό στατιστικών και μαθηματικών τεχνικών για την ανάλυση, τη μοντελοποίηση και τη βελτιστοποίηση διαδικασιών. Ο σκοπός αυτής της μεθόδου είναι να καθορίσει την άγνωστη σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών, παραγόντων εισόδου, και των αποκρίσεων της διαδικασίας. Η αποτελεσματικότητα της ανάλυσης επιφάνειας απόκρισης επηρεάζεται σημαντικά από την επιλογή των κατάλληλων πειραματικών σχεδίων[88], [89].

Μία πιθανή προσέγγιση για την επίτευξη του στόχου περιλαμβάνει τη συλλογή παρατηρήσεων σε κάθε θέση σε ένα πλέγμα συνδυασμών επεξεργασίας, που εκτείνεται σε ολόκληρη την πειραματική περιοχή ενδιαφέροντος. Ωστόσο, ο αριθμός των παρατηρήσεων που απαιτούνται από μία τέτοια συνολική προσέγγιση μπορεί να είναι πολύ μεγάλος και να αυξάνεται ταχύτατα, καθώς αυξάνεται και ο αριθμός των υπό μελέτη παραγόντων. Παράλληλα, ένα ακόμα «εμπόδιο» στην προσέγγιση αυτή είναι πως θα απαιτούνταν εξελιγμένες τεχνικές μοντελοποίησης για να επιτευχθεί επαρκής προσαρμογή ενός μοντέλου σε ολόκληρο το εύρος της περιοχής. Το κυριότερο, λοιπόν, πλεονέκτημα της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης, RSM, είναι πως μειώνει τον αριθμό των πειραματικών εκτελέσεων, εξοικονομώντας ενέργεια, χρόνο και πρώτες ύλες, και ταυτόχρονα, βελτιώνοντας την ποιότητα των πληροφοριών που προκύπτουν από τα αποτελέσματα, σε σύγκριση με την επιμέρους μελέτη της κάθε μεταβλητής. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιείται ευρέως για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης πολυσακχαριτών, ελαίων, φλαβονοειδών, φαινολικών ενώσεων, ανθοκυανινών, διαλυτών σακχάρων και πρωτεϊνών από διαφορετικά φυτικά υλικά[88]–[90].

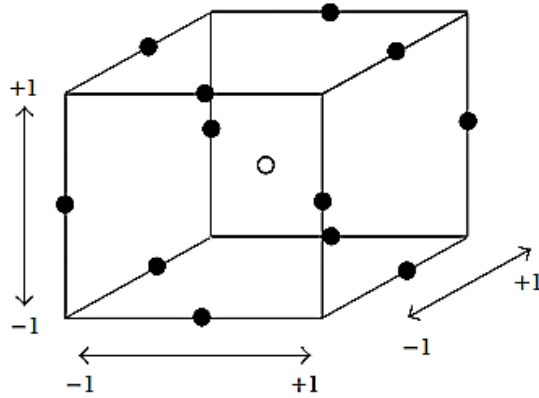
1.6.1.1 Σχεδιασμός Box-Behnken

Ένας κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός έχει πέντε επίπεδα για κάθε ένα από τους παράγοντες που μελετώνται, $\pm 1, \pm \alpha, 0$. Για ένα δεδομένο πείραμα, οι συνθήκες μπορεί να υπαγορεύουν τη χρήση λιγότερων επιπέδων, ωστόσο, σε κάθε περίπτωση απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα ανά παράγοντα για την εκτίμηση των τετραγωνικών όρων στο μοντέλο δεύτερης τάξης. Ακόμη, μπορεί να εξεταστεί η χρήση παραγοντικών σχεδιασμών 3^p και 3^{p-s} . Βέβαια, οι σχεδιασμοί αυτοί τείνουν να είναι μεγάλοι και αναποτελεσματικοί. Για την προσαρμογή ενός μοντέλου απόκρισης δεύτερης τάξης, συχνά προτιμάται ένας διαφορετικός τύπος σχεδιασμού, ο οποίος ονομάζεται Box-Behnken, καθώς οι εκτιμήσεις των παραμέτρων αλληλεπίδρασης δε συγχέονται πλήρως και σε πολλές περιπτώσεις, αυτός ο τύπος σχεδιασμού είναι σημαντικά μικρότερος από ένα κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό 3^{p-s} [86].

Πιο συγκεκριμένα, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός αναπτύχθηκε από τους Box και Behnken και παρέχει τρία επίπεδα για κάθε παράγοντα που μελετάται. Αποτελείται από ένα συγκεκριμένο υποσύνολο των παραγοντικών συνδυασμών από τον 3^k παραγοντικό σχεδιασμό. Τα επίπεδα των παραγόντων είναι κωδικοποιημένα με τιμές +1 και -1. Η μέθοδος σύνθεσης απεικονίζεται στα Σχήματα 12 και 13. Εκτός από τα σημεία που δημιουργούνται κατά τη σύνθεση, πρέπει να προστεθούν και κεντρικά σημεία στη σχεδίαση, ώστε να μπορέσουν να εκτιμηθούν όλες οι παράμετροι του μοντέλου. Η χρήση ενός σχεδιασμού Box-Behnken είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στη βιομηχανική έρευνα, διότι είναι ένας οικονομικός σχεδιασμός και απαιτεί μόνο τρία επίπεδα για κάθε παράγοντα, με κωδικούς -1, 0 και 1 [86], [87], [91].



Σχήμα 11: Σχεδιασμός Box-Behnken τριών παραγόντων (1) [88].



Σχήμα 12: Σχεδιασμός Box-Behnken τριών παραγόντων (2)[88].

Ορισμένοι σχεδιασμοί Box-Behnken είναι περιστρεφόμενοι, χωρίς αυτό αποτελεί κανόνα και ο αριθμός των πειραμάτων (N) που απαιτούνται για την ανάπτυξη αυτών των σχεδιασμών ορίζεται μέσω της Εξίσωσης 1.

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

Όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και C_0 είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων.

Συγκριτικά με τον αριθμό των πειραμάτων του σχεδιασμού Box-Behnken, ο αριθμός των πειραμάτων για ένα κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό ορίζεται μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 2).

$$N = 2^k + 2k + C_0 \quad (2)$$

Μία σύγκριση μεταξύ του σχεδιασμού Box-Behnken και άλλων σχεδιασμών επιφανειών απόκρισης δείχνει πως η μήτρα αυτού του σχεδιασμού είναι ελαφρώς πιο αποτελεσματική από τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό, αλλά πολύ πιο αποτελεσματική από τους τριών επιπέδων πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς. Η απόδοση ενός πειραματικού σχεδιασμού ορίζεται ως ο αριθμός των συντελεστών στο εκτιμώμενο μοντέλο διαιρεμένος με τον αριθμό των πειραμάτων. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα του BBD (Box-Behnken Design) είναι πως δεν περιέχει συνδυασμούς για τους οποίους όλοι οι παράγοντες βρίσκονται ταυτόχρονα στο υψηλότερο ή το χαμηλότερο επίπεδο. Συνεπώς, ο σχεδιασμός αυτός είναι χρήσιμος για την αποφυγή πειραμάτων που εκτελούνται υπό ακραίες συνθήκες, για τα οποία ενδέχεται να προκύψουν μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αντίθετα, δε συνίσταται για περιπτώσεις στις οποίες θα ήταν επιθυμητή η γνώση των αποκρίσεων στα άκρα, δηλαδή τις κορυφές του κύβου[92].

1.6.2 ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ (FRACTIONAL FACTORIAL DESIGN)

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί είναι από τις πιο σημαντικές στατιστικές συνεισφορές στην αποτελεσματική διερεύνηση των επιδράσεων πολλών ελεγχόμενων παραγόντων σε μία απόκριση. Αυτοί οι σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειράματα σε τομείς που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, όπως η

γεωργία, η βιομηχανία, καθώς και η ιατρική έρευνα. Ένα κύριο χαρακτηριστικό των κλασματικών παραγοντικών σχεδιασμών είναι ότι οι στατιστικές ιδιότητες είναι γνωστές πριν τον πειραματισμό. Κατά συνέπεια, ένας πειραματιστής μπορεί να διερευνήσει εναλλακτικές λύσεις που επιτρέπουν την επίτευξη των στόχων του πειράματος με το λιγότερο δυνατό κόστος, το συντομότερο χρόνο ή την πιο αποτελεσματική χρήση των πόρων. Παράλληλα, ένας πειραματιστής μπορεί να αποφασίσει να μην εκτελέσει ένα πείραμα που ήταν προγραμματισμένο, αφού προτού έχουν γίνει γνωστές οι στατιστικές ιδιότητες του σχεδιασμού[93].

Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται, κατά κύριο λόγο, για την κατανόηση του εάν οι παράγοντες που έχουν επιλεγεί είναι σημαντικοί για τη διαδικασία. Το παραπάνω μπορεί να λάβει τη μορφή ελέγχου για λίγους σημαντικούς παράγοντες, ή χαρακτηρισμού του τρόπου με τον οποίο γνωστοί παράγοντες αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν μεμονωμένα τη διαδικασία. Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται συχνά ως αφετηρία για μία πιο σύνθετη μοντελοποίηση επιφανειών απόκρισης (πηγή: Design-Expert 12 Free Trial Version).

1.6.2.1 Σχεδιασμός Regular Two-Level Fractorial

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί με συντελεστές σε δύο επίπεδα αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους σχεδιασμούς στην πράξη. Για σταθερό αριθμό παραγόντων, εμφανίζουν μικρότερο μέγεθος εκτέλεσης από σχεδιασμούς σε περισσότερα από δύο επίπεδα. Αυτή η οικονομία μεγέθους εκτέλεσης τους καθιστά ελκυστικούς για τη μελέτη ενός μεγάλου πλήθους παραγόντων. Ένα θεμελιώδες ερώτημα το οποίο απορρέει είναι η επιλογή των κατάλληλων σχεδιασμών. Το κριτήριο της ελάχιστης εκτροπής χρησιμοποιείται, συνήθως, για την επιλογή των βέλτιστων σχεδιασμών[94]. Ακόμη, οι παραγοντικοί σχεδιασμοί δύο επιπέδων προσδιορίζονται συχνά ως προς τον καθορισμό των αντιθέσεων. Παρέχουν μία συνοπτική προδιαγραφή των πειραματικών δοκιμών στο σχεδιασμό και δίνουν μία πλήρη κατανόηση της αλλοίωσης της δομής του σχεδιασμού. Τέλος, οι σχεδιασμοί που μπορούν να προσδιοριστούν με καθοριστικές αντιθέσεις ορίζονται ως κανονικοί [95].

Η εκχύλιση είναι το τρίτο και πιο σημαντικό στάδιο για την ανάκτηση φυτοχημικών από φυτικές πρώτες ύλες. Πολλοί παράγοντες είναι σημαντικοί κατά την εκχύλιση φυτοχημικών με ορισμένους από αυτούς να είναι ο διαλύτης, η σύνθεση του διαλύτη, το pH, η αναλογία του διαλύτη προς στερεό, η θερμοκρασία και η πίεση. Η παραδοσιακή βελτιστοποίηση της εκχύλισης με διαλύτη διερευνά ένα παράγοντα κάθε φορά και γι' αυτό, αποτελεί μία χρονοβόρα και δαπανηρή προσέγγιση. Παράλληλα, τα αποτελέσματα δεν είναι ακριβή, αφού δεν είναι γνωστές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων. Το γεγονός αυτό θα οδηγούσε στην απόκτηση ψευδών βέλτιστων συνθηκών, παραβλέποντας τους πραγματικά σημαντικούς παράγοντες κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Προκειμένου να ξεπεραστεί το εν λόγω πρόβλημα, χρησιμοποιείται ως διαδικασία στατιστικού ελέγχου οι παραγοντικοί σχεδιασμοί δύο επιπέδων. Οι σχεδιασμοί αυτοί είναι χρήσιμοι για την εκτίμηση των κύριων, αλλά και των διαδραστικών επιδράσεων, κατά την εκχύλιση, με λίγες μόνο πειραματικές εκτελέσεις. Αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει το συγκεκριμένο είδος

παραγοντικού ελέγχου για τον έλεγχο των σημαντικών παραγόντων για την εκχύλιση φαινολικών και φλαβονοειδών από μάνγκο, παραπροϊόντα κρεμμυδιού, λιγνίνη από σπόρους λιναριού και πτητικές ενώσεις από άνθος σαφράν[96].

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και η βελτιστοποίηση μιας πράσινης διεργασίας εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από φυτική πρώτη ύλη, άγριο τριαντάφυλλο (και πιο συγκεκριμένα, το τμήμα του υπάνθιου), με τη χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES), ως εκχυλιστικό και αποθηκευτικό μέσο για τις βιοδραστικές ενώσεις, με στόχο την παραλαβή και αξιοποίηση εκχυλισμάτων για την ανάπτυξη καινοτόμων καλλυντικώνσκευασμάτων προστιθέμενης αξίας.

Η πρώτη ύλη που επιλέχθηκε αποτελεί καλλιέργεια ελληνικών κλώνων του φυτικού είδους *Rosa canina L.*, είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις και τα εκχυλίσματα αυτής βρίσκουν εφαρμογή, τόσο σε καλλυντικά, όσο και σε τρόφιμα. Η πρωτοτυπία της παρούσας μελέτης αποτελεί η χρήση εναλλακτικών πράσινων διαλυτών, όπως οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, κάτι το οποίο δεν έχει μελετηθεί ξανά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που διενεργήθηκε. Παράλληλα, τα εκχυλίσματα του άγριου τριαντάφυλλου θεωρούνται υψηλής και προστιθέμενης αξίας, καθώς είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες παραλαμβάνονται από το υπάνθιό του.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με σκοπό να προέρχονται από φυσικές πρώτες ύλες (όπως D,L-γαλακτικό οξύ, γλυκίνη, βεταΐνη κ.α.).

Από τους NaDES που σχεδιάστηκαν, επιλέχθηκαν δύο, Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό (1:2:2.5) και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό (1:5:21), ως καταλληλότεροι για τη διεξαγωγή των εκχυλίσεων του άγριου τριαντάφυλλου. Επιπρόσθετα, αφού ολοκληρώθηκαν τα προκαταρκτικά πειράματα για τη μελέτη της συμπεριφοράς του άγριου τριαντάφυλλου, η διεργασία της εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε, ως προς τις σημαντικότερες παραμέτρους (αναλογία διαλύτη προς μάζα πρώτης ύλης, χρόνος εκχύλισης, περιεκτικότητα σε νερό στο διαλύτη), με χρήση πειραματικού σχεδιασμού και για τους δύο διαθέσιμους διαλύτες. Ως μεταβλητές απόκρισης τέθηκαν το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), καθώς και την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, μέσω της μεθόδου υπολογισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH.

Έπειτα από την ολοκλήρωση των δύο πειραματικών σχεδιασμών, προσδιορίστηκε το βέλτιστο πείραμα εκχύλισης, το οποίο διεξήχθη και με εναλλακτική μέθοδο εκχύλισης και πιο συγκεκριμένα, μέσω εκχύλισης με χρήση υπερήχων. Επιπλέον, κρίθηκε σημαντικό τα βέλτιστα αποτελέσματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε να συγκριθούν με τα αποτελέσματα που προκύπτουν με εκχύλιση συμβατικών διαλυτών, όπως το νερό και το σύστημα αιθανόλης/νερού.

Τελικό στάδιο αποτελεί η παρασκευή καλλυντικής κρέμας, με ενσωμάτωση του βέλτιστου εκχυλίσματος (που προέκυψε από τη χρήση του εκχυλιστικού διαλύτη NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5) ως έχει, και χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και απομάκρυνση του διαλύτη. Η καλλυντική κρέμα αξιολογήθηκε ως προς

το pH, τη σταθερότητά της στο χρόνο και τη θερμοκρασία, καθώς επίσης διενεργήθηκε μελέτη αποδέσμευσης των βιοδραστικών ενώσεων.

2.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2 και 3) παρουσιάζεται συγκεντρωτικά το σύνολο των οργάνων, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών της παρασκευής των NaDES, της επιλογής των κατάλληλων NaDES, της εκχύλισης και του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων.

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

Όργανο	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (microplate reader)	BioTek	EPOCH 2
Αναδευτήρας Vortex	Lbx instruments	V05 series
Φυγόκεντρος	-	MSE
Πεχάμετρο	ΩMetrohm	744 pH Meter
Σύστημα Υπερήχων με probe	Sonics & Materials Inc. company	Vibra Cell probe sonicator (400 W)
Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού	Rotavapor R-114/ Waterbath B-480	Buchi
Μεμβράνη Διάλυσης-Διάχυσης	SERVA	SEPVAPOR® dialysis tubing, MWCO 12000-14000

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

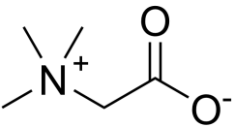
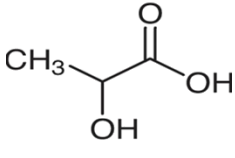
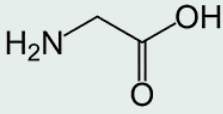
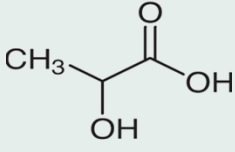
Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Προμηθευτής
Απιονισμένο νερό	H ₂ O	-
Γλυκίνη	C ₂ H ₅ NO ₂	Sigma-Aldrich
D,L-Γαλακτικό Οξύ	C ₃ H ₆ O ₃	Alfa Aesar
Βεταΐνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Alfa Aesar
Γλυκερόλη	C ₃ H ₈ O ₃	Kalo Chem
D-Μηλικό Οξύ	C ₄ H ₆ O ₅	Alfa Aesar
Γλυκόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma Aldrich

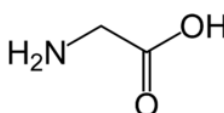
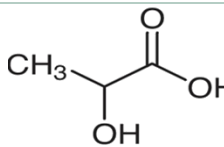
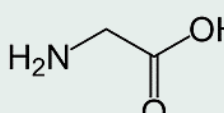
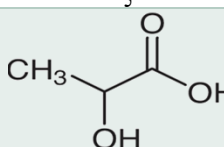
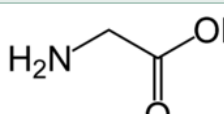
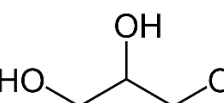
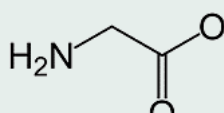
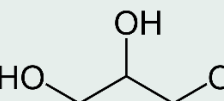
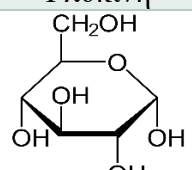
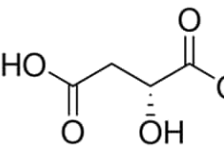
Κονιοποιημένο άγριο τριαντάφυλλο	-	ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ
DPPH	C ₁₈ H ₁₃ N ₅ O ₆	Aldrich
Αιθανόλη	C ₂ H ₆ O	Sigma-Aldrich
Ανθρακικό Νάτριο	Na ₂ CO ₃	Penta
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	-	Merck Millipore
Νιτρώδες Νάτριο	NaNO ₂	Sigma Aldrich
Χλωριούχο Αργίλιο	AlCl ₃	Sigma Aldrich
Υδροξείδιο του Νατρίου	NaOH	Alfa Aesar
Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma Aldrich
Γαλλικό Οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	Merck Millipore

2.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ NaDES

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται τα αρχικά συστατικά των επιμέρους NaDES. Η προσθήκη αυτών γίνεται σε συγκεκριμένες μοριακές αναλογίες, και πραγματοποιείται θέρμανση, υπό ανάδευση, σε εύρος θερμοκρασιών 50 έως 80 °C. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν σχηματιστεί ένα διαυγές και ομοιογενές υγρό. Οι διαλύτες NaDES που δοκιμάστηκε να παρασκευαστούν, καθώς και οι συνθήκες παρασκευής και οι αναλογίες των συστατικών τους, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Φυσικοί βαθέως ευηκτικοί διαλύτες που σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν.

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία			Δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμών υδρογόνου (HBD)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
	HBA	HBD	NEPO				
Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	2	2.5*	 Βεταΐνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	50	60
Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	3	3.8*	 Γλυκίνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	50	120

Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	5	6.2*	 Γλυκίνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	80	15	
Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	5	21	 Γλυκίνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	80	15	
Γλυκερόλη -Γλυκίνη- Νερό	7	1	3	 Γλυκίνη	 Γλυκερόλη	80	-	
Γλυκερόλη -Γλυκίνη- Νερό	3	1	3	 Γλυκίνη	 Γλυκερόλη	60	-	
Γλυκόζη-D Μηλικό Οξύ	1	1	-	 Γλυκόζη	 D-Μηλικό Οξύ	80	-	

*Η περιεκτικότητα σε νερό στις περιπτώσεις αυτών των NaDES οφείλεται στο D,L-Γαλακτικό Οξύ, το οποίο είναι υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 80% κατά βάρος.

**Η χρωματική αναπαράσταση του πίνακα υποδηλώνει την επιτυχία σχηματισμού των NaDES. Συγκεκριμένα, με το χρώμα πράσινο έχουν αναπαρασταθεί οι NaDES οι οποίοι σχηματίστηκαν επιτυχώς, και έπειτα από το χρόνο που αναφέρεται, αποτελούν διαυγή μίγματα. Με το χρώμα πορτοκαλί, απεικονίζονται οι διαλύτες που, ενώ αρχικά σχηματίστηκαν και διέθεταν διαυγή όψη, έπειτα από ορισμένο χρόνο, υπήρξε κατακρήση στερεού και όχι σταθερό μίγμα. Τέλος, με το χρώμα κόκκινο αναπαρίστανται οι διαλύτες που ακόμη και έπειτα από αρκετό χρόνο δε κατάφεραν να σχηματιστούν και να αποτελούν διαυγή μίγματα.

Από τους NaDES που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, αυτοί οι οποίοι σχεδιάστηκαν με επιτυχία και έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις και στη βελτιστοποίηση αυτών είναι ο NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και ο NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Η αναλυτική διαδικασία παρασκευής των διαλυτών αυτών αναφέρεται παρακάτω.

- Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5

Για την παρασκευή του συγκεκριμένου NaDES ζυγίζεται ποσότητα στερεής άνυδρης βεταΐνης (15.7 g, 134.2 mmol, MW: 117.15 g/mol) σε ζυγό ακριβείας και προστίθεται σε αυτήν κατάλληλη ποσότητα διαλύματος γαλακτικού οξέος (30.2 g, 335.5 mmol, 80% w/w, MW: 90.08 g/mol), η οποία αντιστοιχεί σε 25 mL υδατικού διαλύματος D,L-

γαλακτικού οξέος, 80% κατά βάρος. Η μοριακή αναλογία των δύο συστατικών είναι 1:2, ή εναλλακτικά επειδή χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος η αναλογία είναι 1:2:2.5. Τα δύο συστατικά τοποθετούνται εντός σφαιρικής φιάλης και το σύστημα αφήνεται υπό θέρμανση και ανάδευση στους 50 °C, μέχρις ότου να σχηματιστεί ένα διαυγές και ομοιογενές υγρό, δηλαδή για περίπου μία ώρα.

- Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21

Για την παρασκευή του συγκεκριμένου NaDES ζυγίζεται ποσότητα στερεής γλυκίνης (2.96 g, 39.5 mmol, MW: 75.07 g/mol) σε ζυγό ακριβείας και προστίθενται σε αυτή κατάλληλη ποσότητα διαλύματος γαλακτικού οξέος (22.24 g, 246.8 mmol, 80% w/w, MW: 90.08 g/mol), η οποία αντιστοιχεί σε 18.4 mL υδατικού διαλύματος D,L-γαλακτικού οξέος, 80% κατά βάρος, και κατάλληλη ποσότητα νερού (10.8 g, 599.3 mmol), σε ποσοστό 30% του συνολικού διαλύτη. Η μοριακή αναλογία των τριών συστατικών είναι 1:5:21. Τα τρία συστατικά τοποθετούνται εντός σφαιρικής φιάλης και το σύστημα αφήνεται υπό θέρμανση και ανάδευση στους 80 °C, μέχρις ότου να σχηματιστεί ένα διαυγές και ομοιογενές υγρό, δηλαδή για περίπου 15 λεπτά.

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 5 και 6) παρουσιάζεται η διαδικασία σχηματισμού των NaDES εργαστηριακά, καθώς και οι NaDES όταν είναι πλέον σχηματισμένοι.



Εικόνα 5: Διαδικασία παρασκευής διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.



Εικόνα 6: Τελικό αποτέλεσμα διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

2.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ NaDES

2.4.1 ΜΕΤΡΗΣΗ pH NaDES

Η μέτρηση του pH διεξάγεται, τόσο στο NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, όσο και στο NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Σκοπός της συγκεκριμένης μέτρησης είναι ο προσδιορισμός της τιμής του pH και η κατασκευή της καμπύλης του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας του NaDES σε υδατικό μέσο. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα των δύο NaDES σε περιεκτικότητες 100%, 75%, 50%, 30% και 20%, κατά βάρος το καθένα. Η αρχική ποσότητα του εκάστοτε NaDES που χρησιμοποιείται είναι 4 g και έπειτα, σταδιακά προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε να παρασκευαστούν τα κατάλληλα διαλύματα γνωστής περιεκτικότητας. Τέλος, αφού έχει διεξαχθεί το καλλιμπάρισμα του οργάνου, μετριέται η τιμή του pH, τόσο των καθαρών NaDES, όσο και των διαφόρων διαλυμάτων τους, γνωστών περιεκτικότητων κατά βάρος[97]–[100].

2.4.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ NaDES

Η πολικότητα των NaDES υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το δείκτη Ερυθρό του Νείλου (διάλυμα Nile red σε απόλυτη αιθανόλη: 0.1 mM) ως διαλυτοχρωμικό ανιχνευτή.

Κατάλληλη ποσότητα του NaDES (≈ 2 mL) προστίθεται σε κυψελίδα 1 mm και πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού, UV-Vis, στην περιοχή 400-700 nm (τυφλό δείγμα). Εν συνέχεια, προστίθεται στο διαλύτη κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος Nile red (30-70 μ L) και έπειτα από πολύ καλή ανάδευση του συστήματος, προσδιορίζεται η μέγιστη απορρόφησή του (λ_{max}) στην περιοχή 400-700 nm. Η ενέργεια μοριακής μετάβασης E_{NR} υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση (Εξίσωση 3)[97], [100]–[104].

$$E_{NR} \left(\frac{kcal}{mol} \right) = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad (3)$$

Οι υψηλές τιμές ενέργειας μοριακής μετάβασης, E_{NR} , υποδεικνύουν χαμηλότερη πολικότητα των ελεγχόμενων διαλυτών. Αντίθετα, οι χαμηλές τιμές αυτής υποδηλώνουν υψηλότερη πολικότητα στην κλίμακα πολικότητας του κόκκινου του Νείλου.

2.5 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΜΕ NaDES

Γενική μέθοδος εκχύλισης με χρήση NaDES

Κατά την εκχύλιση με χρήση NaDES, ως εκχυλιστικό μέσο, σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται 3 g εκχυλιστικού μέσου (NaDES με ή χωρίς κατάλληλη ποσότητα νερού), καθώς και την κατάλληλη ποσότητα αλεσμένου υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου. Εν συνέχεια, το σκεύος μεταφέρεται σε ελαιόλουτρο, το οποίο έχει ήδη προθερμανθεί και η θερμοκρασία του έχει σταθεροποιηθεί στην επιθυμητή τιμή. Το σκεύος παραμένει υπό θέρμανση και ανάδευση για ορισμένη χρονική διάρκεια. Έπειτα από το πέρας του

χρόνου αυτού, το σκεύος απομακρύνεται από το ελαιόλουτρο και το δείγμα μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο φυγοκέντρισης. Ακολουθεί φυγοκέντριση αυτού για 20 min στις 7000 στροφές. Μετά το πέρας των 20 min, έχει επέλθει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων και έτσι, λαμβάνεται το επιθυμητό εκχύλισμα, χωρίς την παρουσία στερεού. Τέλος, το λαμβανόμενο εκχύλισμα αποθηκεύεται στους 4 °C μέχρις ότου να χαρακτηριστεί με βάση τις μεθόδους που αναφέρονται σε παρακάτω υποενότητα (§2.10).

Προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά της πρώτης ύλης, η επίδραση της θερμοκρασίας, της αναλογίας πρώτης ύλης-διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης και της περιεκτικότητας σε νερό του διαλύτη, πραγματοποιούνται δύο σειρές προκαταρκτικών πειραμάτων με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό. Βάσει των αποτελεσμάτων των σειρών αυτών, έπειτα, πραγματοποιείται η βελτιστοποίηση της διεργασίας, επιλέγοντας τα κατάλληλα όρια συνθηκών.

Αναφορικά με το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, τα προκαταρκτικά πειράματα εκχυλίσεων που αφορούν το συγκεκριμένο διαλύτη είναι ίσα με 7 και αναγράφονται οι επιλεγόμενες συνθήκες τους στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Προκαταρκτικά πειράματα για εκχύλιση με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη
DN11	1	0	100
DN16	4	0	100
DN17	1	0	100
DN22	1	0	100
DN33	1	30	100
DN38	1	30	300
DN39	1	30	500

Ομοίως, διεξήχθησαν και προκαταρκτικά πειράματα για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας, του χρόνου εκχύλισης, της αναλογίας πρώτης ύλης/διαλύτη και για το ποσοστό νερού στο διαλύτη. Ο αριθμός των προκαταρκτικών πειραμάτων στην περίπτωση αυτή είναι ίσος με 12 και οι επιλεγόμενες συνθήκες των πειραμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Προκαταρκτικά πειράματα για εκχύλιση με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη
DN14	1	40	0	100
DN19	1	40	7	100
DN21	1	40	0	100
DN23	6	40	0	100
DN24	1	40	0	100
DN25	1	60	0	100
DN27	1	40	25	100
DN29	1	40	60	100
DN30	1	40	25	100
DN31	1	40	30	100
DN34	1	40	30*	100
DN40	3	40	30	100

*Το αναφερόμενο ποσοστό νερού στο συγκεκριμένο πείραμα προστέθηκε εξ'αρχής κατά την παρασκευή του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό.

2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΪΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:2:2.5

Έπειτα από την πραγματοποίηση των εκχυλίσεων, τα εκχυλίσματα χαρακτηρίζονται με βάση: α) τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων με χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, β) τον προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων με τη μέθοδο χλωριούχου αργιλίου και γ) τη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ρίζας DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων, καθορίζονται τα μετέπειτα εύρη τιμών των πειραματικών παραμέτρων που χρησιμοποιούνται στον πειραματικό σχεδιασμό. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα από τα 7 προκαταρκτικά πειράματα που αφορούν το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 είναι αυτά που καθορίζουν τις τιμές των πειραματικών παραμέτρων του πρώτου πειραματικού σχεδιασμού και διέπουν μία σειρά εκχυλίσεων, τα αποτελέσματα της οποίας θα αναλυθούν στατιστικά, με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης, μέσω πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εξετάζονται είναι:

- Ο χρόνος εκχύλισης στο ελαιόλουτρο (x_1)
- Το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο (x_2)
- Η αναλογία της μάζας της πρώτης ύλης προς τη μάζα του διαλύτη (x_3)

Για κάθε μία από τις παραπάνω μεταβλητές ορίζονται τρεις τιμές (3^3 πειραματικός σχεδιασμός), οι οποίες περιγράφονται από τα σύμβολα -, 0 και +, κατά αύξουσα σειρά.

- Αναφορικά με τη μεταβλητή x₁:
 - - → 30 min
 - 0 → 135 min
 - + → 240 min
- Αναφορικά με τη μεταβλητή x₂:
 - - → 50 (% νερού)
 - 0 → 30 (% νερού)
 - + → 10 (% νερού)
- Αναφορικά με τη μεταβλητή x₃:
 - - → 100 (100 mg / 3 g)
 - 0 → 300 (300 mg / 3 g)
 - + → 500 (500 mg / 3 g)

Οι τρεις παράμετροι επιλέχθηκαν με βάση τη σημασία τους, καθώς κρίθηκαν ως οι πιο σημαντικές προς μελέτη για τη διεργασία της εκχύλισης, βάσει των αποτελεσμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων. Οι μεταβλητές απόκρισης είναι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ρίζας DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζονται αναλυτικά τα 17 πειράματα εκχύλισεων που διεξήχθησαν με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken και με βάση τα εύρη των πειραματικών παραμέτρων, όπως αυτά ορίστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 7: Συνθήκες και κωδικοποίηση των πειραμάτων εκχύλισης του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Συμβολισμός κατά Box-Behnken	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%) (x ₂)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₃)
DN42	0-+	135	50	100
DN43	+0+	240	30	100
DN44	-0+	30	30	100
DN45	000	135	30	300
DN46	000	135	30	300
DN47	+0	240	50	300
DN48	000	135	30	300
DN49	0--	135	50	500
DN50	+0-	240	30	500
DN51	++0	240	10	300
DN52	0++	135	10	100
DN53	0+-	135	10	500
DN54	000	135	30	300
DN55	000	135	30	300
DN56	--0	30	10	300
DN57	--0	30	50	300
DN58	-0-	30	30	500

2.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:5:21

Όμοια με την Ενότητα 2.6, από τα αποτελέσματα των 12 προκαταρκτικών πειραμάτων με το NaDES Γλυκίνη-Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21, καθορίζονται οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων του δεύτερου πειραματικού σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα αυτά διέπουν μία ακόμα σειρά εκχυλίσεων, τα αποτελέσματα της οποίας θα αναλυθούν στατιστικά, με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης, μέσω παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού δύο επιπέδων. Στην περίπτωση αυτή, μέσω των προκαταρκτικών πειραμάτων βρέθηκε το κατάλληλο ποσοστό νερού, το οποίο πρέπει να προστεθεί στο διαλύτη και αυτό προστέθηκε εξ' αρχής στην παρασκευή του NaDES. Συνεπώς, στον παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων δεν υπάρχει η πειραματική παράμετρος του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, αλλά το εκχυλιστικό μέσο είναι ο NaDES που στην παρασκευή του έχει προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα νερού.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εξετάζονται είναι:

- Ο χρόνος εκχύλισης στο ελαιόλουτρο (x_1)
- Η αναλογία της μάζας της πρώτης ύλης προς τη μάζα του διαλύτη (x_2)

Στην περίπτωση του παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού δεν ορίζονται τρεις τιμές όπως προηγουμένως, αλλά μόνο δύο τιμές που συμβολίζονται με – και +, κατά αύξουσα σειρά.

- Αναφορικά με τη μεταβλητή x_1 :
 - - → 30 min
 - + → 240 min
- Αναφορικά με τη μεταβλητή x_2 :
 - - → 70 (70 mg / 3 g)
 - + → 400 (400 mg / 3g)

Οι δύο αυτές παράμετροι επιλέχθηκαν με βάση τη σημασία τους, καθώς κρίθηκαν ως οι πιο σημαντικές προς μελέτη για τη διεργασία της εκχύλισης, βάσει των αποτελεσμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων. Η αναλογία του νερού παρέμεινε σταθερή, γεγονός που αιτιολογείται από τα προκαταρκτικά πειράματα και τα πειράματα που διεξήχθησαν κατά τη σύνθεση και παρασκευή του συγκεκριμένου NaDES. Το συγκεκριμένο ποσοστό νερού που επιλέχθηκε βρέθηκε να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στα προκαταρκτικά πειράματα, συγκριτικά με άλλα ποσοστά νερού που δοκιμάστηκαν και παράλληλα, η συγκεκριμένη περιεκτικότητα νερού ήταν καθοριστική για τη σταθερότητα του NaDES. Οι μεταβλητές απόκρισης, και σε αυτό τον πειραματικό σχεδιασμό, είναι το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων και η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης ρίζας DPPH για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρουσιάζονται αναλυτικά τα 8 πειράματα εκχύλισεων που διεξήχθησαν με βάση τον παραγοντικό πειραματικό σχεδιασμό και με βάση τα εύρη των πειραματικών παραμέτρων, όπως αυτά ορίστηκαν παραπάνω.

Πίνακας 8: Συνθήκες και κωδικοποίηση των πειραμάτων εκχύλισης του παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού δύο επιπέδων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	Κωδικοποιημένη μορφή	Χρόνος εκχύλισης (min) (x1)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg) / 3 g διαλύτη (x2)
DN60	++	30	70
DN61	--	30	400
DN63	++	240	70
DN64	+-	240	400
DN65	+-	240	400
DN66	++	240	70
DN67	--	30	400
DN68	++	30	70

2.8 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΓΡΙΟΥ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ NaDES ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Έπειτα από τη διεξαγωγή, τόσο των προκαταρκτικών πειραμάτων, όσο και των δύο πειραματικών σχεδιασμών, πραγματοποιούνται δύο εκχύλισεις με χρήση τεχνικής υψηλής ενέργειας και πιο συγκεκριμένα, με χρήση υπερήχων, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στη Γενική μέθοδο. Οι συνθήκες των δύο εκχύλισεων επιλέγονται κατάλληλα βάσει των πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί και ειδικότερα, οι συνθήκες είναι εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν σε ορισμένα από τα πειράματα επιβεβαίωσης των μοντέλων του πειραματικών σχεδιασμών (βλ. § 3.3.3.6 και 3.3.4.6). Παράλληλα, να σημειωθεί πως οι συνθήκες αυτές αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση άγριου τριαντάφυλλου με χρήση NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 (Πίνακας 9).

Γενική μέθοδος εκχύλισης με χρήση NaDES και υπερήχους

Κατά τη διεργασία της εκχύλισης με χρήση υπερήχων, σε γυάλινο σκεύος προστίθεται 3 g εκχυλιστικού μέσου (NaDES με ή χωρίς κατάλληλη ποσότητα νερού), καθώς και η κατάλληλη ποσότητα αλεσμένου υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου. Εν συνεχεία, το σκεύος μεταφέρεται σε παγόλουτρο, ώστε να παρέχεται συνεχής ψύξη στο μίγμα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με χρήση υπερήχων και έπειτα, τοποθετείται στο probe των υπερήχων. Να σημειωθεί πως, το probe των υπερήχων πρέπει να είναι βυθισμένο στο δείγμα, ωστόσο δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με τον πυθμένα του σκεύους, διότι αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει τη θραύση του. Επιλέγεται ισχύς ίση με το 30% της μέγιστης κατασκευαστικής ισχύος του οργάνου, δηλαδή 120 Watt, και ως παλμός ακτινοβολήσης 6":2". Μετά το πέρας της εκχύλισης, το δείγμα παραλαμβάνεται και μεταφέρεται σε κατάλληλα φιαλίδια φυγοκέντρισης και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 7000 στροφές. Το τελικό εκχύλισμα παραλαμβάνεται με χρήση πιπέτας και

αποτελεί το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρισης. Τέλος, φυλάσσεται σε γυάλινα φιαλίδια σε σκοτεινό μέρος υπό ψύξη στους 4 °C.

Πίνακας 9: Συνθήκες εκχυλίσεων με χρήση NaDES και υπερήχων.

Κωδικός πειράματος	NaDES	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη
DN72	Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5*	30	50	101.4
DN73	Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	30	-**	101.4

*Για την παρασκευή του NaDES χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα D,L-γαλακτικού οξέος, γι' αυτό παρουσιάζεται η συγκεκριμένη αναλογία.

**Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν εξετάζεται ως ανεξάρτητη μεταβλητή το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, καθώς το νερό υφίσταται ως συστατικό στο NaDES.

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 7 και 8) παρουσιάζονται η συσκευή υπερήχων με probe, καθώς και το δείγμα που εκχυλίζεται στη συσκευή.



Εικόνα 7: Συσκευή υπερήχων με probe.



Εικόνα 8: Δείγμα προς εκχύλιση εντός της συσκευής υπερήχων.

2.9 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με χρήση συμβατικών διαλυτών. Πιο συγκεκριμένα, διεξάγονται εκχυλίσεις με χρήση ως διαλύτη νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού σε αναλογία 70:30 (70% αιθανόλη και 30% νερό).

Γενική μέθοδος εκχύλισης με χρήση συμβατικών διαλυτών

Κατά την εκχύλιση με χρήση συμβατικών διαλυτών η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή που παρουσιάζεται στη Γενική μέθοδο εκχύλισης με χρήση NaDES, η οποία περιγράφεται στην Ενότητα 2.5. Η διαφοροποίηση των δύο μεθόδων είναι το επιλεγόμενο εκχυλιστικό μέσο, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι συμβατικοί διαλύτες, νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού. Εκτός της επιλογής του διαλύτη, οι εκχυλίσεις με χρήση συμβατικών διαλυτών έχουν ορισμένα επιπρόσθετα στάδια μετά το πέρας της εκχύλισης. Αφού πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος από το στερεό, μέσω φυγοκέντρισης, έπειτα, ακολουθεί εξάτμιση για την απομάκρυνση των διαλυτών και ακολούθως, ξήρανση. Τα ξηρά, πλέον, εκχυλίσματα επαναδιαλυτοποιούνται με νερό ή σύστημα αιθανόλης/νερού, αντίστοιχα, και αποθηκεύονται στους 4 °C μέχρι να χαρακτηριστούν με τις μεθόδους που αναφέρονται στην Ενότητα 2.10.

Οι συνθήκες διεξαγωγής των εκχυλίσεων προκύπτουν μέσω των βέλτιστων πειραμάτων των πειραματικών σχεδιασμών, όπως αυτά προκύπτουν από το λογισμικό Design-Expert 12 (Free Trial Version). Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι εκχυλίσεις παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10).

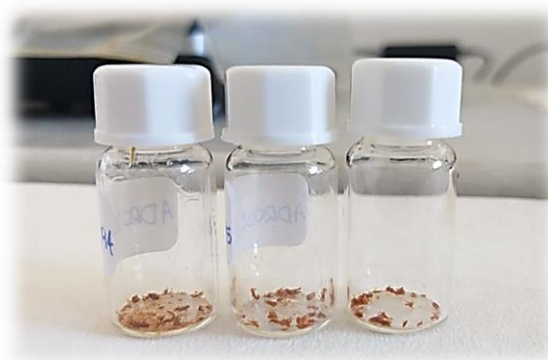
Πίνακας 10: Συνθήκες εκχυλίσεων με χρήση συμβατικών διαλυτών.

Κωδικός πειράματος	Διαλύτης εκχύλισης	Ποσότητα διαλύτη (g)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη
DN82	EtOH/H ₂ O	3	177	101.4
DN83	EtOH/H ₂ O	3	240	70
DN84	H ₂ O	3	177	101.4
DN85	H ₂ O	3	240	70

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 9), παρουσιάζεται ο εξοπλισμός ο οποίος χρησιμοποιείται για την εξάτμιση των διαλυτών της εκχύλισης. Στις επόμενες εικόνες (Εικόνα 10 και 11), φαίνονται τα ξηρά, καθώς και το επαναδιαλυτοποιημένα εκχυλίσματα.



Εικόνα 9: Περιστροφικός εξάτμιστήρας.



Εικόνα 10: Ξηρά εκχυλίσματα έπειτα από την εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης.



Εικόνα 11: Επαναδιαλυτοποιημένα εκχυλίσματα έπειτα από προσθήκη νερού ή συστήματος αιθανόλης/νερού.

2.10 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

2.10.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TPC) ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων γίνεται μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ. Αρχικά, παρασκευάζεται το stock του εκχυλίσματος, το οποίο αποτελεί μία αραιώση του εκχυλίσματος με απιονισμένο νερό. Ανάλογα με το εκάστοτε εκχύλισμα επιλέγεται και διαφορετική αναλογία αυτού ως προς το νερό. Έπειτα, σε ένα δοχείο Eppendorf των 2 mL, προστίθεται 1 mL απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, καθώς και 20 μ L stock δείγματος. Παρασκευάζεται, ακόμη, και το τυφλό διάλυμα, το οποίο περιέχει 20 μ L απιονισμένο νερό, αντί για stock δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση με χρήση Vortex, μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως το δείγμα. Εν συνεχεία, προστίθεται ποσότητα ίση με 100 μ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και ακολουθεί αναμονή για 5 min σε σκοτεινό μέρος. Μετά το πέρας των 5 min, γίνεται προσθήκη 300 μ L κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , καθώς και 580 μ L απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού και ακολουθεί ανάδευση σε Vortex με σκοπό την πλήρη ομογενοποίηση[56], [64], [105].

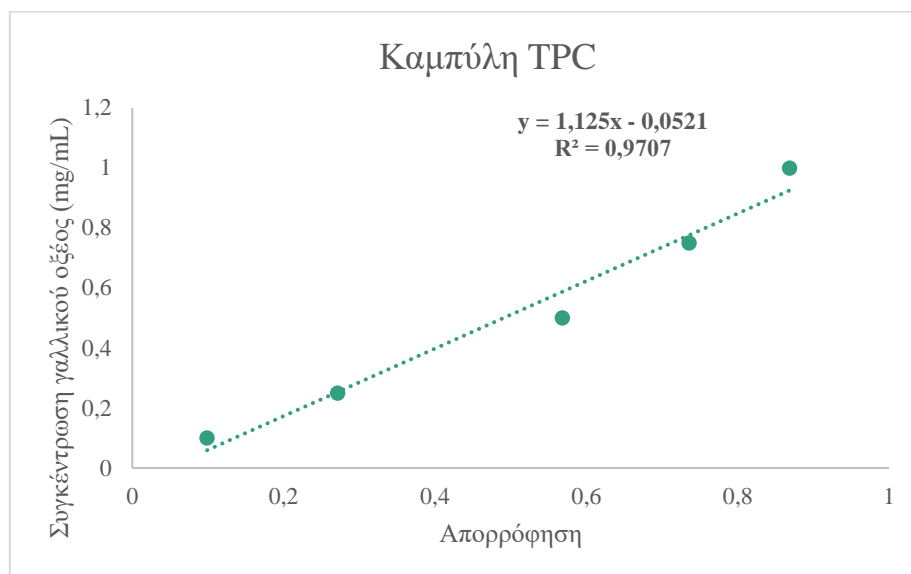
Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή, τα δείγματα παραμένουν για μία ώρα σε σκοτεινό μέρος. Στη συνέχεια, μετρείται η απορρόφησή τους σε μήκος κύματος ίσο με 755 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων που προκύπτουν από τα εκχυλίσματα προκύπτει μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 4).

$$A = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} \quad (4)$$

Όπου A_{sample} ορίζεται ως η απορρόφηση του δείγματος που περιέχει εκχύλισμα και A_{blank} ορίζεται ως η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα, τόσο από τα εκχυλίσματα, όσο και από το τυφλό διάλυμα, παρασκευάζονται εις τριπλούν, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και τον περιορισμό του σφάλματος. Συνεπώς, στους υπολογισμούς λαμβάνονται οι μέσες τιμές των εκάστοτε μετρήσεων απορρόφησης κάθε δείγματος.

Με ίδια μέθοδο με αυτή που περιγράφεται παραπάνω, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος συναρτήσει της απορρόφησής του σε μήκος κύματος ίσο με 755 nm (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

Η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς αυτού είναι η παρακάτω (Εξίσωση 5).

$$C_{\text{gallic acid}} = 1.125 \cdot A - 0.0521 \quad (5)$$

Όπου A η απορρόφηση του κάθε δείγματος.

Μέσω της εξίσωσης αυτή προκύπτει η ισοδύναμη συγκέντρωση σε γαλλικό οξύ, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι η ένωση αναφοράς που επιλέχθηκε.

Το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 6).

$$TPC \left(\frac{mg_{eq\ GA}}{g_{WR}} \right) = \frac{C_{\text{gallic acid eq}} \left(\frac{mg_{gal}}{L} \right) \cdot V_{ext}(L) \cdot DF}{m_{WR}(g)} \quad (6)$$

Όπου:

$C_{\text{gallic acid eq}}$: η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος όπως αυτή υπολογίζεται από την Εξίσωση (5) (mg_{gal}/L) (της καμπύλης αναφοράς),

V_{ext} : ο όγκος του εκχυλίσματος (L),

DF: ο παράγοντας αραιώσης (Dilution factor),

m_{WR} : η μάζα του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση (g).

2.10.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (TFC) ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Η μέτρηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων γίνεται μέσω της μεθόδου του χλωριούχου αργιλίου με μικρές τροποποιήσεις στις ποσότητες και ως ένωση αναφοράς επιλέχθηκε η κατεχίνη. Αρχικό στάδιο στη συγκεκριμένη μέτρηση αποτελεί η παρασκευή των stocks των εκχυλισμάτων, τα οποία παρασκευάζονται από το εκχύλισμα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού, με σκοπό τη δημιουργία δείγματος συγκεκριμένης αραιώσης. Έπειτα, σε ένα δοχείο Eppendorf 1.5 mL, προστίθενται 50 μL από τα stocks και 30 μL NaNO_2 5%. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση 6 min. Εν συνεχεία, προστίθενται 60 μL AlCl_3 και τα δείγματα αναδεύονται με χρήση Vortex και αφήνονται για επώαση ακόμα 5 min. Μετά το πέρας των 5 min, γίνεται προσθήκη 300 μL NaOH , 1 M και 560 μL απεσταγμένο νερό και τα δείγματα αναδεύονται με χρήση Vortex[36], [83], [106].

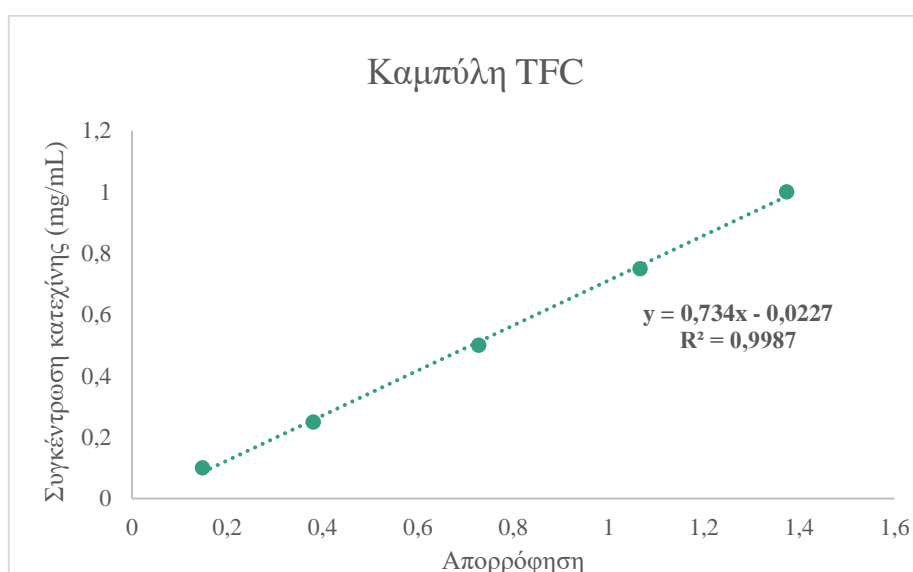
Το σύστημα αφήνεται για επώαση 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτεινό μέρος. Τελικά, μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος ίσο με 500 nm μέσω φασματοφωτόμετρου UV-Vis. Η πραγματική απορρόφηση των δειγμάτων που προκύπτουν από τα εκχυλίσματα προκύπτει μέσω της Εξίσωσης (4).

$$A = A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} \quad (4)$$

Όπου A_{sample} ορίζεται ως η απορρόφηση του δείγματος που περιέχει εκχύλισμα και A_{blank} ορίζεται ως η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα, τόσο από τα εκχυλίσματα, όσο και από το τυφλό διάλυμα, παρασκευάζονται εις τριπλούν, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και τον περιορισμό του σφάλματος. Συνεπώς, στους υπολογισμούς λαμβάνονται οι μέσες τιμές των εκάστοτε μετρήσεων απορρόφησης κάθε δείγματος.

Με ίδια μέθοδο με αυτή που περιγράφεται παραπάνω, κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης συναρτήσεως της απορρόφησης του σε μήκος κύματος ίσο με 500 nm (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς κατεχίνης.

Η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς αυτού είναι η παρακάτω (Εξίσωση 7).

$$C_{\text{catechin}} = 0.734 \cdot A - 0.0227 \quad (7)$$

Όπου A η απορρόφηση του κάθε δείγματος. Μέσω της εξίσωσης αυτή προκύπτει η ισοδύναμη συγκέντρωση σε κατεχίνη, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι η ένωση αναφοράς που επιλέχθηκε.

Το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις προκύπτει μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 8).

$$TFC \left(\frac{mg_{\text{cat}}}{g_{WR}} \right) = \frac{C_{\text{catechin eq}} \left(\frac{mg_{\text{cat}}}{L} \right) \cdot V_{\text{ext}} \cdot DF}{m_{WR} (g)} \quad (8)$$

Όπου:

$C_{\text{catechin eq}}$: η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε ισοδύναμα κατεχίνης όπως αυτή υπολογίζεται από την Εξίσωση (7) (mg_{cat}/L) (της καμπύλης αναφοράς),

V_{ext} : ο όγκος του εκχυλίσματος (L),

DF: ο παράγοντας αραιώσης (Dilution factor),

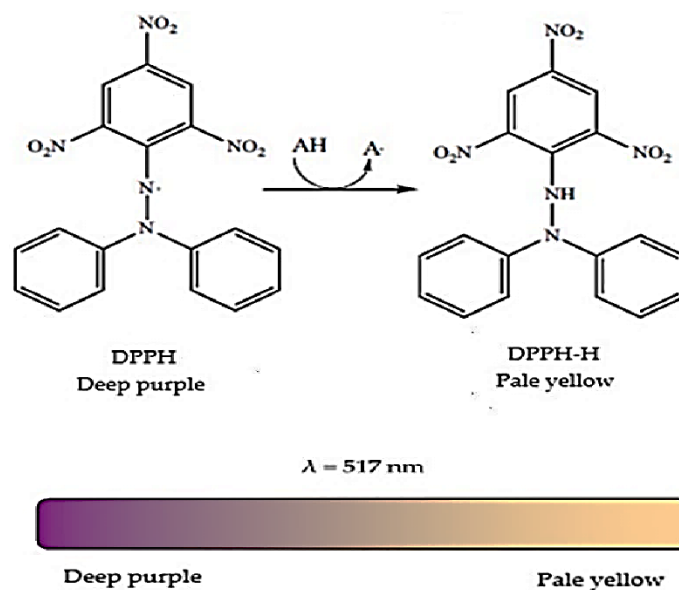
m_{WR} : η μάζα του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση (g).

2.10.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να αναστείλουν την έναρξη ή τη διάδοση οξειδωτικών αλυσιδωτών αντιδράσεων που δημιουργούνται από αντιδραστικές ελεύθερες ρίζες, προτού καταστραφούν τα ζωτικά μόρια. Οι τρέχουσες μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης βασίζονται στο φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό μέσω μηχανισμών μεταφοράς ατόμου υδρογόνου και μεταφοράς απλών ηλεκτρονίων. Μεταξύ αυτών των δοκιμών προσδιορισμού, η ανάλυση DPPH είναι απλή και μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Η ρίζα DPPH είναι μία π-ρίζα, η οποία υφίσταται σε μορφή μονομερούς σε στερεή κατάσταση, καθώς και σε διάλυμα. Η ρίζα αυτή είναι διαλυτή σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, αλλά όχι στο νερό. Συνήθως, διαλύεται σε μεθανόλη, αιθανόλη ή στα υδατικά μίγματα τους.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση DPPH καλείται μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH, ή εναλλακτικά της ρίζας 2,2-δι-(4-tert-οκτυλφαινυλο)-1-πικρυλδραζιλίου, και βασίζεται στη μείωση της βιολετί ρίζας DPPH από το αντιοξειδωτικό, μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς ατόμου υδρογόνου που προκαλεί μία αλλαγή στο χρώμα σε σταθερά κίτρινα μόρια DPPH. Ο αποχρωματισμός αυτός λειτουργεί ως δείκτης αντιοξειδωτικής δράσης. Η εναπομείνασα ιώδης ρίζα DPPH μετριέται με φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος που κυμαίνεται μεταξύ 515 και 520

nm, με στόχο να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική δράση, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 14). Η ρίζα DPPH δεν είναι μία φυσική ρίζα, ωστόσο, ο μηχανισμός αντίδρασης με αντιοξειδωτικά είναι παρόμοιος με αυτόν με τις ρίζες υπεροξυλίου $\text{ROO}\cdot$ [46], [107], [108].



Σχήμα 13: Μεταβολή της ρίζας του DPPH, καθώς και του χρώματος αυτής [108].

Η εφαρμογή αυτής της δοκιμής επιτρέπει την κατανόηση των διαφόρων χημικών φαινομένων και έχει προφανή πλεονεκτήματα, όπως χαμηλό κόστος, ευκολία εκτέλεσης πειραμάτων, αναπαραγωγιμότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς και δυνατότητες αυτοματισμού. Το γεγονός αυτό αιτιολογεί το ότι η επιστημονική κοινότητα εξακολουθεί να εφαρμόζει τη συγκεκριμένη μέθοδο και εργάζεται για τη βελτιστοποίηση/τυποποίηση πρωτοκόλλων για την παραγωγή σημαντικών και συγκρίσιμων αποτελεσμάτων [108].

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH, ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg της ρίζας DPPH, τα οποία διαλύονται εντός ογκομετρικής φιάλης σε αιθανόλη μέχρι τελικό όγκο 50 mL. Εν συνεχεία, το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως σε μαγνητικό αναδευτήρα, χωρίς την παρουσία θέρμανσης. Έπειτα, το διάλυμα φυλάγεται ερμητικά κλειστό και απουσία φωτός υπό ψύξη, σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 4 °C. Αξίζει να τονιστεί πως το διάλυμα δεν αποθηκεύεται για διάστημα πολλών ωρών και χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί άμεσα, ώστε να αποφευχθεί η αυτοαναγωγή της ρίζας. Για το λόγο αυτό, κιάλας, φυλάγεται στις συγκεκριμένες συνθήκες που αναφέρθηκαν.

Ακολουθώς, πραγματοποιείται η δημιουργία των διαλυμάτων των εκχυλισμάτων (stock). Για την παρασκευή των stocks λαμβάνεται συγκεκριμένη ποσότητα από τα εκχυλίσματα και αραιώνεται με ποσότητα απιονισμένου νερού. Αναλυτικότερα, ανάλογα με τις συνθήκες της εκάστοτε εκχύλισης, την ποσότητα υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και με το διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, επιλέγεται διαφορετική ποσότητα εκχυλίσματος και τελικά, παρασκευάζονται stocks διαφορετικής αρχικής συγκέντρωσης. Στα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου, παρασκευάζονται stocks συγκέντρωσης 0.15 %, τόσο για

διαλύτη το DES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, όσο και για διαλύτη το DES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Η παρασκευή των συγκεκριμένων stock γίνεται μέσω διαδοχικών αραιώσεων. Αρχικά, λαμβάνονται 15 μL από το κάθε εκχύλισμα, τα οποία προστίθενται σε 985 μL απιονισμένου νερού και έπειτα, από το συγκεκριμένο διάλυμα λαμβάνονται 100 μL και προστίθενται σε 900 μL απιονισμένου νερού. Ομοίως, για τα εκχυλίσματα με τη μικρότερη ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου παρασκευάζονται stocks συγκέντρωσης 0.5 %, πάλι μέσω διαδοχικών αραιώσεων, με προσθήκη 50 μL εκχυλίσματος σε 950 μL απιονισμένου νερού και έπειτα, με προσθήκη 100 μL του διαλύματος αυτού σε 900 μL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, διεξάγεται η πλήρωση του plate 96 θέσεων, τοποθετώντας σε κάθε κυψελίδα 100 μL διαλύματος εκχυλίσματος (σε κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα) και 100 μL διαλύματος DPPH, το οποίο παρασκευάζεται όπως αναφέρεται παραπάνω. Τα stocks διαλύματα των εκχυλισμάτων έχουν υποστεί αραιώση με απιονισμένο νερό, κατά τέτοιο τρόπο ώστε στο plate να υπάρχουν διαλύματα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C (0.15 ή 0.5 %), 0.8C, 0.6C, 0.4C και 0.2C. Για παράδειγμα, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης C, τοποθετούνται 100 μL του αντίστοιχου stock και 100 μL διαλύματος DPPH, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0.8C τοποθετούνται 80 μL του stock, 20 μL απιονισμένο νερό και 100 μL διαλύματος DPPH, σε κυψελίδα που περιέχει διάλυμα εκχυλίσματος συγκέντρωσης 0.6C τοποθετούνται 60 μL του stock, 40 μL απιονισμένο νερό και 100 μL διαλύματος DPPH, κ.ο.κ.

Επιπρόσθετα, παρασκευάζονται και τυφλά διαλύματα. Τα τυφλά διαλύματα είναι: ένα που αποτελείται από 100 μL απιονισμένου νερού και 100 μL διαλύματος DPPH, ένα που αποτελείται αποκλειστικά από 200 μL διαλύματος DPPH και ένα που αποτελείται αποκλειστικά από 200 μL απιονισμένου νερού. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τόσο τα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα, όσο και τα τυφλά διαλύματα, παρασκευάζονται εις τριπλούν και μόνο ορισμένες αραιώσεις δειγμάτων εις διπλούν (C, 0.8C και 0.6C εις διπλούν). Βάσει του παραπάνω, στους υπολογισμούς υπεισέρχονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων που λαμβάνονται.

Αφού πληρωθεί το plate με τα τυφλά διαλύματα και τα δείγματα, καθώς και το διάλυμα DPPH, στις ποσότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ακολουθεί επώαση των διαλυμάτων για 15, 30, 45 και 60 min σε σκοτεινό χώρο. Στους χρόνους αυτούς μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων σε τιμές απορρόφησης, κατασκευάζεται το διάγραμμα της επί τοις εκατό αναστολής (inhibition) της ρίζας DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης των δειγμάτων των κυψελίδων (μL εκχυλίσματος/ mL δείγματος). Η ποσοστιαία αναστολή ορίζεται μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 9).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \quad (9)$$

Όπου ως A_{blank} ορίζεται η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων απιονισμένου νερού/DPPH και ως A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που περιέχουν εκχύλισμα.

Η προκύπτουσα γραφική παράσταση αποτελεί μία ευθεία γραμμή θετικής κλίσης. Μέσω αυτής πραγματοποιείται γραφικός υπολογισμός της συγκέντρωσης δείγματος εκχυλίσματος που επιτυγχάνει μείωση της απορρόφησης του DPPH κατά 50% (IC_{50}). Η συγκέντρωση αυτή δίνεται μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Εξίσωση 10).

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (10)$$

Όπου ως b ορίζεται η αποτέμνουσα της ευθείας και a η κλίση αυτής.

Τέλος, με εντελώς όμοιο τρόπο διεξάγεται η μέτρηση προτύπου, ασκορβικού οξέος, γνωστής συγκέντρωσης αιθανολικού διαλύματος, ίσης με 1 mg/ 50 mL. Αρχικά, πληρώνεται το plate με τον ίδιο τρόπο με αυτό που πληρώθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων. Έπειτα, ακολουθούν χρόνοι επώασης 15, 30, 45 και 60 min, στους οποίους πραγματοποιούνται μετρήσεις απορρόφησης, από τις οποίες κατασκευάζονται οι καμπύλες % Inhibition συναρτήσεως της συγκέντρωσης των διαλυμάτων των κυψελίδων (mg ασκορβικού οξέος/ mL διαλύματος). Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης που απαιτείται για το 50% αναστολής των ριζών στους τέσσερις αυτούς χρόνους, κατά αύξουσα σειρά χρόνου, είναι: 7.07, 7.04, 7.05 και 7.05 mg/mL.

2.11 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ

Αρχικά, για την παρασκευή της καλλυντικής κρέμας, παρασκευάζονται 81 g βάσης, δηλαδή ενός γαλακτώματος νερού σε έλαιο (w/o). Πιο συγκεκριμένα, για τη δημιουργία της λιπαρής φάσης προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως ίσος όγκος από αμυγδαλέλαιο και λάδι αβοκάντο και ειδικότερα, προστίθενται 18 mL από το κάθε έλαιο. Μετά την προσθήκη των δύο ελαίων, πραγματοποιείται προσθήκη ίσων ποσοτήτων από μελισσοκέρι, γαλακτωματοποιητή Phytocream® 2000, καθώς και αιθυλενογλυκόλη, και ειδικότερα, προστίθενται 3 g από το κάθε ένα.

Το μελισσοκέρι, ή εναλλακτικά το κερί μέλισσας, αποτελεί μία λιπώδης ουσία, η οποία εκκρίνεται από τους κηρογόνους αδένες των μελισσών και αποτελεί ένα εξαιρετικά σταθερό υλικό από υδρογονάνθρακες και εστέρες λιπαρών οξέων. Ακόμη, ο εν λόγω γαλακτωματοποιητής είναι φυτικής προέλευσης και χαρακτηρίζεται από μία ισορροπημένη τιμή δείκτη HLB=11±1.

Έπειτα, το ποτήρι ζέσεως εμβαπτίζεται σε ελαιόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο σε σταθερή θερμοκρασία, ίση με 80 °C και το μίγμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση. Όταν τα συστατικά τηχθούν και επέλθει η ομοιογένεια στο μίγμα, το λιπαρό μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εν συνεχεία, πραγματοποιείται προσθήκη 36 g ζελέ αλόης, το οποίο αποτελεί την υδατική φάση. Το ζελέ αλόης χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών, καθώς εμφανίζει μαλακτικές και επουλωτικές ιδιότητες και παράλληλα, εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση. Τέλος, γίνεται η ανάμιξη των δύο φάσεων, υπό συνεχή ανάδευση, μέχρις ότου να ομογενοποιηθεί πλήρως το μίγμα και να σχηματιστεί η βάση.

Αφού πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση του μίγματος με συνεχή ανάδευση, πραγματοποιείται προσθήκη εκχυλίσματος, το οποίο είναι πλούσιο σε βιοδραστικά και αντιοξειδωτικά συστατικά και έχει προκύψει σύμφωνα με το βέλτιστο πείραμα του

πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5. Συγκεκριμένα, προστίθενται 1 mL εκχυλίσματος στα 10 g βάσης.

2.12 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ

2.12.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ αποδέσμευσης των βιοδραστικών ενώσεων, πραγματοποιείται εμβάπτιση μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης, η οποία περιέχει την καλλυντική κρέμα, σε κατάλληλο διάλυμα. Το διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται, αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, K_2HPO_4 και KH_2PO_4 , του οποίου το pH έχει ρυθμιστεί, προηγουμένως, κατάλληλα στην τιμή 5.5, που προσομοιάζει αυτή της επιδερμίδας. Παράλληλα, η θερμοκρασία του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή των 32 °C για τον ίδιο λόγο. Εντός της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης περιέχονται 4.57 g κρέμας, στα οποία έχουν προστεθεί 497 μ L εκχυλίσματος. Η ποσότητα εκχυλίσματος αυτή αντιστοιχεί σε αναλογία ελαφρώς μεγαλύτερη από 1 mL στα 10 g κρέμας και πιο συγκεκριμένα, η αναλογία που χρησιμοποιείται είναι 1.09 mL στα 10 g κρέμας. Με σκοπό να διαπιστωθεί το ποσοστό των βιοδραστικών ενώσεων που αποδεσμεύτηκε, εμβάπτιζεται η μεμβράνη με την καλλυντική κρέμα στο ρυθμιστικό διάλυμα, και ανά τακτά και προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνεται δείγμα από το διάλυμα, όγκου ίσου με 1 mL. Τα χρονικά διαστήματα στα οποία λαμβάνεται ποσότητα δείγματος είναι 20 min, 1 h, 2h, 3h και 4 h. Να σημειωθεί πως σε κάθε λήψη δείγματος δεν προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος, προκειμένου να αποφευχθεί η αραιώση αυτού. Έπειτα από τη λήψη των δειγμάτων, ακολουθεί προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών μέσω της μεθόδου αναστολής ριζών DPPH[64].

Η διαδικασία προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφεται στην Ενότητα 2.10.3. Η διαφορά με τη διαδικασία της παραπάνω ενότητας είναι πως στην περίπτωση των δειγμάτων της συγκεκριμένης ενότητας δεν πραγματοποιείται η παρασκευή αραιωμένων διαλυμάτων (stock) των δειγμάτων, αλλά χρησιμοποιούνται απευθείας τα δείγματα. Η πλήρωση του plate των 96 θέσεων διεξάγεται προσθέτοντας 100 μ L από τα επιμέρους δείγματα και 100 μ L διαλύματος DPPH (5 mg/ 50 mL). Πιο συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα διαφορετικού χρόνου (20 min, 1 h, 2h, 3h και 4 h) λαμβάνονται 100 μ L, τα οποία τοποθετούνται στην εκάστοτε κυψελίδα και έπειτα, προστίθενται 100 μ L διαλύματος DPPH. Παράλληλα, παρασκευάζεται το τυφλό δείγμα, όπου σε κυψελίδα προστίθενται 100 μ L απιονισμένου νερού και 100 μ L αιθανόλης, καθώς και το control δείγμα, όπου σε κυψελίδα προστίθενται 100 μ L απιονισμένου νερού και 100 μ L διαλύματος DPPH. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τόσο τα δείγματα που έχουν ληφθεί, όσα και τα τυφλά διαλύματα, παρασκευάζονται εις τριπλούν. Βάσει του παραπάνω, στους υπολογισμούς υπεισέρχονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων που λαμβάνονται.

Αφού πληρωθεί το plate με τα τυφλά διαλύματα και τα δείγματα, καθώς και το διάλυμα DPPH, στις ποσότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ακολουθεί επώαση των διαλυμάτων για 15, 30, 45 και 60 min σε σκοτεινό χώρο. Στους χρόνους αυτούς

μετρίεται η απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων σε τιμές απορρόφησης, υπολογίζεται η ποσοστιαία αναστολή βάσει της Εξίσωσης 9.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \quad (9)$$

Όπου ως A_{blank} ορίζεται η απορρόφηση των τυφλών διαλυμάτων απιονισμένου νερού/DPPH και ως A_{sample} η απορρόφηση των δειγμάτων που λήφθηκαν στους διάφορους χρόνους.

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 12 και 13) παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη για την εφαρμογή της μεθόδου μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης. Η τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για το κλείσιμο της μεμβράνης, που περιέχει την κρέμα, είναι η κατάλληλη ώστε η κρέμα να εμβαπτίζεται ολόκληρη μέσα στο ποτήρι ζέσεως με το ρυθμιστικό διάλυμα.



Εικόνα 12: Πειραματική διάταξη για την εφαρμογή της μεθόδου μεμβρανών διάλυσης-διάχυσης.



Εικόνα 13: Δείγμα κρέμας εντός της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης.

2.12.2 ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΚΡΕΜΑΣ

Προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα της καλλυντικής κρέμας, τόσο η κρέμα που περιέχει το εκχύλισμα, όσο και η βάση κρέμας, υποβάλλονται σε δύο διαδικασίες. Οι διαδικασίες αυτές είναι η φυγοκέντριση και ο κύκλος ψύξης-θέρμανσης (freeze-thaw cycle).

❖ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Κατά τη διαδικασία της φυγοκέντρισης, δείγμα κρέμας ποσότητας 6.5 g τοποθετείται στη φυγόκεντρο στις 5000 στροφές για 30 min. Ως κριτήριο σταθερότητας ορίζεται ο διαχωρισμός της υγρής με τη στερεή φάση.

❖ ΚΥΚΛΟΣ ΨΥΞΗΣ-ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ (FREEZE-THAW CYCLE)

Κατά το κύκλο ψύξης-θέρμανσης, τόσο η καλλυντική κρέμα που περιέχει το εκχύλισμα, όσο και η βάση κρέμας απουσία εκχυλίσματος, τοποθετούνται σε περιβάλλοντα διαφορετικών θερμοκρασιών, κατά εναλλασσόμενο τρόπο. Πιο αναλυτικά, αρχικά τα δείγματα τοποθετούνται για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 25 °C. Έπειτα από την ολοκλήρωση των 24 ωρών, τα δείγματα τοποθετούνται στο ψυγείο και συγκεκριμένα, σε θερμοκρασία 4 °C, για ακόμη 24 ώρες. Εν συνεχεία, ακολουθούν 24 ώρες, στις οποίες τα δείγματα τοποθετούνται σε φούρνο, σε θερμοκρασία 40 °C. Τέλος, τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ακόμη 24 ώρες.

Ως κριτήρια σταθερότητας των καλλυντικών κρεμών αποτελεί το χρώμα και η υφή αυτών. Στόχος είναι το χρώμα και η υφή της κρέμας να μένουν αναλλοίωτα. Η μέθοδος του κύκλου ψύξης-θέρμανσης αποτελεί εξαιρετικά αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδο, καθώς προσομοιάζει ρεαλιστικές συνθήκες και πραγματικές εναλλαγές στη θερμοκρασία που μπορεί να υποστεί μία κρέμα, κατά τη μεταφορά και την αποθήκευσή της[64].

2.12.3 ΜΕΤΡΗΣΗ pH ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ

Ένα ακόμα στάδιο της αξιολόγησης της κρέμας διεξάγεται μέσω της μέτρησης του pH. Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται, τόσο στην καλλυντική κρέμα που περιέχει το εκχύλισμα, όσο και στη κρέμα απουσία εκχυλίσματος, και διεξάγεται και πριν την έναρξη του κύκλου ψύξης-θέρμανσης και μετά το πέρας αυτού. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση μπορεί να χρειασθεί διαλυτοποίηση της κρέμας σε απιονισμένο νερό. Ωστόσο, στην εν λόγω εργασία το pH μετρήθηκε απευθείας στην κρέμα, χωρίς τη διαλυτοποίηση αυτής, γεγονός το οποίο είναι επιτρεπτό βάσει της υφής της[64]. Η μέτρηση του pH γίνεται με χρήση πεχάμετρου, η χρήση του οποίου έχει αναλυθεί σε προηγούμενη υποενότητα (§2.4.1).

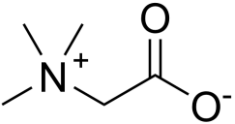
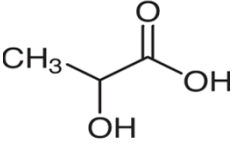
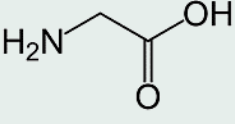
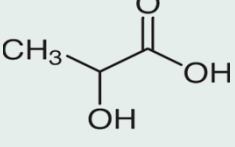
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Η επιλογή των συστατικών, από τα οποία θα απαρτίζονται οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, είναι στοχευμένη, ώστε αυτά να είναι φυσικής προέλευσης, και παράλληλα, να είναι αποδεκτά για καλλυντικές εφαρμογές που έχουν ως τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο. Οι πρώτες ύλες που επιλέχθηκαν είναι ασφαλείς για χρήση σε τρόφιμα και καλλυντικά και συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο καλλυντικών συστατικών, ο οποίος καταρτίζεται με βάση τις πληροφορίες που παρέχει η Ευρωπαϊκή βιομηχανία καλλυντικών προϊόντων, η οποία εκπροσωπείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση Καλλυντικών Προϊόντων (COLIPA). Ακόμη, τα συστατικά αυτά αποτελούν φθηνές πρώτες ύλες για τη σύνθεση διαλυτών[56].

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) παρουσιάζονται οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα στις εκχυλίσεις του άγριου τριαντάφυλλου.

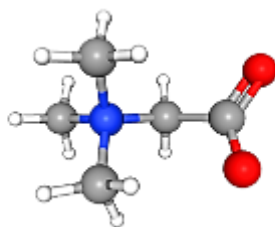
Πίνακας 11: Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως εκχυλιστικά μέσα.

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία			Δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA)	Δότης δεσμών υδρογόνου (HBD)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
	HBA	HBD	NEPO				
Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	2	2.5*	 Βεταΐνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	50	60
Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό	1	5	21**	 Γλυκίνη	 D,L-Γαλακτικό Οξύ	80	15

*Η περιεκτικότητα σε νερό στην περίπτωση αυτού του NaDES οφείλεται στο D,L-Γαλακτικό Οξύ, το οποίο είναι υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 80% κατά βάρος.

***Η περιεκτικότητα σε νερό στην περίπτωση αυτού του NaDES οφείλεται, τόσο στο D,L-Γαλακτικό Οξύ, το οποίο είναι υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 80% κατά βάρος, όσο και στην προσθήκη νερού ως συστατικό του NaDES.*

Πιο αναλυτικά, αναφορικά με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των διαλυτών, η βεταΐνη, ή εναλλακτικά τριμεθυλογλυκίνη, αποτελεί αμινοξύ, το οποίο απαρτίζεται από τη γλυκίνη και τρεις ομάδες μεθυλίου, χρησιμεύει ως δότης μεθυλίου σε διάφορες μεταβολικές οδούς, απαντάται στη φύση και μπορεί να βρεθεί σε μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Ως διπολικό ιόν, αλληλεπιδρά με το νερό και με άλλα παρόμοια μόρια, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Γενικά, η βεταΐνη είναι αναγνωρισμένη ως ασφαλής (GRAS), είναι μη τοξική και καταγράφεται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο γλωσσάρι των κοινών συστατικών που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά προϊόντα. Η βεταΐνη, καθώς και τα παράγωγά της, χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά, διότι θεωρούνται αντιστατικοί/ ρυθμιστικοί παράγοντες του ιξώδους, παράγοντες περιποίησης του δέρματος και των μαλλιών και παράλληλα, ενυδατικά συστατικά [56], [109].



Εικόνα 14: Δομή βεταΐνης στο χώρο[109].

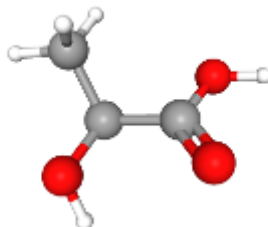
Ακόμη, η γλυκίνη αποτελεί το απλούστερο και το μόνο μη χειρόμορφο πρωτεϊνογόνο αμινοξύ, με άτομο υδρογόνου ως πλευρική αλυσίδα. Διαδραματίζει ρόλο ως θρεπτικός, ηπατοπροστατευτικός παράγοντας, μικροθρεπτικό συστατικό, θεμελιώδης μεταβολίτης και νευροδιαβιβαστής. Παράλληλα, αποτελεί α-αμινοξύ της οικογένειας σερίνης, συζευγμένη βάση ενός γλυκινίου και ένα συζυγές οξύ ενός γλυκινικού [110].



Εικόνα 15: Δομή γλυκίνης στο χώρο[110].

Το D,L-γαλακτικό οξύ είναι το ρακεμικό ισομερές του γαλακτικού οξέος, του βιολογικά ενεργού ισόμορφου στον άνθρωπο. Το γαλακτικό οξύ παράγεται κατά τη ζύμωση από το πυροσταφυλικό από τη γαλακτική αφυδρογονάση. Εναλλακτική ονομασία του γαλακτικού οξέος είναι 2-υδροξυπροπανοϊκό οξύ, είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και είναι γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS). Οι χημικές και φυσικές ιδιότητές του, που περιλαμβάνουν τον όξινο χαρακτήρα σε υδατικό μέσο και τη διλειτουργική δραστηριότητα, λόγω της παρουσίας, τόσο καρβοξυλικών, όσο και υδροξυλικών λειτουργικών ομάδων, είναι σε θέση να δράσει

στο σχηματισμό του NaDES, είτε ως καλό HBA, είτε ως καλό HBD. Επιπλέον, χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά παράλληλα, βρίσκει εφαρμογή στη φαρμακευτική και τη βιομηχανία καλλυντικών[56], [111]–[113].



Εικόνα 16: Δομή D,L-γαλακτικού οξέος στο χώρο[113].

3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Έπειτα από τη σύνθεση των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών ακολούθησε ο χαρακτηρισμός ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους και πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του pH και της πολικότητάς τους. Οι μέθοδοι που ακολούθηθηκαν για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων αυτών περιγράφονται αναλυτικά στην Ενότητα 2.4 του Πειραματικού Μέρους.

3.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH ΤΩΝ NaDES

Με βάση τη μέθοδο που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.4 και με χρήση του πεχάμετρου, ως όργανο μέτρησης, προσδιορίστηκε το pH των δύο NaDES που χρησιμοποιήθηκαν στις εκχυλίσεις των προκαταρκτικών πειραμάτων και των δύο πειραματικών σχεδιασμών. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε το pH του NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, καθώς και του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Παράλληλα, κατασκευάστηκαν και οι καμπύλες του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας κατά βάρος του NaDES σε σύστημα NaDES-νερό και βρέθηκαν οι εξισώσεις των ευθειών που προσαρμόζονται καλύτερα στα πειραματικά σημεία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του pH για τους δύο διαλύτες και τις αραιώσεις αυτών φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 12 και 13).

Πίνακας 12: Μετρήσεις pH για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ 1:2:2.5 σε διάφορες περιεκτικότητες.

Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5		
Περιεκτικότητα NaDES (g NaDES/(g NaDES+H ₂ O))	pH	Θερμοκρασία (°C)
1	3.17	24.9
0.75	2.98	27.1
0.5	2.78	27.7
0.3	2.67	27.3
0.2	2.65	28.6

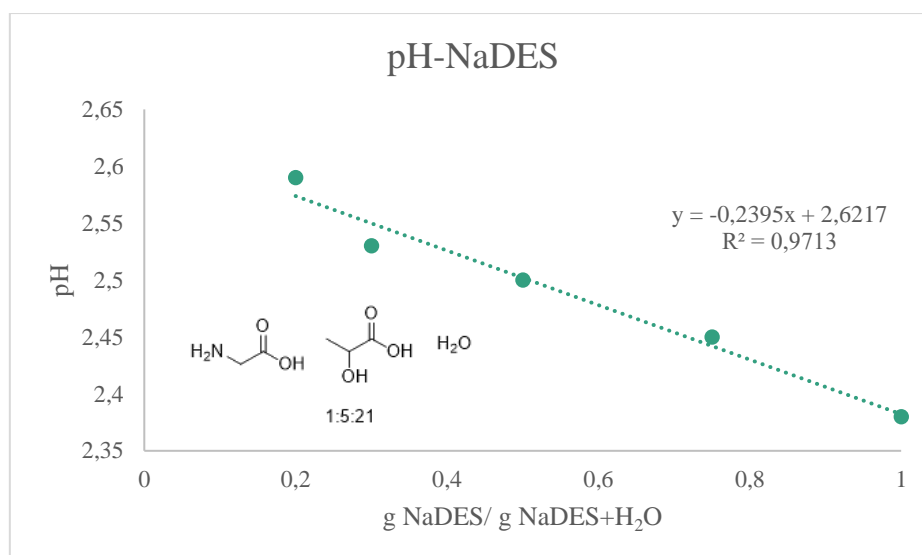
Πίνακας 13: Μετρήσεις pH για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 σε διάφορες περιεκτικότητες.

Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21		
Περιεκτικότητα NaDES (g NaDES/(g NaDES+H ₂ O))	pH	Θερμοκρασία (°C)
1	2.38	25.7
0.75	2.45	27.7
0.5	2.50	27.8
0.3	2.53	27.3
0.2	2.59	28.2

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων (Πίνακας 12 και 13) αναπαρίστανται και σχηματικά στα διαγράμματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια (Διαγράμματα 3 και 4).



Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας σε NaDES, για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.



Διάγραμμα 4: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του pH ως συνάρτηση της περιεκτικότητας σε NaDES, για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό πως και τα δύο NaDES που συντίθενται και χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία εμφανίζουν όξινο χαρακτήρα με τιμές pH 3.17 για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 και 2.38 για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21, αντίστοιχα. Ο όξινος χαρακτήρας οφείλεται στο γαλακτικό οξύ, το οποίο αποτελεί συστατικό και των δύο NaDES. Ωστόσο, μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί πως η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στο μίγμα NaDES-H₂O, στην περίπτωση του NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 επιφέρει μείωση της τιμής του pH, ενώ στην περίπτωση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 επιφέρει μικρή αύξηση αυτής, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ NaDES

Η πολικότητα των NaDES που συντέθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας προσδιορίζεται με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 2.4.2. Ο προσδιορισμός της ιδιότητας αυτής γίνεται μέσω της μέτρησης της μέγιστης απορρόφησης, δηλαδή του λ_{\max} στην περιοχή 400-700 nm. Από τα διαγράμματα που λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο UV-Vis προσδιορίζεται το λ_{\max} ως το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή της καμπύλης απορρόφησης. Από τη τιμή του λ_{\max} και με χρήση της Εξίσωσης 3 υπολογίζεται η ενέργεια μοριακής μετάβασης, E_{NR} . Τα αποτελέσματα, τόσο του προσδιορισμού του λ_{\max} , όσο και του υπολογισμού της ενέργειας μοριακής μετάβασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Μελέτη της πολικότητας των NaDES με χρήση του δείκτη Nile red.

NaDES	λ_{\max} (nm)	E_{NR} (kcal/mol)
Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5	571	50.07
Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21	593	48.21
Διαλύτης αναφοράς	λ_{\max} (nm)	E_{NR} (kcal/mol)
Νερό	571	50.07

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα φαίνεται πως η ενέργεια μοριακής μετάβασης για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 είναι ίση με 50.07 kcal/mol και για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 είναι ίση με 48.21, αντίστοιχα. Η αντίστοιχη ενέργεια για το νερό είναι υπολογισμένη και είναι ίση με 50.07 kcal/mol. Όπως γίνεται φανερό, οι τιμές της ενέργειας μοριακής μετάβασης των δύο NaDES είναι παραπλήσιες με του νερού.

3.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Αναφορικά με το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων, τόσα τα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, όσο και τα εκχυλίσματα των δύο πειραματικών σχεδιασμών, αξιολογούνται ως προς τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content, TPC), τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content, TFC) και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία εκφράζεται μέσω του δείκτη IC₅₀. Ο τρόπος προσδιορισμού των τιμών αυτών έχει περιγραφεί αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος της παρούσας εργασίας.

Επιπρόσθετα, αξίζει να υπογραμμιστεί πως όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση της ίδιας αρχικής πρώτης ύλης άγριου τριαντάφυλλου, και συγκεκριμένα, του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου, ώστε οι πιθανές διαφορές στις αποκρίσεις των παραπάνω παραμέτρων να οφείλονται αποκλειστικά στις διαφορές των συνθηκών της διεργασίας εκχύλισης και όχι σε διαφοροποιήσεις της πρώτης ύλης.

3.3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΪΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ 1:2:2.5

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15) παρουσιάζονται οι τιμές της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις (TPC), σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) και του δείκτη IC₅₀ για τα προκαταρκτικά πειράματα εκχύλισεων, με χρήση NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και δείκτη IC₅₀ στα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	TPC (mg _{eqGA} l/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eqCA} T/ g _{wild rose})	DPPH	DPPH	DPPH	DPPH
						IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN11	1	0	100	68.42	38.04	25.47	23.53	20.22	15.99
DN17	1	0	100	78.58	35.46	24.13	22.44	19.89	17.32
DN22*	1	0	100	68.57	30.42	10.08	6.96	5.59	4.79

DN16	4	0	100	66.35	44.41	29.72	28.71	24.60	20.28
DN33	1	30	100	114.59	52.91	20.54	17.48	13.65	11.37
DN38	1	30	300	99.39	57.46	1.21	1.04	1.00	0.95
DN39	1	30	500	123.17	66.79	0.35	0.27	0.24	0.20

**Το πείραμα DN22 αποτελεί επανάληψη των πειραμάτων DN11 και DN17. Η διαφοροποίηση έγκειται στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, όπου η συγκέντρωση των αρχικά χρησιμοποιούμενων εκχυλισμάτων για το πείραμα δέσμευσης της ρίζας DPPH είναι διαφορετική, κάτι που αναλύεται περαιτέρω και στην Ενότητα 3.3.5.*

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 15 προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα, αναφορικά με την επίδραση που έχουν οι παράγοντες (χρόνος εκχύλισης, ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο και μάζα πρώτης ύλης) στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

➤ Χρόνος εκχύλισης

Όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, διεξήχθησαν πειράματα για μία ώρα εκχύλισης, καθώς και για τέσσερις, με στόχο να βρεθεί η επίδραση αυτού. Οι επιλογές των χρόνων αυτών πραγματοποιήθηκαν έπειτα από βιβλιογραφική μελέτη. Για παράδειγμα, οι Taneva et al. πραγματοποίησαν εκχύλιση καρπού άγριου τριαντάφυλλου με σύστημα αιθανόλης-νερού για μία ώρα[41]. Αντίστοιχα, οι Georgieva et al. διεξήγαγαν εκχύλιση καρπού άγριου τριαντάφυλλου για δύο ώρες, με χρήση αιθανόλης και μεθανόλης ως διαλύτες εκχύλισης[23]. Έπειτα από συγκέντρωση και άλλων πιθανών συνθηκών εκχύλισης από τη βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένοι χρόνοι για την εξέταση της επίδρασης αυτής της παραμέτρου. Να σημειωθεί, ωστόσο, πως βιβλιογραφικά οι επιλεγόμενοι διαλύτες είναι αποκλειστικά συμβατικοί, και όχι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, και η πρώτη ύλη δεν είναι απαραίτητα το υπάνθιο άγριου τριαντάφυλλου, το οποίο εξετάζεται στην εν λόγω εργασία, οπότε, οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία δεν αποτελούν μοναδικό κριτήριο και διεξάγεται περαιτέρω έρευνα.

Προκειμένου να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την επίδραση του χρόνου, μελετώνται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που φαίνονται στον Πίνακα 15, και πιο συγκεκριμένα, συγκρίνονται τα πειράματα με κωδικούς DN11 και DN22, που διεξάγονται για χρόνο μία ώρα εκχύλισης, με το πείραμα με κωδικό DN16, το οποίο διεξάγεται για τέσσερις ώρες. Όπως γίνεται αντιληπτό, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης δεν επιδρά σημαντικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), καθώς οι τιμές που προκύπτουν για μία ώρα και τέσσερις ώρες εκχύλισης είναι αρκετά παραπλήσιες. Ωστόσο, όσον αφορά το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), παρατηρείται αύξηση αυτού με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης. Τέλος, αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, όπως αυτή προσδιορίζεται από το δείκτη IC₅₀, φαίνεται ο χρόνος εκχύλισης να μην επιδρά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση. Να σημειωθεί πως, όσο πιο υψηλή είναι η αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος, τόσο χαμηλότερη είναι η τιμή του δείκτη IC₅₀. Παράλληλα, αξίζει να τονιστεί πως, οι τιμές του δείκτη του πειράματος με κωδικό DN22 παρουσιάζονται σημαντικά χαμηλότερες, γεγονός το οποίο οφείλεται στη συγκέντρωση του stock που παρασκευάζεται, κατά τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, και όχι στις συνθήκες εκχύλισης που επιλέγονται (Βλ. §3.3.5).

Συμπερασματικά, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης ευνοεί σημαντικά την αύξηση του TFC και παράλληλα, διατηρεί σε αντίστοιχα επίπεδα, με αυτά των μικρότερων χρόνων, τις τιμές του TPC και του δείκτη IC₅₀, που υποδηλώνει την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

➤ Ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο

Η επιλογή χρήσης, ως εκχυλιστικού μέσου, NaDES με χρήση ποσότητας νερού ως συνδιαλύτη, αποτελεί ένα συνήθη τρόπο για τη μείωση του ιξώδους του NaDES και τη διευκόλυνση της διεργασίας της εκχύλισης. Το παραπάνω έχει περιγραφεί αναλυτικότερα στην Ενότητα 1. Αναφορικά με την επίδραση που παρουσιάζει το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, γίνεται φανερό πως αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς η αύξηση αυτού επιφέρει σημαντική αύξηση, τόσο στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), όσο και στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Πιο συγκεκριμένα, με σύγκριση των πειραμάτων με κωδικούς DN11, DN17 και DN22, με το πείραμα με κωδικό DN33, τα οποία διατηρούν ίδιες τις παραμέτρους του χρόνου και της πρώτης ύλης και διαφέρουν μόνο ως προς την παρουσία του νερού στο διαλύτη (0% και 30% αντιστοίχως), παρατηρείται πως οι τιμές TPC ξεκινούν από 68 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}, απουσία νερού, και φτάνουν έως 115 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}, με προσθήκη 30% νερού στο μέσο εκχύλισης.

Επιπρόσθετα, η προσθήκη νερού συμβάλλει και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, καθώς με σύγκριση των πειραμάτων DN11 και DN33 προκύπτει ότι ο δείκτης IC₅₀ είναι χαμηλότερος στο πείραμα παρουσία νερού στο διαλύτη. Συμπερασματικά, η προσθήκη νερού στο διαλύτη της εκχύλισης συμβάλλει ουσιαστικά στη διευκόλυνση της διεργασίας, καθώς μειώνει το ιξώδες του μέσου εκχύλισης και συνεπώς, διευκολύνει τη μεταφορά μάζας. Το παραπάνω γίνεται φανερό και από τα αποτελέσματα, τα οποία είναι πιο ικανοποιητικά ως προς όλους τους παράγοντες (TPC, TFC, IC₅₀), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από τις εκχυλίσεις με διαλύτη αποκλειστικά NaDES. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραληφθεί, πως η επιλογή του κατάλληλου ποσοστού νερού είναι εξέχουσας σημασίας, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί η υπερμοριακή δομή του NaDES στο διαλύτη.

➤ Μάζα υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου

Αναφορικά με τη μάζα υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση, δοκιμάστηκαν τρεις πιθανές ποσότητες, ανά 3 g μέσου εκχύλισης. Οι ποσότητες αυτές επιλέχθηκε να δοκιμαστούν έπειτα και από βιβλιογραφική αναζήτηση πιθανών αναλογιών πρώτης ύλης/διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτες των Taneva et al., Georgieva et al., Angelov et al., Nechifor et al. και Moghaddam et al. χρησιμοποιήθηκε η αναλογία πρώτης ύλης/ διαλύτη 1/10, ενώ σε άλλες μελέτες των Mihaylova et al. και Ilbay et al. χρησιμοποιήθηκαν αναλογίες 1/20 και 1/25, αντίστοιχα [17], [18], [23], [41]–[43], [46].

Βάσει των παραπάνω, δοκιμάστηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα, οι αναλογίες 1/30, 1/10 και 1/6. Η πλειοψηφία των πειραμάτων διεξήχθη σε αναλογία 1/10, ωστόσο εξετάστηκαν και ακόμα δύο αναλογίες, οι οποίες στη συνέχεια αποτέλεσαν τα όρια του

εύρους του πειραματικού σχεδιασμού, ως προς τη παράμετρο της ποσότητας της πρώτης ύλης.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 15, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα αναφορικά με την επίδραση της ποσότητας της πρώτης ύλης στις διάφορες παραμέτρους που εξετάζονται. Πιο συγκεκριμένα, η σύγκριση διεξάγεται μεταξύ των πειραμάτων με κωδικούς DN33, DN38 και DN39, τα οποία διατηρούν ίδιες τις άλλες δύο παραμέτρους (χρόνο εκχύλισης και ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο) και διαφέρουν αποκλειστικά ως προς την ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g διαλύτη.

Αναφορικά με το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), δεν προκύπτει συγκεκριμένη τάση με την αύξηση της ποσότητας του υπάνθιου του άγριου τριαντάφυλλου, καθώς το αποτέλεσμα που προκύπτει για 300 mg πρώτης ύλης είναι χαμηλότερο από το αντίστοιχο των 100 mg, ενώ το αποτέλεσμα για 500 mg είναι το υψηλότερο όλων. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της ποσότητας της πρώτης ύλης στις φαινολικές ενώσεις, η οποία διεξάγεται στο πλαίσιο του πειραματικού σχεδιασμού. Από την άλλη, όσον αφορά το ολικό περιεχόμενο των φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), φαίνεται να προκύπτει σταθερή αυξητική τάση αυτού, με την αύξηση της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου. Τέλος, με σύγκριση των πειραμάτων DN38 και DN39, προκύπτει ότι η αύξηση της ποσότητας της πρώτης ύλης επιδρά θετικά στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, καθώς προκύπτουν χαμηλότερες τιμές του δείκτη IC₅₀.

Συμπερασματικά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της ποσότητας υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου στις διάφορες παραμέτρους, η οποία διεξάγεται κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, των προκαταρκτικών πειραμάτων είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς υπήρξαν κριτήριο για την επιλογή των κατάλληλων ευρών του πειραματικού σχεδιασμού.

3.3.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16) παρουσιάζονται οι τιμές της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις (TPC), σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) και του δείκτη IC₅₀ για τα προκαταρκτικά πειράματα εκχυλίσεων, με χρήση NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	TPC (mg _{eqGA} l/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eqCAT} / g _{wild rose})	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN14	1	40	0	100	104.18	23.80	2.25	1.95	1.69	1.42
DN21	1	40	0	100	84.57	28.26	1.28	1.02	0.72	0.61
DN24	1	40	0	100	120.63	28.07	0.52	0.61	0.46	0.34
DN19	1	40	7	100	83.25	35.31	2.03	1.72	1.54	1.41
DN23	6	40	0	100	133.72	29.56	-*	-	-	-
DN25	1	60	0	100	134.81	32.50	0.47	0.49	0.30	0.12
DN27	1	40	25	100	129.05	35.76	1.49	1.26	1.15	1.12
DN29	1	40	60	100	102.52	42.91	1.59	1.43	1.32	1.34
DN30	1	40	25	100	124.42	38.91	1.43	1.19	1.09	1.07
DN31	1	40	30	100	133.61	39.09	1.57	1.28	1.17	1.13
DN34	1	40	30**	100	111.08	38.98	1.28	1.14	1.06	1.01
DN40	3	40	30	100	124.36	54.27	1.38	1.19	1.13	1.04

*Δεν προσδιορίστηκε λόγω αστάθειας του εκχυλιστικού διαλύτη, κατά την παραμονή του εκχυλίσματος στους 4 °C.

**Στην περίπτωση του πειράματος DN34, το ποσοστό του νερού (30%) επιλέχθηκε να προστεθεί εξ'αρχής, κατά την παρασκευή του NaDES. Αυτό επιλέχθηκε διότι παρατηρήθηκε στην περίπτωση του DN31 ότι το ποσοστό αυτό βελτιώνει την αποδοτικότητα της εκχύλισης, καθώς επίσης παρατηρήθηκαν προβλήματα αστάθειας του διαλύτη Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:6.2 κατά την παραμονή του στους 4 °C.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 16 προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα, αναφορικά με την επίδραση που έχουν οι παράγοντες (χρόνος εκχύλισης, ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο και θερμοκρασία εκχύλισης) στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων.

➤ Θερμοκρασία εκχύλισης

Αναφορικά με τη θερμοκρασία στην οποία διεξάγεται η εκχύλιση, η πλειοψηφία των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία ίση με 40 °C. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα, με κωδικό DN25, στους 60 °C, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων DN14, DN21 και DN24 (40 °C), με το πείραμα DN25 (60 °C), προκύπτει το συμπέρασμα, πως η υψηλότερη θερμοκρασία ευνοεί την εκχύλιση, τόσο φαινολικών, όσο και φλαβονοειδών ενώσεων. Παράλληλα, μελετώντας το δείκτη IC₅₀, γίνεται φανερό πως σε υψηλότερη θερμοκρασία η τιμή αυτού είναι χαμηλότερη και άρα, είναι ισχυρότερη η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος (σύγκριση πειραμάτων DN24-

DN25, στα οποία χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση stock για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης). Παρά το γεγονός ότι η αύξηση της θερμοκρασίας δίνει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, επιλέγεται, στον πειραματικό σχεδιασμό, να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία, σε τιμή 40 °C, και να μην εξεταστεί ως παράμετρος. Η παραπάνω επιλογή αιτιολογείται από το γεγονός ότι παρά τις πιο ικανοποιητικές τιμές αποτελεσμάτων, η αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργεί μεγαλύτερη απαίτηση σε ενέργεια και κατά συνέπεια, μεγαλύτερο κόστος της διεργασίας. Τα αποτελέσματα του πειράματος με υψηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης είναι, βέβαια, πιο ικανοποιητικά, ωστόσο δεν παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση, ώστε να επιλεγεί μία διεργασία πιο ενεργοβόρα και κοστοβόρα. Συνεπώς, η θερμοκρασία της εκχύλισης δεν επιλέγεται ως ανεξάρτητη μεταβλητή των πειραματικών σχεδιασμών.

➤ Χρόνος εκχύλισης

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 16, η πλειοψηφία των πειραμάτων πραγματοποιείται σε χρόνο εκχύλισης μία ώρα. Ωστόσο, διεξάγεται και ένα πείραμα, με κωδικό DN23, με χρόνο εκχύλισης 6 ώρες, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στα χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων. Όπως αναφέρεται και σε προηγούμενη υποενότητα (§3.3.1), οι χρόνοι εκχύλισης που εξετάζονται σε προκαταρκτικό επίπεδο πειραμάτων, έχουν ερευνηθεί και βιβλιογραφικά.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων DN14, DN21 και DN24 (χρόνος εκχύλισης 1 ώρα), με τα αντίστοιχα του πειράματος DN23 (χρόνος εκχύλισης 6 ώρες) προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αύξηση του χρόνου εκχύλισης επιφέρει αύξηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) και μικρή αύξηση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC). Ωστόσο, δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, καθώς δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός του δείκτη IC₅₀ για το εκχύλισμα που προκύπτει έπειτα από 6 ώρες εκχύλισης (DN23), λόγω αστάθειας του εκχυλίσματος. Παρά την αύξηση του περιεχομένου σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, φαίνεται η τόσο μεγάλη χρονική διάρκεια να μην είναι επιθυμητή, καθώς η επίδραση της δεν είναι σημαντική. Η αύξηση του χρόνου εκχύλισης συνεπάγεται αύξηση του κόστους της διεργασίας, γεγονός ανεπιθύμητο, ιδιαίτερα όταν τα αποτελέσματα της αύξησης του χρόνου δεν παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση. Τελικά, από τη μελέτη του χρόνου εκχύλισης απορρέει το συμπέρασμα πως δεν είναι επιθυμητή η επιλογή μεγάλων χρόνων εκχύλισης, όπως αυτός των 6 ωρών και άρα, κατά τον πειραματικό σχεδιασμό στόχος είναι η επιλογή μικρότερου εύρους χρόνου.

➤ Ποσοστό νερού

Η μελέτη της προσθήκης νερού στο διαλύτη αποτέλεσε το σημαντικότερο σκέλος μελέτης, κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών πειραμάτων. Εξετάστηκαν διάφορα ποσοστά νερού στο εκχυλιστικό μέσο και παράλληλα, εξετάστηκε η προσθήκη νερού απευθείας στο NaDES, κατά την παρασκευή του. Οι παραπάνω μελέτες έλαβαν χώρα λόγω της ανάγκης εύρεσης ενός NaDES με πρώτες ύλες τη γλυκίνη και το D,L γαλακτικό οξύ και υψηλή σταθερότητα.

Μέσω των εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν απουσία νερού, με χρήση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6,2, προέκυψαν εκχυλίσματα περιορισμένης

σταθερότητας, στα οποία, έπειτα από ορισμένο χρονικό διάστημα, παρουσιαζόταν κατακάθιση στερεού. Η αστάθεια των εκχυλισμάτων αυτών οφείλεται στην αστάθεια του διαλύτη, δηλαδή του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:6.2. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η προσθήκη, διαφόρων ποσοστών, νερού στο εκχυλιστικό μέσο και διερευνήθηκε η σταθερότητα των εκχυλισμάτων στο χρόνο, καθώς επίσης αξιολογήθηκαν ως προς τις επιλεγμένες παραμέτρους εκχύλισης (εκχύλισεις με κωδικούς DN19, DN27, DN29, DN30 και DN31).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα ως προς ολικό περιεχόμενο φαινολικών (TPC) και φλαβονοειδών ενώσεων (TFC), και δευτερευόντως ως προς την αντιοξειδωτική δράση (δείκτης IC₅₀), των εκχυλισμάτων αυτών, προκύπτει ότι για ποσοστό νερού 30% στο εκχυλιστικό μέσο, τα αποτελέσματα σε TPC και TFC είναι τα βέλτιστα. Όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 16, τα ποσοστά που εξετάστηκαν είναι 7, 25, 30 και 60% νερό. Το εκχύλισμα με ποσοστό 7% νερό στο εκχυλιστικό μέσο (DN19) παρουσίασε και πάλι αστάθεια, όπως τα αντίστοιχα απουσία νερού. Αναφορικά με τα εκχύλισμα, των οποίων ο διαλύτης εκχύλισης περιείχε 25% νερό και άνω, αυτά παρέμειναν σταθερά. Συνεπώς, η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα ότι είναι απαραίτητη η προσθήκη νερού στο διαλύτη εκχύλισης (για το συγκεκριμένο NaDES) προκειμένου να προκύπτουν σταθερά εκχύλισμα, με πολύ ικανοποιητικά χαρακτηριστικά. Με βάση το συμπέρασμα αυτό, καθώς και την εύρεση του βέλτιστου ποσοστού νερού στο εκχυλιστικό μέσο, κρίθηκε σκόπικο να διερευνηθεί η προσθήκη του νερού, εξ'αρχής κατά την παρασκευή του NaDES και όχι κατά την εκχύλιση.

Έτσι, παρασκευάστηκε ένας νέος NaDES, τριών συστατικών, τα οποία είναι γλυκίνη, D,L γαλακτικό οξύ και νερό, σε αναλογία 1:5:21. Ο NaDES αυτός, σε αντίθεση με αυτόν απουσία νερού, παρέμεινε σταθερός και ήταν ο διαλύτης που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια του δεύτερου πειραματικού σχεδιασμού της παρούσας εργασίας. Η εκχύλιση με τον εν λόγω διαλύτη, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο των προκαταρκτικών πειραμάτων, αντιστοιχεί σε κωδικό πειράματος DN34.

Όπως γίνεται φανερό, η παρουσία νερού, είτε στην παρασκευή του NaDES, είτε στο εκχυλιστικό μέσο, δίνει εξαιρετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα, αναφορικά με τις παραμέτρους που εξετάζονται (TPC, TFC, IC₅₀). Παράλληλα, όμως, η παρουσία νερού στο σχηματισμό του NaDES έχει το επιπρόσθετο πλεονέκτημα ότι παρασκευάζεται ένας σταθερός διαλύτης και έτσι, επιλύεται το «εμπόδιο» της αστάθειας του διαλύτη και κατ' επέκταση, της αστάθειας των εκχυλισμάτων. Η προσθήκη υψηλότερου ποσοστού νερού στο NaDES, πέρα από το γεγονός ότι δίνει λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά την εκχύλιση, εγκυμονεί τον κίνδυνο να καταστρέψει την υπερμοριακή δομή του διαλύτη. Παράλληλα, η επιλογή μικρότερου ποσοστού νερού στο NaDES δεν επιτυγχάνει τη ζητούμενη σταθερότητα του διαλύτη.

Τέλος, διεξήχθη και ένα πείραμα μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας, με διαλύτη το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 (κωδικός πειράματος DN40). Παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου από 1 σε 3 ώρες επιφέρει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων και παράλληλα, διατηρεί τη σημαντική αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Συνεπώς, οι 3 ώρες εκχύλισης αποτελούν μία καλή χρονική διάρκεια εκχύλισης, η οποία επιλέγεται να εμπεριέχεται και στα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού.

Αξίζει να σημειωθεί πως, στην περίπτωση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 δεν εξετάστηκε η επίδραση της ποσότητας της πρώτης ύλης ανά 3 g διαλύτη, καθώς τα συμπεράσματα που εξήχθησαν κατά την προκαταρκτική μελέτη, αλλά και τον πειραματικό σχεδιασμό, με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, αναφορικά με την αναλογία πρώτης ύλης/διαλύτη, χρησιμοποιήθηκαν και για την επιλογή του κατάλληλου εύρους αναλογιών στον πειραματικό σχεδιασμό με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

3.3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΒΕΤΑΪΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:2:2.5

Στα πλαίσια του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken διεξήχθησαν 17 πειράματα, τα οποία προέκυψαν ύστερα από υπόδειξη του χρησιμοποιούμενου λογισμικού, Design Expert (Free Trial Version). Πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (0 0 0) για την εκτίμηση του γνήσιου σφάλματος. Έπειτα, συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα-τιμές των αποκρίσεων, το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και οι τιμές IC₅₀ για χρόνο επώασης 15 min, και ακολούθησε στατιστική ανάλυση αυτών, μέσω της οποίας εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει με ικανοποιητικό τρόπο την κάθε απόκριση.

3.3.3.1 Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις (TPC) του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις (TPC), ανά μονάδα μάζας της στερεής πρώτης ύλης, για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού που διεξήχθη με εκχυλιστικό μέσο το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

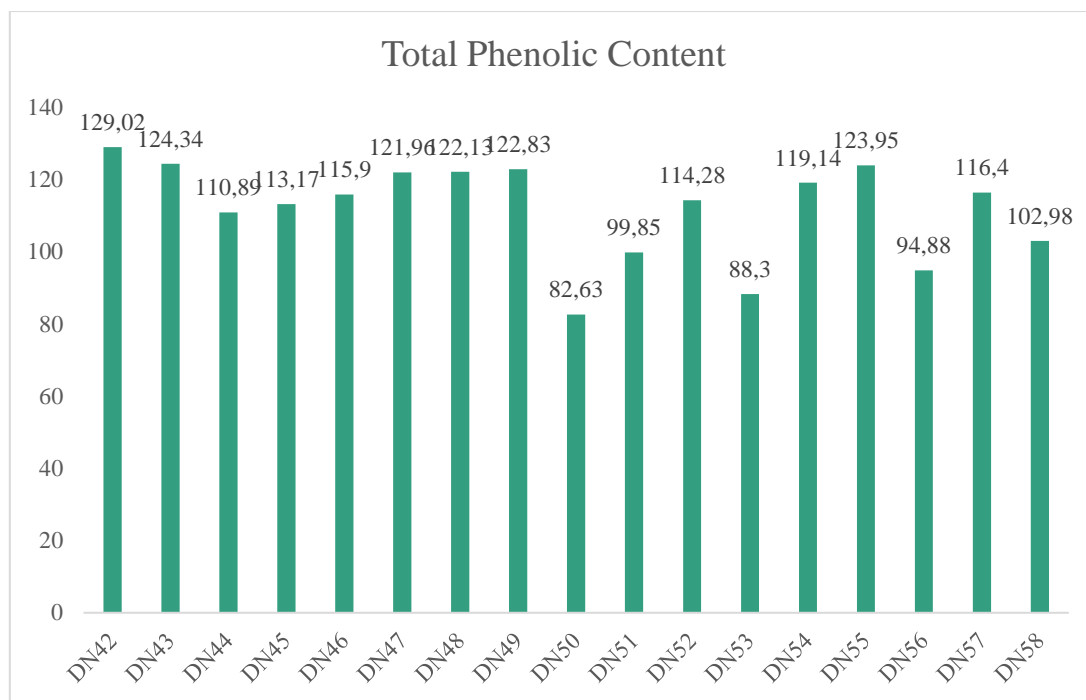
Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%) (x ₂)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₃)	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg _{GAL} /mL)	TPC (mg _{eqGAL} /g _{wild rose})
DN42	135	50	100	0.476	129.02±3.63
DN43	240	30	100	0.479	124.34±2.15
DN44	30	30	100	0.427	110.89±2.71
DN45	135	30	300	0.327	113.17±2.26
DN46	135	30	300	0.335	115.90±1.63
DN47	240	50	300	0.337	121.96±2.95

DN48	135	30	300	0.353	122.13±6.57
DN49	135	50	500	0.566	122.83±2.53
DN50	240	30	500	0.318	82.63±2.51
DN51	240	10	300	0.302	99.85±14.75
DN52	135	10	100	0.460	114.28±1.47
DN53	135	10	500	0.444	88.30±7.99
DN54	135	30	300	0.344	119.14±6.44
DN55	135	30	300	0.358	123.95±7.51
DN56	30	10	300	0.287	94.88±8.93
DN57	30	50	300	0.322	116.40±3.17
DN58	30	30	500	0.495	102.98±1.92

**Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.*

Τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 17) αναπαρίστανται και σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 5).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων κυμαίνονται από 82.63 έως 129.02 mg_{eqGAL}/ g_{wild rose}. Ακόμα και η χαμηλότερη τιμή TPC που εντοπίζεται στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό είναι σημαντικά υψηλότερη από τις αντίστοιχες τιμές που εντοπίζονται στη βιβλιογραφία για εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου με χρήση άλλων διαλυτών.



Διάγραμμα 5: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Από το Διάγραμμα 5 γίνεται φανερό πως η υψηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DN42 και η τιμή που προκύπτει είναι 129.02 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}. Το πείραμα αυτό αντιστοιχεί σε συνθήκες εκχύλισης: 135 min χρόνο εκχύλισης, 50% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 100 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη. Σε αντίθεση με το πείραμα DN42, το πείραμα DN50 παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, με αυτή να είναι ίση με 82.63 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}. Το εν λόγω πείραμα έχει τις ακόλουθες συνθήκες: 240 min χρόνο εκχύλισης, 30% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 500 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη.

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής «Reduced Quadratic Model», δηλαδή το απλοποιημένο τετραγωνικό. Πιο συγκεκριμένα, η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το συγκεκριμένο μοντέλο περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B² και C², όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Στον παρών πειραματικό σχεδιασμό, ο όρος A συμβολίζει το χρόνο εκχύλισης, ο όρος B το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και ο όρος C την ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου. Από την εν λόγω μορφή του μοντέλου αφαιρούνται σταδιακά οι όροι που δεν εμφανίζονται ως στατιστικά σημαντικοί, δηλαδή οι όροι με υψηλά p-values (>0.05), και που επιδρούν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, αφού αρχικά από το πλήρες τετραγωνικό μοντέλο έχουν αφαιρεθεί οι όροι AB και B².

Πίνακας 18: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο *Reduced Quadratic Model* που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2805,20	7	400,74	24,81	< 0.0001	significant
A-Time	3,83	1	3,83	0,2370	0,6380	
B-% Water	1078,72	1	1078,72	66,79	< 0.0001	
C-RM	797,77	1	797,77	49,40	< 0.0001	
AC	318,49	1	318,49	19,72	0,0016	
BC	98,00	1	98,00	6,07	0,0360	
A ²	403,22	1	403,22	24,97	0,0007	
C ²	83,25	1	83,25	5,15	0,0493	
Residual	145,35	9	16,15			
Lack of Fit	67,46	5	13,49	0,6928	0,6567	not significant
Pure Error	77,89	4	19,47			
Cor Total	2950,55	16				

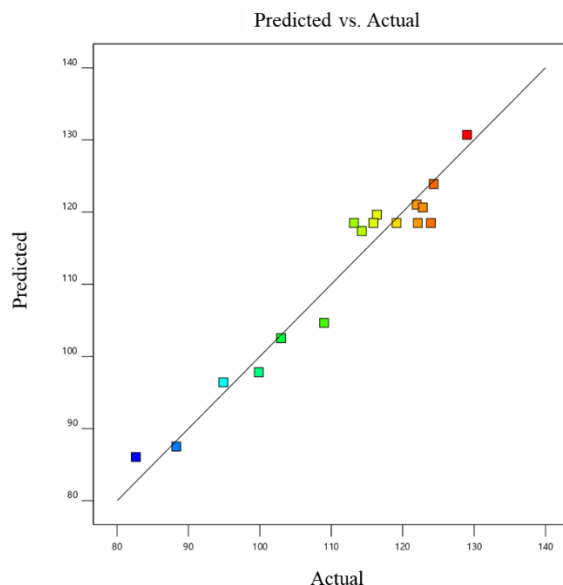
Η F-value του μοντέλου είναι ίση με 24.81, γεγονός που υποδηλώνει πως το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό και πως η πιθανότητα η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο είναι μικρότερη από 0.01%. Επιπρόσθετα, γίνεται φανερό πως όλοι οι όροι του μοντέλου, εκτός από τον όρο A, παρουσιάζουν p-value χαμηλότερο του 0.05, γεγονός που τους καθιστά στατιστικά σημαντικούς για το μοντέλο. Ο όρος A (χρόνος εκχύλισης) παρότι δεν αποτελεί σημαντικό όρο για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, επιλέγεται να παραμείνει στο μοντέλο και να μην παραλειφθεί, ώστε να διατηρηθεί η ιεραρχία αυτού. Ακόμη, η έλλειψη προσαρμογή (Lack of Fit) φαίνεται να μην είναι σημαντική για το μοντέλο, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται σωστά.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19) παρουσιάζεται η τιμή του R² του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Η τιμή του είναι παραπλήσια της μονάδας, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R²» και «Predicted R²» δεν παρουσιάζουν απόκλιση μεγαλύτερη από 0.2 μονάδες, οπότε η τιμή του R² κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή του «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, το οποίο είναι επιθυμητό. Αυτό υποδεικνύει πως η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Std. Dev.	4,02	R²	0,9507
Mean	111,81	Adjusted R²	0,9124
C.V. %	3,59	Predicted R²	0,7774
		Adeq Precision	16,1920

Το παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 6) παρουσιάζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών, μέσω του μοντέλου, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως γίνεται φανερό, η συσχέτιση είναι πολύ καλή, καθώς οι τιμές είναι πολύ κοντά στη διαγώνιο και αυτό αποδεικνύει πως οι τιμές πρόβλεψης και οι πειραματικές τιμές δεν αποκλίνουν μεταξύ τους.



Διάγραμμα 6: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 11).

$$TPC = 118.5 + 0.6917 \cdot A + 11.61 \cdot B - 9.99 \cdot C - 8.92 \cdot AC + 4.95 \cdot BC - 9.77 \cdot A^2 - 4.44 \cdot C^2 \quad (11)$$

Συμπερασματικά, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόβλεψη) είναι η παρακάτω (Εξίσωση 12).

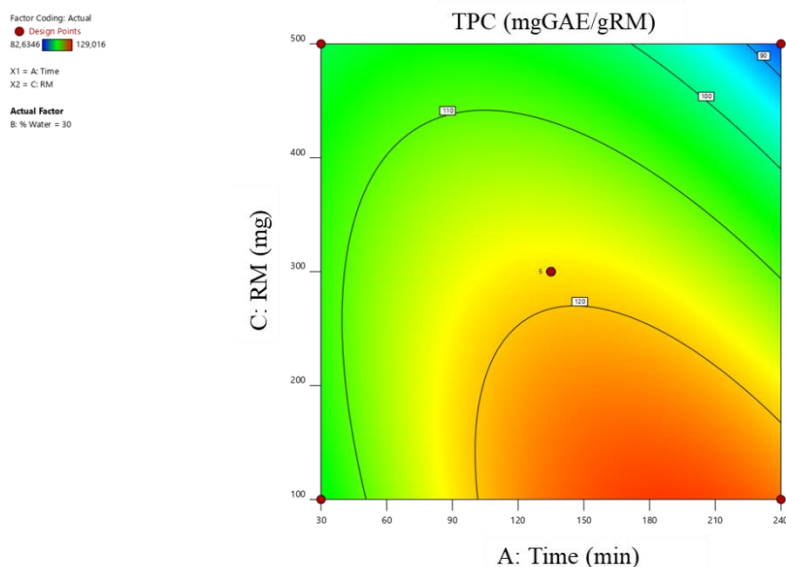
$$TPC = 82.95190 + 0.373383 \cdot Time + 0.209375 \cdot \% Water + 0.036917 \cdot RM - 0.000425 \cdot Time \cdot RM + 0.001237 \cdot \% Water \cdot RM - 0.000886 \cdot Time^2 - 0.000111 \cdot RM^2 \quad (12)$$

Η παραπάνω εξίσωση, η οποία χρησιμοποιεί τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθούν οι προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Η πραγματική εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται σχολιασμός των επιδράσεων των διαφόρων ανεξάρτητων μεταβλητών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Πιο αναλυτικά, αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης και του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, φαίνεται πως ο χρόνος εκχύλισης δεν επιδρά σημαντικά στην τιμή του περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων, ενώ το ποσοστό του νερού στο

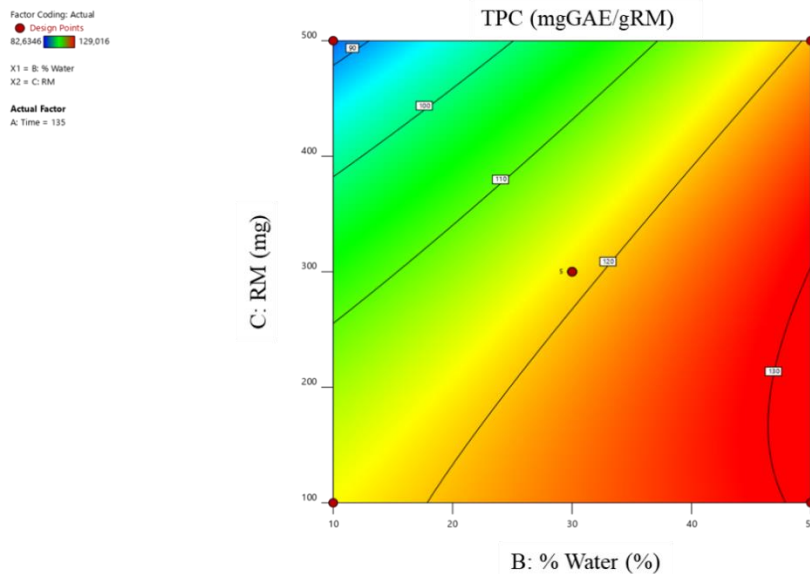
εκχυλιστικό μέσο εμφανίζει σημαντική επίδραση και πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται αύξηση της τιμής των φαινολικών ενώσεων με αύξηση του ποσοστού του νερού.

Όσον αφορά την επίδραση των παραμέτρων του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου, φαίνεται πως ο συνδυασμός μέσου προς υψηλού χρόνου εκχύλισης με χαμηλή ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου επιφέρει υψηλές τιμές TPC. Από την άλλη, μεγάλες ποσότητες άγριου τριαντάφυλλου σε συνδυασμό με μεγάλους χρόνους εκχύλισης οδηγούν σε χαμηλή περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις. Τα παραπάνω οπτικοποιούνται στο Διάγραμμα 7, όπου οι κόκκινες περιοχές αντιστοιχούν στις υψηλότερες περιοχές (και συνεπώς, επιθυμητές) TPC.



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.

Τέλος, όσον αφορά την επίδραση των μεταβλητών της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου και του ποσοστού του νερού στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, φαίνεται πως και οι δύο αυτές μεταβλητές εμφανίζουν σημαντική επίδραση, με σημαντικότερη των δύο να είναι αυτή του νερού. Αναλυτικότερα, η αύξηση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο (από περίπου 35% και άνω), σε συνδυασμό με χαμηλή ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου (από περίπου 300 mg/3 g διαλύτη και κάτω), επιφέρει υψηλή τιμή ολικού περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις. Αντιθέτως, μεγάλη ποσότητα πρώτης ύλης, συνδυαστικά με χαμηλό ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο, έχει ως συνέπεια χαμηλή τιμή περιεχομένου φαινολικών ενώσεων στο εκχύλισμα. Τα παραπάνω παρουσιάζονται και σχηματικά στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής A.

Συνολικά, με βάση όλα τα παραπάνω, προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα αναφορικά με την τάση που ακολουθείται. Πιο αναλυτικά, αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης, αυτός φαίνεται να επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, για τιμές πρώτης ύλης χαμηλότερες από 200 mg/ 3 g διαλύτη. Το παραπάνω συμπέρασμα δεν προκύπτει, ωστόσο, στην περίπτωση της μεγάλης ποσότητας πρώτης ύλης (μεγαλύτερο από 200 mg/ 3 g διαλύτη), γεγονός το οποίο πιθανό να οφείλεται σε περιορισμένη μεταφορά μάζας, λόγω της μεγάλης ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου, και όχι στην αρνητική επίδραση του χρόνου.

Επιπρόσθετα, αναφορικά με το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, γίνεται φανερό πως και αυτό επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, μιας και παρατηρώντας τα πειράματα, τα οποία έχουν ίδιες τις άλλες δύο παραμέτρους και διαφέρουν μόνο ως προς το ποσοστό του νερού, προκύπτει ότι αύξηση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο προκαλεί αύξηση του TPC των εκχυλισμάτων.

Τέλος, αναφορικά με την ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g διαλύτη, αυτή φαίνεται να έχει αντίθετη επίδραση από τις αντίστοιχες των άλλων δύο μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τα οποία διατηρούν ίδιες τις άλλες δύο μεταβλητές και διαφέρουν μόνο ως προς την ποσότητα πρώτης ύλης, προκύπτει πως η αύξηση της ποσότητας αυτής επιφέρει μείωση της τιμής του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός μεγάλου χρόνου εκχύλισης, υψηλού ποσοστού νερού στο εκχυλιστικό μέσο και χαμηλής ποσότητας πρώτης ύλης επιφέρει τα υψηλότερα αποτελέσματα σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως σε κάθε περίπτωση χρειάζεται να λαμβάνονται υπόψη και άλλα κριτήρια, όπως το ενεργειακό κόστος, η υπερμοριακή δομή των NaDES, καθώς και τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας, ώστε να επιλέγονται κατάλληλα οι τιμές των μεταβλητών της εκχύλισης.

3.3.3.2 Περιεκτικότητα εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 20) παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης και της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή (TFC), ανά μονάδα μάζας της στερεής πρώτης ύλης, για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού που διεξήχθη με εκχυλιστικό μέσο το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

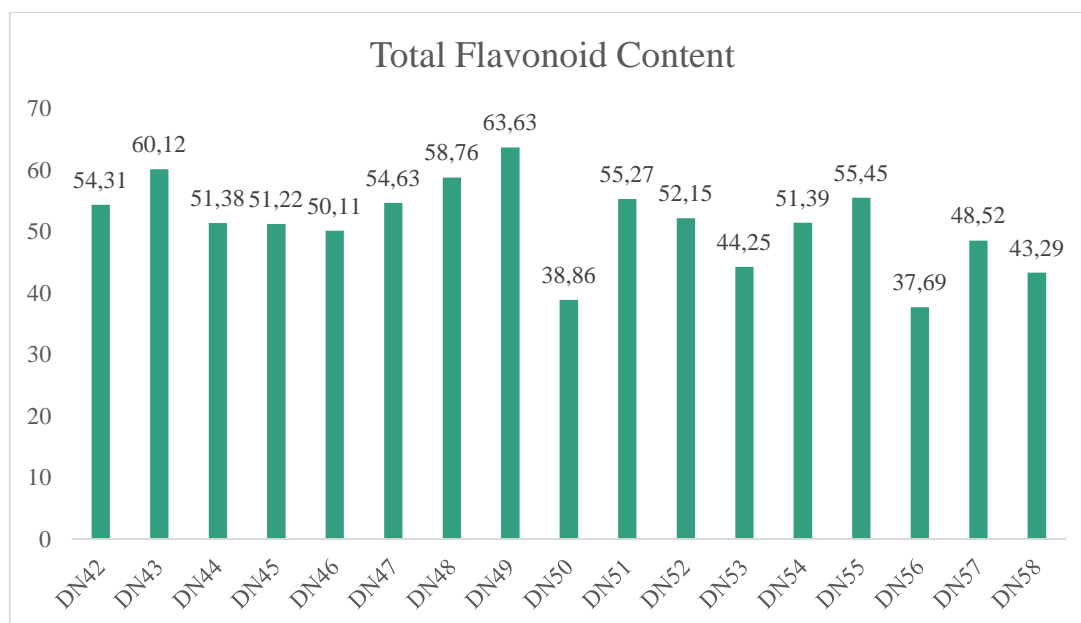
Πίνακας 20: Αποτελέσματα μέτρησης φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x1)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%) (x2)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x3)	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης (mgCAT/mL)	TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})
DN42	135	50	100	0.200	54.31±2.19
DN43	240	30	100	0.231	60.12±2.39
DN44	30	30	100	0.198	51.38±0.86
DN45	135	30	300	0.148	51.22±2.70
DN46	135	30	300	0.145	50.11±3.03
DN47	240	50	300	0.151	54.63±1.23
DN48	135	30	300	0.170	58.76±1.44
DN49	135	50	500	0.293	63.63±3.91
DN50	240	30	500	0.150	38.86±2.28
DN51	240	10	300	0.167	55.27±1.29
DN52	135	10	100	0.210	52.15±1.35
DN53	135	10	500	0.223	44.25±1.44
DN54	135	30	300	0.148	51.39±1.53
DN55	135	30	300	0.160	55.45±0.43
DN56	30	10	300	0.114	37.69±0.70
DN57	30	50	300	0.134	48.52±1.89
DN58	30	30	500	0.208	43.29±1.44

*Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα του Πίνακα 20 παρουσιάζονται σχηματικά στο Διάγραμμα 9.

Αξίζει να υπογραμμιστεί πως οι τιμές ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων κυμαίνονται από 37.69 έως 63.63 $\text{mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$. Οι τιμές αυτές, ακόμα και η χαμηλότερη τιμή που εντοπίζεται, είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές TFC που βρίσκονται στη βιβλιογραφία για εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου.



Διάγραμμα 9: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Από το Διάγραμμα 9 γίνεται φανερό πως η υψηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DN49 και η τιμή που προκύπτει είναι 63.63 $\text{mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$. Το πείραμα αυτό αντιστοιχεί σε συνθήκες εκχύλισης: 135 min χρόνο εκχύλισης, 50% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 500 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη. Σε αντίθεση με το πείραμα DN49, το πείραμα DN56 παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, με αυτή να είναι ίση με 37.69 $\text{mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$. Το εν λόγω πείραμα έχει τις ακόλουθες συνθήκες: 30 min χρόνο εκχύλισης, 10% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 300 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη.

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, επιλέχθηκε το μοντέλο της μορφής «Reduced Qubic Model», δηλαδή το απλοποιημένο κυβικό. Πιο συγκεκριμένα, η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το συγκεκριμένο μοντέλο περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B², C², A²B, A²C και AB², όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Στον παρών πειραματικό σχεδιασμό, ο όρος A συμβολίζει το χρόνο εκχύλισης, ο όρος B το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και ο όρος C την ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου. Από την εν λόγω μορφή του μοντέλου αφαιρούνται σταδιακά οι όροι που δεν εμφανίζονται ως στατιστικά σημαντικοί, δηλαδή οι όροι με υψηλά p-values, και που επηρέαζαν αρνητικά την προσαρμογή του μοντέλου.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 21) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA, αφού αρχικά από το πλήρες κυβικό μοντέλο έχει αφαιρεθεί ο όρος C².

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ANOVA για το μοντέλο *Reduced Qubic Model* που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	697,25	11	63,39	11,79	0,0068	significant
A-Time	8,55	1	8,55	1,59	0,2629	
B-% Water	138,83	1	138,83	25,82	0,0038	
C-RM	9,38	1	9,38	1,74	0,2438	
AB	28,41	1	28,41	5,28	0,0699	
AC	33,83	1	33,83	6,29	0,0539	
BC	23,42	1	23,42	4,35	0,0913	
A ²	100,30	1	100,30	18,65	0,0076	
B ²	0,7362	1	0,7362	0,1369	0,7265	
A ² B	19,74	1	19,74	3,67	0,1135	
A ² C	58,79	1	58,79	10,93	0,0213	
AB ²	36,23	1	36,23	6,74	0,0485	
Residual	26,89	5	5,38			
Lack of Fit	0,5800	1	0,5800	0,0882	0,7813	not significant
Pure Error	26,31	4	6,58			
Cor Total	724,13	16				

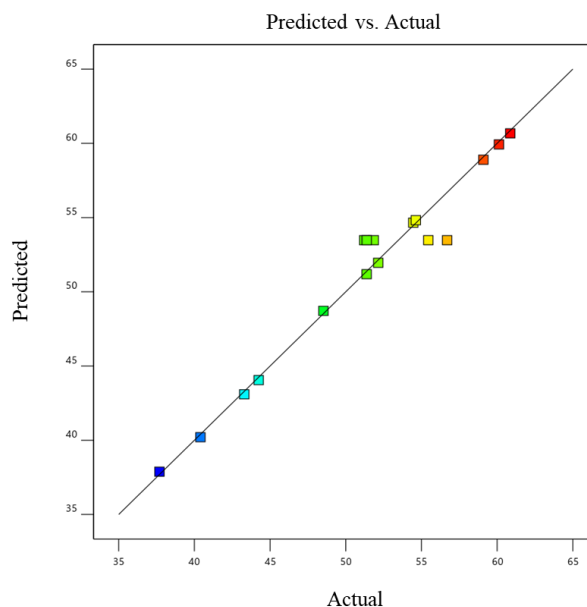
Η F-value του μοντέλου είναι ίση με 11.79, γεγονός που υποδηλώνει πως το μοντέλο είναι σημαντικό και πως η πιθανότητα η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο είναι ίση με 0.68%. Επιπρόσθετα, παρατηρείται πως ορισμένοι όροι του μοντέλου παρουσιάζουν p-value μεγαλύτερο από 0.05. Οι όροι αυτοί δεν απορρίπτονται, καθώς παρότι δεν είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, για την ιεραρχία του μοντέλου χρειάζεται να διατηρηθούν. Ακόμη, η έλλειψη προσαρμογή (Lack of Fit) φαίνεται να μην είναι σημαντική για το μοντέλο, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται σωστά.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22) παρουσιάζεται η τιμή του R² του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή του είναι παραπλήσια της μονάδας, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R²» και «Predicted R²» δεν παρουσιάζουν απόκλιση μεγαλύτερη από 0.2 μονάδες, οπότε η τιμή του R² κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή του «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, το οποίο είναι επιθυμητό. Αυτό υποδεικνύει πως η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Std. Dev.	2,32	R²	0,9629
Mean	51,38	Adjusted R²	0,8812
C.V. %	4,51	Predicted R²	0,8024
		Adeq Precision	11,6958

Το παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 10) παρουσιάζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών, μέσω του μοντέλου, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως γίνεται φανερό, η συσχέτιση είναι πολύ καλή, καθώς οι τιμές είναι πολύ κοντά στη διαγώνιο και αυτό αποδεικνύει πως οι τιμές πρόβλεψης και οι πειραματικές τιμές δεν αποκλίνουν μεταξύ τους.



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

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 13).

$$TFC = 53.48 + 1.46 \cdot A + 5.89 \cdot B - 1.53 \cdot C - 2.67 \cdot AB - 2.91 \cdot AC + 2.42 \cdot BC - 4.87 \cdot A^2 + 0.4176 \cdot B^2 - 3.14 \cdot A^2B - 5.42 \cdot A^2C + 4.26 \cdot AB^2 \quad (13)$$

Συμπερασματικά, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 14).

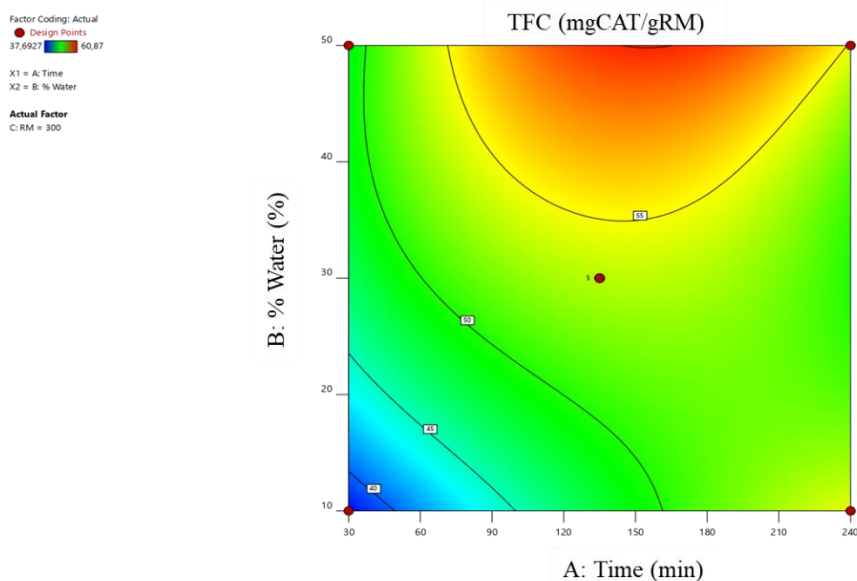
$$TFC = 41.55635 - 0.010450 \cdot Time + 0.782961 \cdot \% Water - 0.051919 \cdot RM - 0.003502 \cdot Time \cdot \% Water + 0.000525 \cdot Time \cdot RM + 0.000605 \cdot \% Water \cdot RM + 0.000723 \cdot Time^2 - 0.012637 \cdot \% Water^2 - 0.000014 \cdot Time^2 \cdot \% Water - 2.45874 \cdot 10^{-6} \cdot Time^2 \cdot RM + 0.000101 \cdot Time \cdot \% Water^2 \quad (14)$$

Η παραπάνω εξίσωση, η οποία χρησιμοποιεί τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθούν οι προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα.

Παρακάτω πραγματοποιείται σχολιασμός των επιδράσεων που εμφανίζουν οι ανεξάρτητες μεταβλητές στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων των εκχυλισμάτων. Αναφορικά με την επίδραση που εμφανίζει ο χρόνος εκχύλισης και το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, φαίνεται να μην υπάρχει μία συγκεκριμένη τάση. Πιο συγκεκριμένα, ο

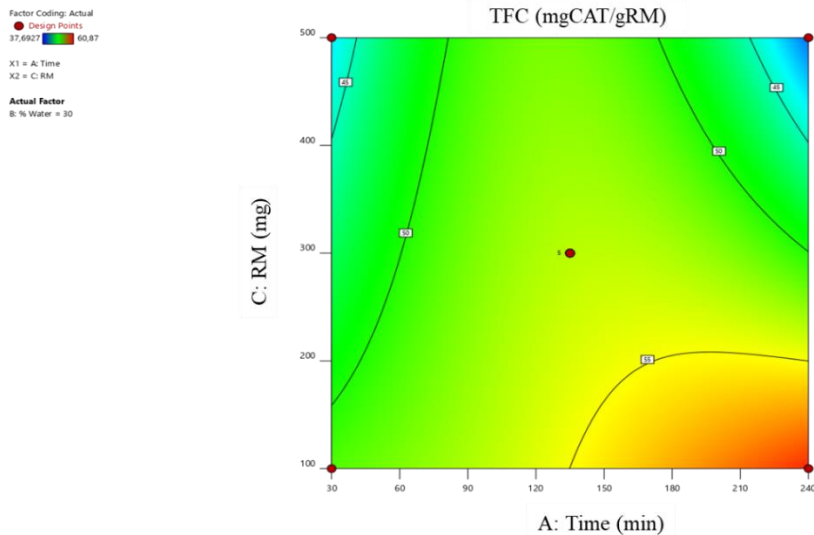
συνδυασμός ενός μέσου χρόνου εκχύλισης με το υψηλό ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο φαίνεται να επιφέρει το μεγαλύτερο δυνατό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις.

Σε αντίθεση με το παραπάνω, εκχυλίσματα που προέρχονται από σύντομες εκχυλίσεις (μικρής χρονικής διάρκειας) και με χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό εκχυλιστικό μέσο, φαίνεται να παρουσιάζουν χαμηλό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις. Τα παραπάνω οπτικοποιούνται στο Διάγραμμα 11.



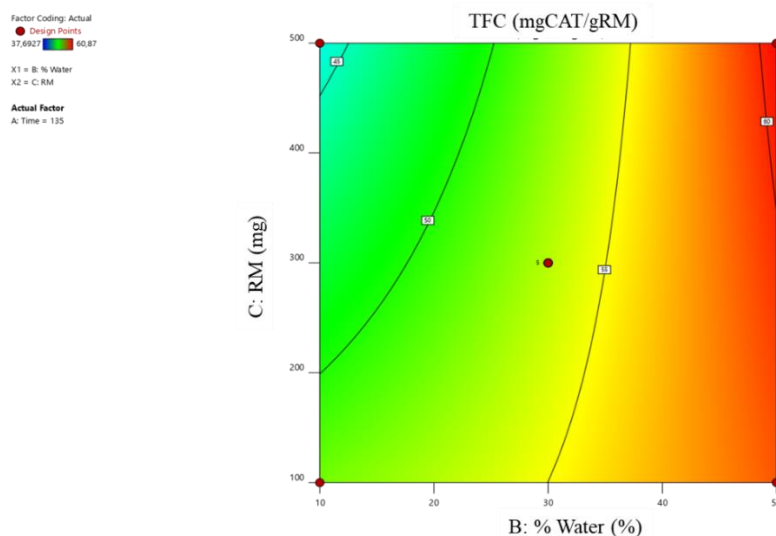
Διάγραμμα 11: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής C.

Επιπροσθέτως, όσον αφορά την επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου, ούτε στη συγκεκριμένη περίπτωση παρουσιάζεται συγκεκριμένη τάση. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται πως ο συνδυασμός μικρής ποσότητας πρώτης ύλης και μεγάλου χρόνου εκχύλισης επιφέρει υψηλές τιμές περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων. Αντίθετα, για μικρούς χρόνους εκχύλισης και μεγάλη ποσότητα πρώτης ύλης, ή για μεγάλους χρόνους εκχύλισης και μεγάλη ποσότητα πρώτης ύλης, παρατηρούνται χαμηλές τιμές περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα. Συμπερασματικά, η αύξηση του χρόνου και η ταυτόχρονη μείωση της ποσότητας του άγριου τριαντάφυλλου επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα παραπάνω παρουσιάζονται και σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.

Τέλος, όσον αφορά την επίδραση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση, γίνεται φανερό πως τα υψηλά ποσοστά νερού, σε οποιαδήποτε ποσότητα πρώτης ύλης, ευνοούν την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων, όπως παρατηρήθηκε και στις τιμές TPC. Πιο αναλυτικά, όπως γίνεται φανερό η ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου δεν εμφανίζει τόσο ισχυρή επίδραση, όσο αυτή του νερού στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Σε χαμηλές περιεκτικότητες νερού στο διαλύτη, γίνεται αντιληπτό πως η αύξηση της ποσότητας του άγριου τριαντάφυλλου επιφέρει μείωση των φλαβονοειδών στο εκχύλισμα. Αντιθέτως, σε υψηλά ποσοστά νερού η επίδραση της πρώτης ύλης είναι αμελητέα. Συνεπώς, συμπεραίνεται πως η αύξηση της περιεκτικότητας του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, κυρίως, καθώς και η μείωση της ποσότητας της πρώτης ύλης, ευνοεί την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων. Τα παραπάνω οπτικοποιούνται στο Διάγραμμα 13.



Διάγραμμα 13: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής A.

Συνολικά, με βάση όλα τα παραπάνω, προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα αναφορικά με την τάση που ακολουθείται. Πιο αναλυτικά, αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης, αυτός φαίνεται να επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, μιας και παρατηρώντας τα πειράματα, τα οποία έχουν ίδιες τις άλλες δύο παραμέτρους και διαφέρουν μόνο ως προς το χρόνο, προκύπτει ότι αύξηση του χρόνου προκαλεί αύξηση των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα. Το παραπάνω συμπέρασμα δεν προκύπτει, ωστόσο, στην περίπτωση της μεγάλης ποσότητας πρώτης ύλης, γεγονός το οποίο πιθανό να οφείλεται σε περιορισμένη μεταφορά μάζας, λόγω της μεγάλης ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου, και όχι στην αρνητική επίδραση του χρόνου. Επιπρόσθετα, αναφορικά με το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, γίνεται φανερό πως και αυτό επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, μιας και παρατηρώντας τα πειράματα, τα οποία έχουν ίδιες τις άλλες δύο παραμέτρους και διαφέρουν μόνο ως προς το ποσοστό του νερού, προκύπτει ότι αύξηση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο προκαλεί αύξηση του περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις των εκχυλισμάτων. Τέλος, αναφορικά με την ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g διαλύτη, αυτή φαίνεται να έχει αντίθετη επίδραση από τις αντίστοιχες των άλλων δύο μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τα οποία διατηρούν ίδιες τις άλλες δύο μεταβλητές και διαφέρουν μόνο ως προς την ποσότητα πρώτης ύλης, προκύπτει πως η αύξηση της ποσότητας αυτής επιφέρει μείωση της τιμής του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός μεγάλου χρόνου εκχύλισης, υψηλού ποσοστού νερού στο εκχυλιστικό μέσο και χαμηλής ποσότητας πρώτης ύλης επιφέρει τα υψηλότερα αποτελέσματα σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως σε κάθε περίπτωση χρειάζεται να λαμβάνονται υπόψη και άλλα κριτήρια, όπως το ενεργειακό κόστος, η υπερμοριακή δομή των NaDES, καθώς και τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας, ώστε να επιλέγονται κατάλληλα οι τιμές των μεταβλητών της εκχύλισης.

3.3.3.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Έπειτα από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης που πραγματοποιήθηκε σε προκαταρκτικά πειράματα, και τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην Ενότητα 3.3.1 της παρούσας εργασίας, πραγματοποιείται μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με χρήση ως NaDES το Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5. Όπως και στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων, έτσι και στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού, προσδιορίζεται η % αναστολή των ριζών του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος, για τους τέσσερις χρόνους επώασης των δειγμάτων, 15, 30, 45 και 60 min. Ο προσδιορισμός αυτός διεξάγεται μέσω γραφημάτων. Στα διαγράμματα αυτά προσαρμόζεται ευθεία γραμμή και μέσω της κλίσης και της αποτέμνουσας αυτής υπολογίζεται, τελικά, ο δείκτης IC₅₀, από την Εξίσωση 10. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 23) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών του δείκτη IC₅₀ για τους τέσσερις

χρόνους επώασης, 15, 30, 45 και 60 min για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

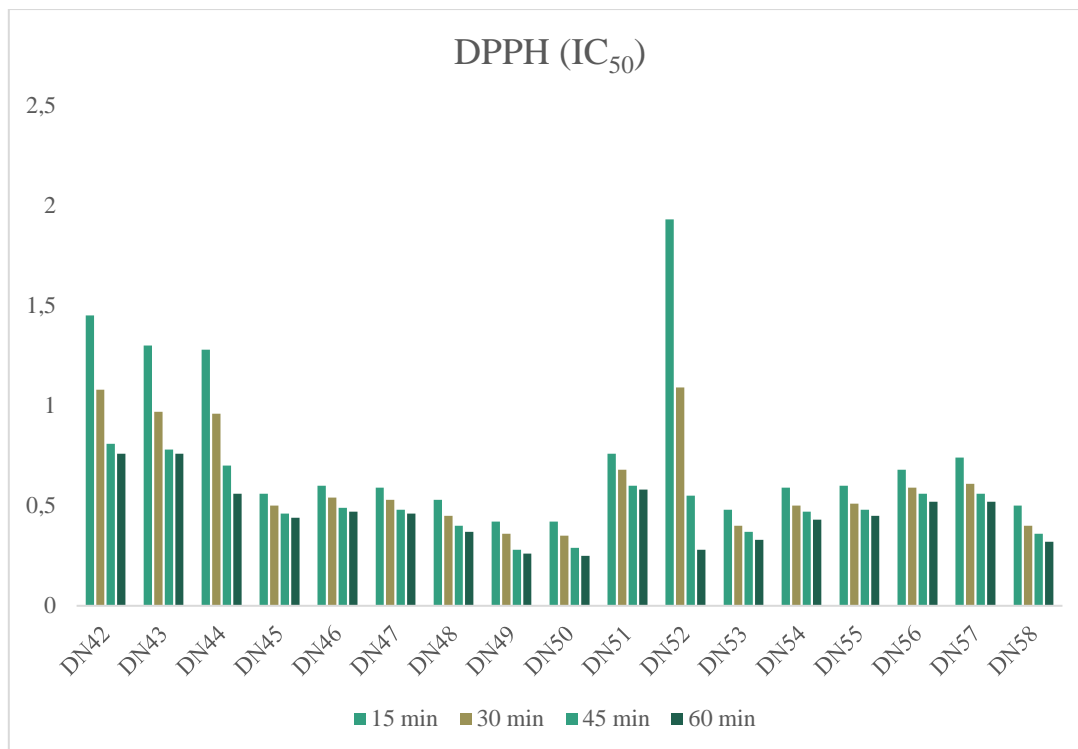
Πίνακας 23: Αποτελέσματα μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%) (x ₂)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₃)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN42	135	50	100	1.45	1.08	0.81	0.76
DN43	240	30	100	1.30	0.97	0.78	0.76
DN44	30	30	100	1.28	0.96	0.70	0.56
DN45	135	30	300	0.56	0.50	0.46	0.44
DN46	135	30	300	0.60	0.54	0.49	0.47
DN47	240	50	300	0.59	0.53	0.48	0.46
DN48	135	30	300	0.53	0.45	0.40	0.37
DN49	135	50	500	0.42	0.36	0.28	0.26
DN50	240	30	500	0.42	0.35	0.29	0.25
DN51	240	10	300	0.76	0.68	0.60	0.58
DN52	135	10	100	1.93	1.09	0.55	0.28
DN53	135	10	500	0.48	0.40	0.37	0.33
DN54	135	30	300	0.59	0.50	0.47	0.43
DN55	135	30	300	0.60	0.51	0.48	0.45
DN56	30	10	300	0.68	0.59	0.56	0.52
DN57	30	50	300	0.74	0.61	0.56	0.52
DN58	30	30	500	0.50	0.40	0.36	0.32

*Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του δείκτη IC₅₀ που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε ικανότητα δέσμευσης των ριζών του DPPH.

** Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης, με τη μέθοδο DPPH, προτύπου, αιθανολικού διαλύματος ασκορβικού οξέος, με συγκέντρωση 1mg / 50 mL. Η τιμή του δείκτη IC₅₀, για χρόνους επώασης 15, 30, 45 και 60 min προκύπτουν ίσοι με 7.07, 7.04, 7.06 και 7.05 mg/mL.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται σχηματικά στο Διάγραμμα 14.



Διάγραμμα 14: Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του δείκτη IC₅₀, και κατά συνέπεια της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλίσματων, του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό πως την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν τα εκχυλίσματα με κωδικούς DN49 και DN50 με τιμές του δείκτη IC₅₀ για χρόνο επώασης 15 min ίσες με 0.42 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος. Παρότι τα εκχυλίσματα αυτά παρουσιάζουν τη χαμηλότερη τιμή δείκτη IC₅₀, και κατά συνέπεια την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, και τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσιάζουν εξαιρετικά ικανοποιητικές τιμές και ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Η λιγότερη ικανοποιητική, ωστόσο και πάλι πολύ καλή, αντιοξειδωτική δράση προκύπτει στο εκχύλισμα με κωδικό DN52, όπου εμφανίζεται ο υψηλότερος δείκτης IC₅₀, με τιμή, για χρόνο επώασης 15 min, ίση με 1.93 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος.

Αναφορικά με τη μελέτη της απόκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλίσματων, επιλέγεται ο αντίστροφος μετασχηματισμός και συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μειωμένο κυβικό μοντέλο (Reduced Qubic Model). Η αρχική μορφή της εξίσωσης που διέπει το συγκεκριμένο μοντέλο περιέχει τους όρους A, B, C, AB, BC, AC, A², B² και C², όπου με A, B, C έχουν συμβολιστεί οι ανεξάρτητες μεταβλητές. Στον παρών πειραματικό σχεδιασμό, ο όρος A συμβολίζει το χρόνο εκχύλισης, ο όρος B το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και ο όρος C την ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου. Στην εν λόγω περίπτωση, χρησιμοποιούνται όλοι οι όροι της εξίσωσης, με εξαίρεση τον όρο BC, ο οποίος παρουσιάζει p-value μεγαλύτερο από 0.05, άρα δεν είναι στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο αξιοπιστίας 95%. Παράλληλα, προστίθεται ο όρος A²C, ο οποίος έχει p-value μικρότερο από 0.05, συνεπώς είναι στατιστικά σημαντικός, με στόχο την καλύτερη προσαρμογή.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 24) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα ANOVA για τον αντίστροφο μετασχηματισμό του μοντέλου *Reduced Qubic Mondel* που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένη σε δείκτη IC_{50} .

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5,08	9	0,5645	158,40	< 0.0001	significant
A-Time	0,0384	1	0,0384	10,78	0,0134	
B-% Water	0,0681	1	0,0681	19,10	0,0033	
C-RM	2,62	1	2,62	735,87	< 0.0001	
AB	0,0612	1	0,0612	17,18	0,0043	
AC	0,0434	1	0,0434	12,19	0,0101	
A ²	0,0381	1	0,0381	10,69	0,0137	
B ²	0,1072	1	0,1072	30,09	0,0009	
C ²	0,0765	1	0,0765	21,48	0,0024	
A ² C	0,0210	1	0,0210	5,90	0,0455	
Residual	0,0249	7	0,0036			
Lack of Fit	0,0182	3	0,0061	3,60	0,1237	not significant
Pure Error	0,0067	4	0,0017			
Cor Total	5,11	16				

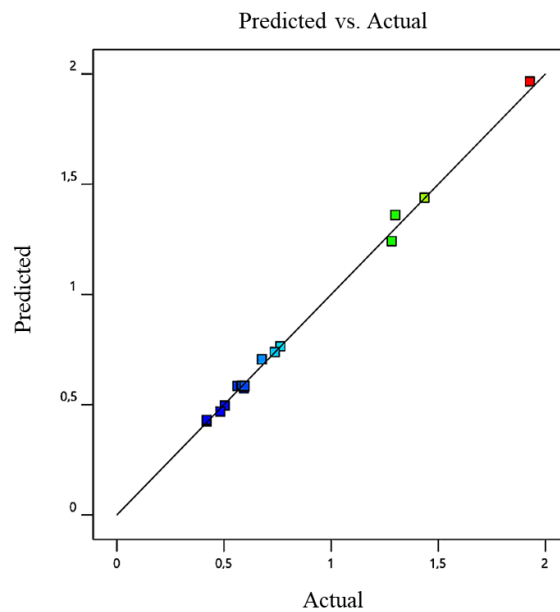
Η F-value του μοντέλου είναι ίση με 158.40, γεγονός που υποδηλώνει πως το μοντέλο είναι σημαντικό και πως η πιθανότητα η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο είναι μικρότερη από 0.01%. Παράλληλα, όλοι οι όροι του μοντέλου παρουσιάζουν p-value μικρότερο από 0.05, συνεπώς, είναι σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Ακόμη, η έλλειψη προσαρμογή (Lack of Fit) φαίνεται να μην είναι σημαντική για το μοντέλο, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται σωστά.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 25) παρουσιάζεται η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το δείκτη IC_{50} , δηλαδή το δείκτη που εκφράζει την αντιοξειδωτική δράση. Η τιμή του είναι παραπλήσια της μονάδας, ίση με 0.9951, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R^2 » και «Predicted R^2 » δεν παρουσιάζουν απόκλιση μεγαλύτερη από 0.2 μονάδες, και συγκεκριμένα οι τιμές του είναι πολύ κοντινές, οπότε η τιμή του R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή του «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από το 4, το οποίο είναι επιθυμητό. Αυτό υποδεικνύει πως η τιμή είναι ικανοποιητική και το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 25: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του δείκτη IC_{50} και κατά συνέπεια, της αντιοξειδωτικής δράσης.

Std. Dev.	0,0597	R²	0,9951
Mean	1,53	Adjusted R²	0,9888
C.V. %	3,91	Predicted R²	0,9203
		Adeq Precision	40,3421

Το παρακάτω γράφημα (Διάγραμμα 15) παρουσιάζει τη συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών, μέσω του μοντέλου, με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν. Όπως γίνεται φανερό, η συσχέτιση είναι πολύ καλή, καθώς οι τιμές είναι πολύ κοντά στη διαγώνιο και αυτό αποδεικνύει πως οι τιμές πρόβλεψης και οι πειραματικές τιμές δεν αποκλίνουν μεταξύ τους.



Διάγραμμα 15: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του δείκτη IC_{50} και της αντιοξειδωτικής δράσης.

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του δείκτη IC_{50} , και κατά συνέπεια της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, είναι η παρακάτω (Εξίσωση 15).

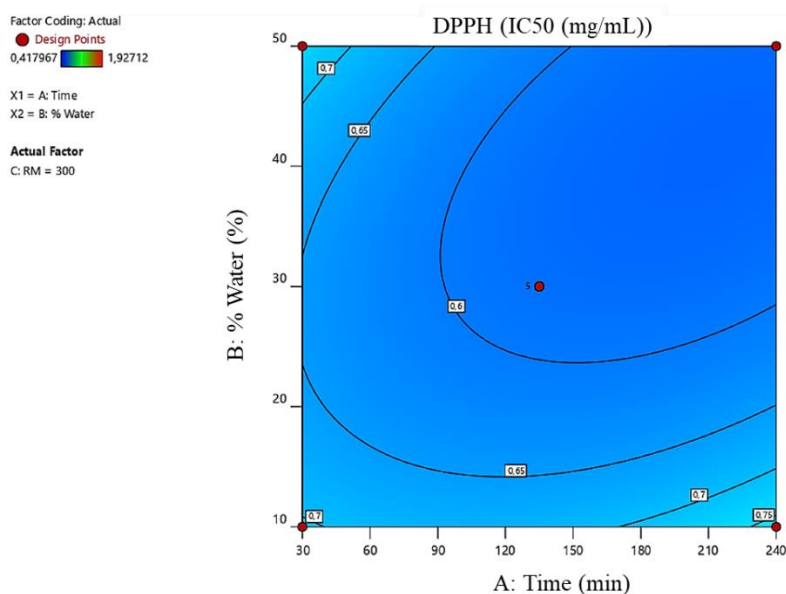
$$1/IC_{50} = 1.71 + 0.0693 \cdot A + 0.0922 \cdot B + 0.8097 \cdot C + 0.1237 \cdot AB + 0.1042 \cdot AC - 0.0951 \cdot A^2 - 0.1596 \cdot B^2 - 0.1348 \cdot C^2 - 0.1025 \cdot A^2C \quad (15)$$

Συμπερασματικά, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του δείκτη IC_{50} είναι η παρακάτω (Εξίσωση 16).

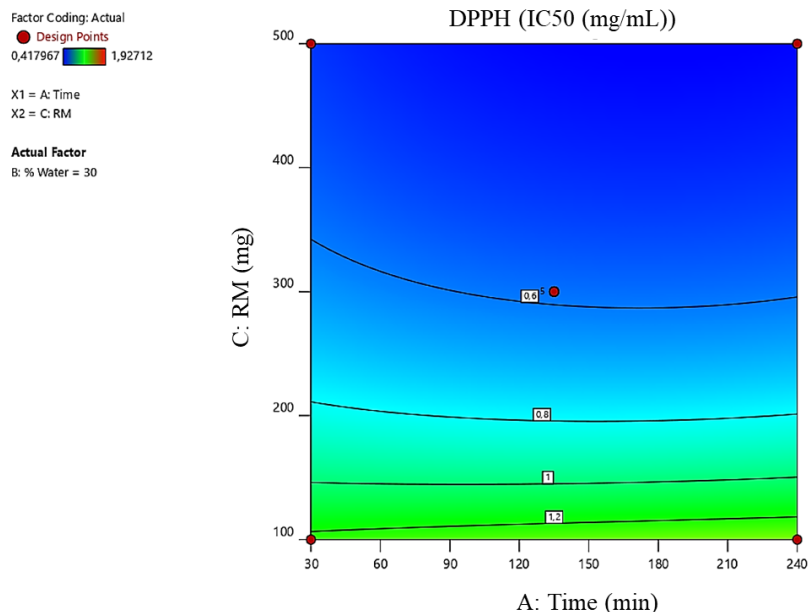
$$1/IC_{50} = +0.143838 - 0.004032 \cdot Time + 0.020595 \cdot \% Water + 0.004554 \cdot RM + 0.000059 \cdot Time \cdot \% Water + 0.000018 \cdot Time \cdot RM + 5.31959 \cdot 10^{-6} \cdot Time^2 - 0.000399 \cdot \% Water^2 - 3.37087 \cdot 10^{-6} \cdot RM^2 - 4.64939 \cdot 10^{-8} \cdot Time^2 \cdot RM \quad (16)$$

Η παραπάνω εξίσωση, η οποία χρησιμοποιεί τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθούν οι προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα.

Αναφορικά με την επίδραση που εμφανίζουν οι μεταβλητές στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, λόγω των πολύ χαμηλών τιμών του δείκτη IC_{50} , είναι εξαιρετικά δύσκολο να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για την τάση που ακολουθείται. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης και το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο δεν προκύπτει σημαντική επίδραση αυτών στο αποτέλεσμα. Ωστόσο, αναφορικά με την ποσότητα του άγριου τριαντάφυλλου, αυτή η μεταβλητή φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο δείκτη IC_{50} και κατά συνέπεια, στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος και συγκεκριμένα, η αύξηση της ποσότητας προκαλεί μείωση της τιμής του δείκτη, συνεπώς, αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Το συμπέρασμα αυτό γίνεται φανερό και από τα δύο διαγράμματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Διάγραμμα 16 και 17). Αξίζει να σημειωθεί πως, σε αντίθεση με τα διαγράμματα contour στις περιπτώσεις του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, στην περίπτωση του δείκτη IC_{50} , το επιθυμητό αποτέλεσμα βρίσκεται στις μπλε περιοχές των διαγραμμάτων, μιας και οι χαμηλές τιμές του δείκτη αντιστοιχούν σε υψηλή αντιοξειδωτική δράση.



Διάγραμμα 16: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC_{50} συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής C.



Διάγραμμα 17: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη μεσαία τιμή της μεταβλητής B.

3.3.3.4 Βελτιστοποίηση της διεργασίας με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, εντός του πεδίου μελέτης. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 26). Να σημειωθεί πως τα παρακάτω αποτελέσματα αποτελούν προβλέψεις του λογισμικού με βάση τα επιλεγόμενα μοντέλα.

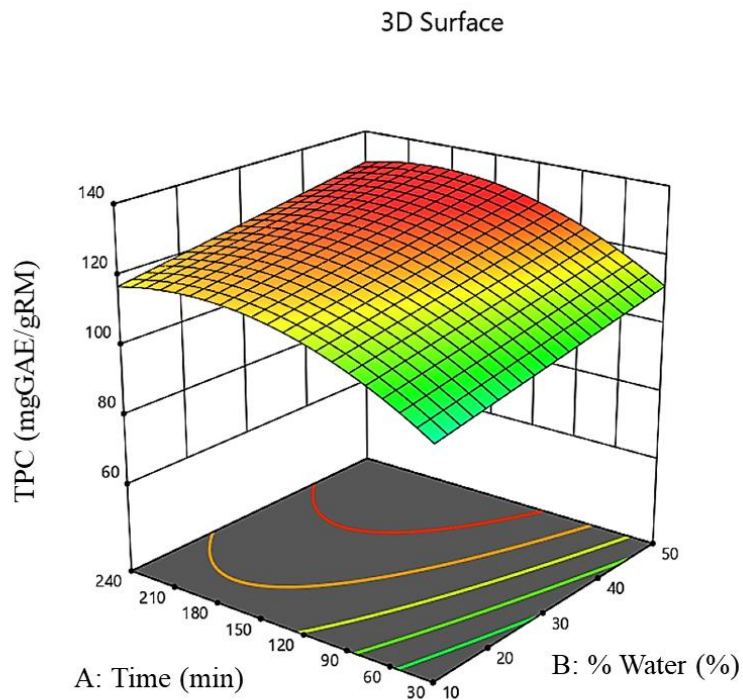
Πίνακας 26: Βέλτιστες συνθήκες και παράμετροι εκχύλισης για την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πρόβλεψη TPC (mg _{eq} GAL/g _{wild rose})	Πρόβλεψη TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})	Πρόβλεψη DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)
177	50	101.4	133.0	60.88	1.34

Στη συνέχεια, παρατίθενται οι τρισδιάστατες μορφές διαγραμμάτων των επιφανειών απόκρισης συναρτήσει δύο εκ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών σε κάθε περίπτωση. Η τρίτη μεταβλητή λαμβάνει τη βέλτιστη τιμή της στα διαγράμματα αυτά. Αξίζει να σημειωθεί πως ως A συμβολίζεται η μεταβλητή του χρόνου εκχύλισης, ως B το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και ως C η ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου. Τα τρία πρώτα διαγράμματα (Διαγράμματα 18, 19 και 20) αφορούν το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ενώ

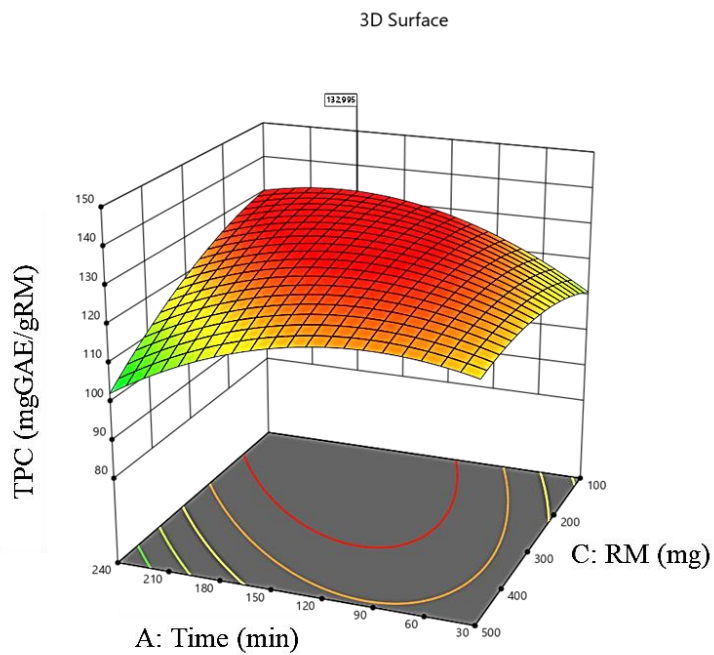
τα τρία επόμενα (Διαγράμματα 21, 22 και 23) το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 82,6346 129,016
 X1 = B: % Water
 X2 = A: Time
 Actual Factor
 C: RM = 101,355



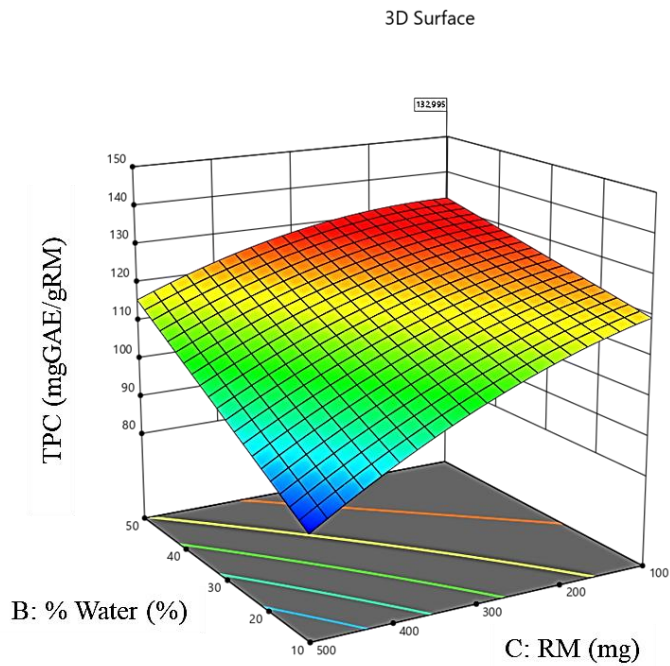
Διάγραμμα 18: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 82,6346 129,016
 X1 = A: Time
 X2 = C: RM
 Actual Factor
 B: % Water = 49,9877



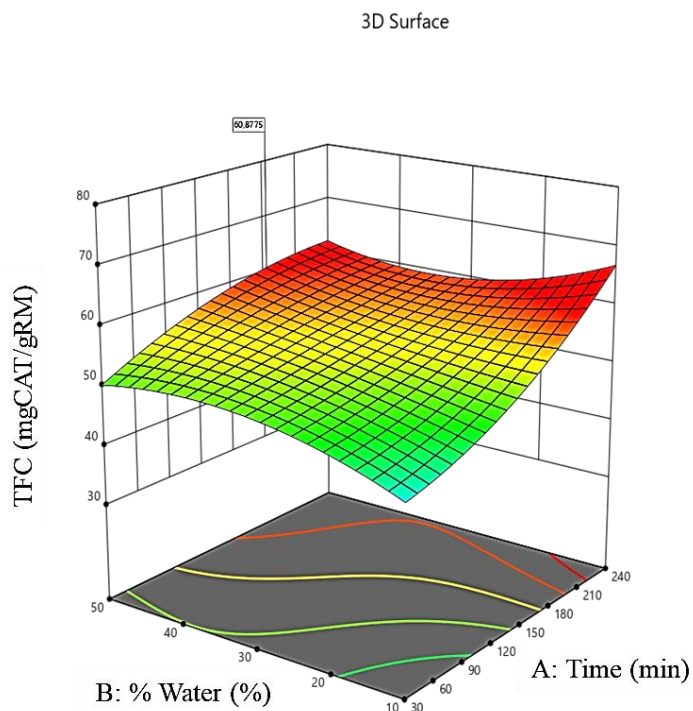
Διάγραμμα 19: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 82,6346 129,016
 X1 = B: % Water
 X2 = C: RM
 Actual Factor
 A: Time = 177,574



Διάγραμμα 20: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής A.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 37,6927 60,87
 X1 = A: Time
 X2 = B: % Water
 Actual Factor
 C: RM = 101,355

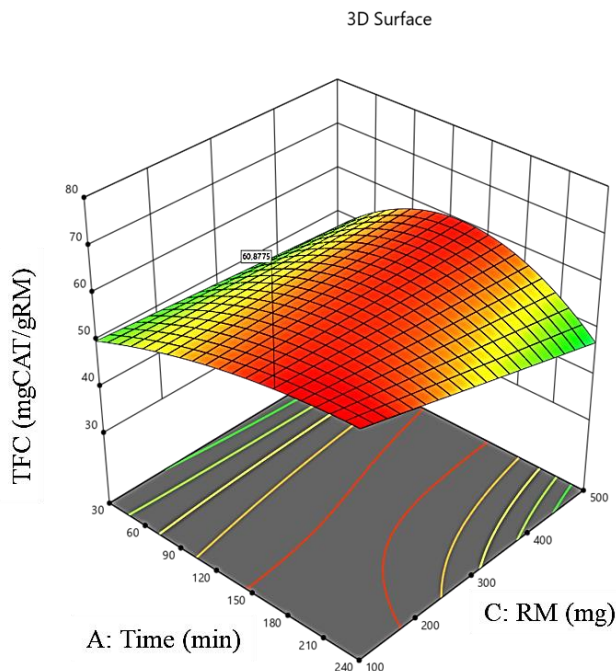


Διάγραμμα 21: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 37,6927 60,87

X1 = A: Time
 X2 = C: RM

Actual Factor
 B: % Water = 49,9877

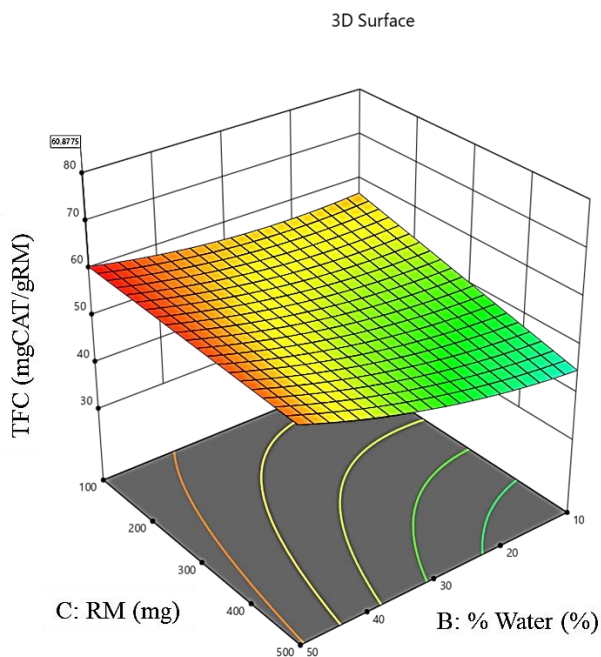


Διάγραμμα 22: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 37,6927 60,87

X1 = B: % Water
 X2 = C: RM

Actual Factor
 A: Time = 177,574



Διάγραμμα 23: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών B και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής A.

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Διαγράμματα 18, 19 και 20), καθώς και από τα αποτελέσματα βελτιστοποίησης του TPC, γίνεται αντιληπτό πως αναφορικά με το χρόνο της εκχύλισης, αύξηση αυτού επιφέρει αύξηση των φαινολικών ενώσεων στο

εκχύλισμα, χωρίς όμως να έχει πολύ σημαντική επίδραση η συγκεκριμένη παράμετρος και παράλληλα, έπειτα από ένα συγκεκριμένο χρόνο, φαίνεται πως το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις είναι χαμηλότερο. Συνεπώς, ο βέλτιστος χρόνος κυμαίνεται περίπου στις τρεις ώρες. Ακόμη, αναφορικά με το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, αυτό φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο TPC και πιο συγκεκριμένα, η αύξηση του ποσοστού αυτού επιφέρει σημαντική αύξηση των φαινολικών ενώσεων.

Όσον αφορά την ποσότητα πρώτης ύλης, αύξηση αυτής επιφέρει μείωση του περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος. Η ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο και μείωση της ποσότητας πρώτης ύλης δίνει ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη τιμή περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, με κατάλληλη επιλογή ενός μέσου χρόνου εκχύλισης.

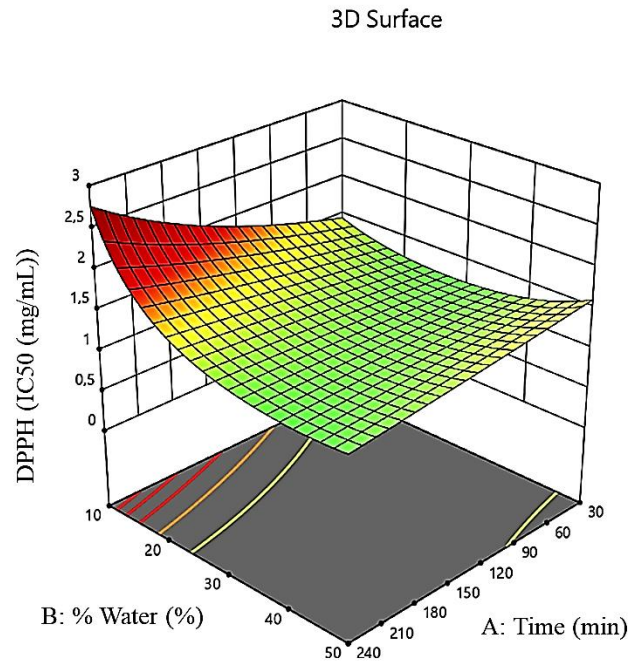
Επιπρόσθετα, βάσει των διαγραμμάτων (Διαγράμματα 21, 22 και 23), καθώς και των αποτελεσμάτων βελτιστοποίησης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, γίνεται φανερό πως αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης, αυτός είναι εξέχουσας σημασίας και μάλιστα, αύξηση αυτού επιφέρει αύξηση των φλαβονοειδών ενώσεων στο εκχύλισμα. Να σημειωθεί πως, στο εύρος που έχει επιλεγεί για χρονική διάρκεια εκχύλισης φαίνεται να παρουσιάζεται μέγιστο στο περιεχόμενο των φλαβονοειδών, έπειτα από το οποίο η τιμή των φλαβονοειδών παραμένει σταθερή. Ακόμη, η αύξηση του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο επιφέρει αύξηση του περιεχομένου των φλαβονοειδών ενώσεων, ωστόσο, ο συγκεκριμένος παράγοντας δε φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στα φλαβονοειδή. Όσον αφορά την ποσότητα της πρώτης ύλης στην εκχύλιση, αύξηση αυτής προκαλεί μείωση των φλαβονοειδών στο εκχύλισμα. Συμπερασματικά, μέσω της ταυτόχρονης αύξησης του χρόνου εκχύλισης και μείωσης της πρώτης ύλης λαμβάνεται η μέγιστη τιμή περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, με κατάλληλη, φυσικά, επιλογή του ποσοστού του νερού στο εκχυλιστικό μέσο, παρότι δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.

Σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν για την ταυτόχρονη αύξηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων και του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, παρουσιάζεται και τα τρισδιάστατα διαγράμματα της απόκρισης του δείκτη IC_{50} , ως συνάρτηση των δύο εκ των τριών ανεξαρτήτων μεταβλητών σε κάθε περίπτωση.

Factor Coding: Actual
● Design Points
0,417967 1,92712

X1 = A: Time
X2 = B: % Water

Actual Factor
C: RM = 101,355

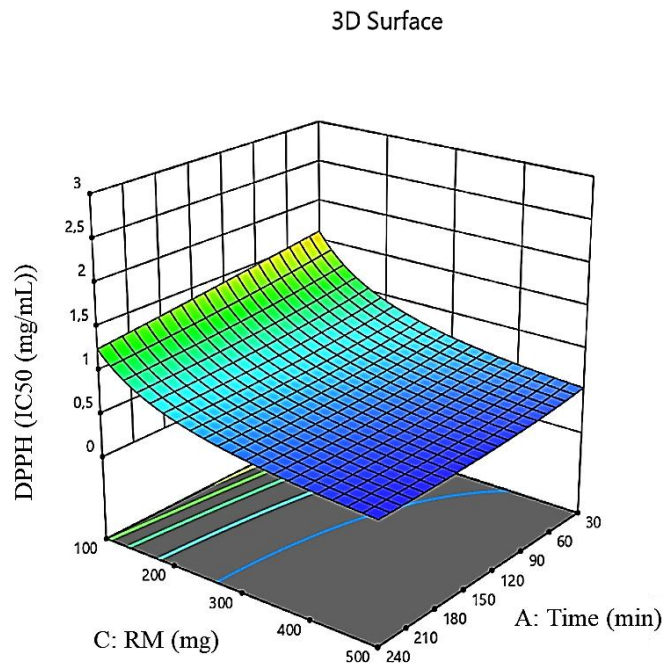


Διάγραμμα 24: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και B, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής C.

Factor Coding: Actual
● Design Points
0,417967 1,92712

X1 = A: Time
X2 = C: RM

Actual Factor
B: % Water = 49,9877



Διάγραμμα 25: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC₅₀ συναρτήσει των μεταβλητών A και C, για τη βέλτιστη τιμή της μεταβλητής B.

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Διαγράμματα 24 και 25) γίνεται φανερό πως η αύξηση του χρόνου εκχύλισης επιφέρει μείωση της τιμής του δείκτη IC₅₀, χωρίς όμως να εμφανίζει πολύ σημαντική επίδραση. Επιπρόσθετα, αναφορικά με την ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου κατά την εκχύλιση, φαίνεται πως η αύξηση αυτή επιφέρει

μείωση της τιμής του δείκτη IC₅₀. Ακόμη, το ποσοστό του νερού στο εκχυλιστικό μέσο φαίνεται να μην έχει μία σταθερή επίδραση στην τιμή του δείκτη IC₅₀. Πιο συγκεκριμένα, μικρές τιμές ποσοστού νερού, περίπου 10%, καθώς και μεγάλες τιμές αυτού, περίπου 50%, φαίνεται να επιφέρουν αύξηση της τιμής του δείκτη IC₅₀. Αντίθετα, ενδιάμεσες τιμές ποσοστού, δηλαδή περίπου 30%, φαίνεται να μειώνουν την τιμή του δείκτη.

Συμπερασματικά, η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή του δείκτη IC₅₀ φαίνεται να είναι πιο σύνθετη από τις αντίστοιχες στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, γεγονός που φανερώνεται και από το προκύπτον μοντέλο, με το χρόνο εκχύλισης να μην επιδρά σημαντικά, τα υψηλά και τα χαμηλά ποσοστά νερού στο εκχυλιστικό μέσο να επιφέρουν αύξηση της τιμής του δείκτη και την υψηλή ποσότητα πρώτης ύλης να επιφέρει μείωση της τιμής του δείκτη. Τέλος, αξίζει να τονιστεί πως, σε αντίθεση με το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, το επιθυμητό για το δείκτη IC₅₀ είναι να παρουσιάζει χαμηλές τιμές, οι οποίες υποδηλώνουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

3.3.3.5 Μελέτη της επέκτασης του μοντέλου σε συνθήκες εκτός του εύρους του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Εκτός του πειράματος ελέγχου με στόχο την επιβεβαίωση του μοντέλου, ελέγχθηκε και η επέκταση του μοντέλου σε συνθήκες οι οποίες δεν ανήκουν στο εύρος των επιλεγόμενων του πειραματικού σχεδιασμού. Πιο συγκεκριμένα, διεξήχθη πείραμα σε χρόνο εντός του εύρους χρόνου του πειραματικού σχεδιασμού (135 min), αλλά σε ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο και σε ποσότητα πρώτης ύλης εκτός των αντίστοιχων ευρών (60% νερό και 70 mg πρώτη ύλη, αντίστοιχα). Έπειτα από την εκχύλιση, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος ως προς το ολικό περιεχόμενο των φαινολικών και των φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, μέσω του προσδιορισμού του δείκτη IC₅₀. Τα αποτελέσματα του πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού, όπως αυτά προβλέπονται από το λογισμικό, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού, όπως αυτά προβλέπονται από το λογισμικό.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πρόβλεψη TPC (mg _{eq} GAL/g _{wild rose})	Πρόβλεψη TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})	Πρόβλεψη DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/mL διαλύματος) (15 min)
135	60	70	132.99	60.84	2.62

3.3.3.6 Επιβεβαίωση μοντέλων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα μοντέλα που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα ελέγχου. Το πρώτο, το τρίτο και το τέταρτο πείραμα ελέγχου αποτελούν πειράματα ανεξάρτητα αυτών που διεξήχθησαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, εντός του πεδίου μελέτης που έχει οριστεί και μάλιστα με συνθήκες αυτές που, βάσει του λογισμικού, δίνουν τα βέλτιστα αποτελέσματα. Το δεύτερο πείραμα ελέγχου αποτελεί, επίσης, πείραμα ανεξάρτητο αυτών που διεξήχθησαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, αλλά οι δύο από τις τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές είναι εκτός του εύρους τιμών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό, με στόχο να ελεγχθεί αν το μοντέλο δύναται να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού. Βάσει αυτού, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε υπάνθιο άγριου τριαντάφυλλου και προσδιορίστηκε το TPC, το TFC και η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος μέσω μέτρησης του δείκτη IC₅₀, σε διάφορους χρόνους επώασης. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τα πειράματα ελέγχου είναι αυτές που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Έπειτα από την εκχύλιση, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος, μέσω του οποίου προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Συνθήκες και αποτελέσματα πειραμάτων ελέγχου.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eq} GAL/g _{wild rose})	Πειραματικό TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN59	177	50	101.4	133.86±1.64	55.92±4.45	1.84	1.47	1.41	1.34
DN70	135	60	70	131.96±4.41	50.18±1.98	1.92	1.61	1.55	1.48
DN74	177	50	101.4	129.21±2.90	55.00±0.88	1.55	1.26	1.18	1.09
DN79	177	50	101.4	126.48±5.96	58.87±2.26	1.58	1.26	1.11	1.00

Οι παραπάνω πειραματικές τιμές, τόσο του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, όσο και του δείκτη IC₅₀ φαίνεται πως είναι εντός των επιθυμητών ορίων για το πείραμα ελέγχου, όπως γίνεται φανερό από τους Πίνακες 29 και 30.

Πίνακας 29: Μέσος όρος των πειραματικών τιμών των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για τα πειράματα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean†	95% PI high
	TPC	132,99	132,99		4,0187	3	4,0911	123,735	129,851	142,244
	TFC	60,8601	60,8601		2,31891	3	2,55577	54,2903	56,5976	67,4299
	DPPH#	1,35217	1,34353		0,108451	3	N/A	1,13385	1,64681	1,64835

Πίνακας 30: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median*	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean†	95% PI high
	TPC	132,989	132,989		4,0187	1	6,33399	118,66	131,955	147,317
	TFC	60,8415	60,8415		2,31891	1	4,35083	49,6573	50,1821	72,0257
	DPPH#	2,68481	2,62067		0,41992	1	N/A	1,63672	1,91604	6,57094

Από τους Πίνακες 29 και 30 επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία και η σημαντικότητα του μοντέλου, καθώς όλες οι πειραματικές μετρήσεις βρίσκονται εντός των ευρών των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών. Παράλληλα, επιβεβαιώνεται και η δυνατότητα χρήσης του μοντέλου σε συνθήκες εκτός του εύρους του πειραματικού σχεδιασμού, μιας και τα αποτελέσματα του πειράματος με συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού βρίσκονται εντός του εύρους των προβλέψεων του μοντέλου.

3.3.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ NaDES ΓΛΥΚΙΝΗ-D,L ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ-ΝΕΡΟ 1:5:21

Στα πλαίσια του κλασματικού πειραματικού σχεδιασμού δύο επιπέδων διεξήχθησαν 8 πειράματα, τα οποία προέκυψαν έπειτα από υπόδειξη του χρησιμοποιούμενου λογισμικού, Design Expert (Free Trial Version). Τα πειράματα αυτά δεν περιείχαν κεντρικές επαναλήψεις, όπως συνέβη στην περίπτωση του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken (§3.3.3). Τα πειράματα προέκυψαν από όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των ακραίων συνθηκών των ευρών που επιλέχθηκαν για κάθε παράγοντα. Να υπενθυμιστεί πως στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό συμπεριλαμβάνονται δύο παράγοντες, ο χρόνος εκχύλισης και η ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου, ενώ το ποσοστό του νερού παραμένει σταθερό και εισάγεται εξ' αρχής, κατά την παρασκευή του NaDES. Έπειτα, συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα των αποκρίσεων, το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και οι τιμές του δείκτη IC₅₀ για την αντιοξειδωτική δράση, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση και εξήχθη το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει με ικανοποιητικό τρόπο την κάθε απόκριση.

3.3.4.1 Περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (TPC) των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 31) παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις (TPC), ανά μονάδα μάζας της στερεής πρώτης ύλης, για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού που διεξήχθη με εκχυλιστικό μέσο το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

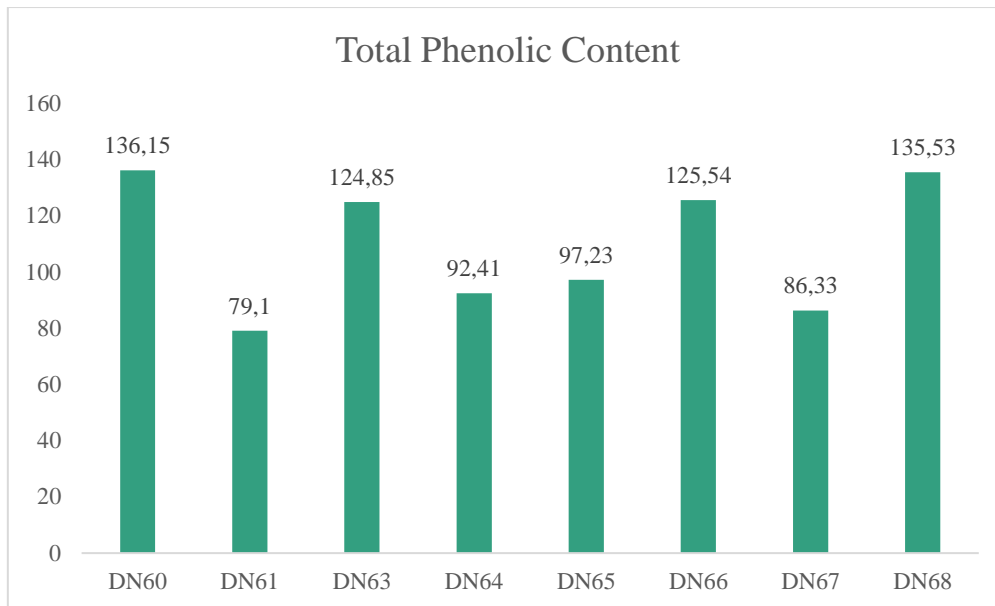
Πίνακας 31: Αποτελέσματα μέτρησης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₂)	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg _{GAL} /mL)	TPC (mg _{eqGAL} /g _{wild rose})
DN60	30	70	0.385	136.15±4.09
DN61	30	400	0.308	79.10±3.44
DN63	240	70	0.340	124.85±7.59
DN64	240	400	0.359	92.41±2.86
DN65	240	400	0.378	97.23±2.29
DN66	240	70	0.342	125.54±2.14
DN67	30	400	0.336	86.33±2.25
DN68	30	70	0.303	135.53±4.56

*Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες, και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων.

Τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 31) αναπαρίστανται και σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 26).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων κυμαίνονται από 79.10 έως 136.15 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}. Ακόμα και η χαμηλότερη τιμή TPC που εντοπίζεται στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό είναι σημαντικά υψηλότερη από τις αντίστοιχες τιμές που εντοπίζονται στη βιβλιογραφία για εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου με χρήση άλλων διαλυτών.



Διάγραμμα 26: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Από το Διάγραμμα 26 γίνεται φανερό πως η υψηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται σε συνθήκες εκχύλισης: 30 min χρόνο εκχύλισης και 70 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη (DN60), και η τιμή αυτού είναι 136.15 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}. Αντιθέτως, η χαμηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων είναι ίση με 79.1 mg_{eqGAL}/g_{wild rose} και αντιστοιχίζεται στο πείραμα με κωδικό DN61. Το εν λόγω πείραμα έχει τις ακόλουθες συνθήκες: 30 min χρόνο εκχύλισης και 400 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη.

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, επιλέγεται παραγοντικό μοντέλο, το οποίο συμπεριλαμβάνει τους όρους A, B και AB. Να σημειωθεί πως λόγω της ύπαρξης μόνο δύο παραγόντων, καθώς και της επιλογής παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού, οι πιθανοί όροι του μοντέλου είναι οι A, B και AB. Συνεπώς, το μοντέλο που εκφράζει την απόκριση του TPC συμπεριλαμβάνει όλους τους πιθανούς όρους. Οι όροι A και B συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, όπου A ο χρόνος εκχύλισης και B η ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g διαλύτη.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 32) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 32: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση του ελεολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	3961,73	3	1320,58	199,63	< 0.0001	significant
	A-Time	1,62	1	1,62	0,2450	0,6466	
	B-RM	3654,01	1	3654,01	552,36	< 0.0001	
	AB	306,10	1	306,10	46,27	0,0024	
	Pure Error	26,46	4	6,62			
	Cor Total	3988,19	7				

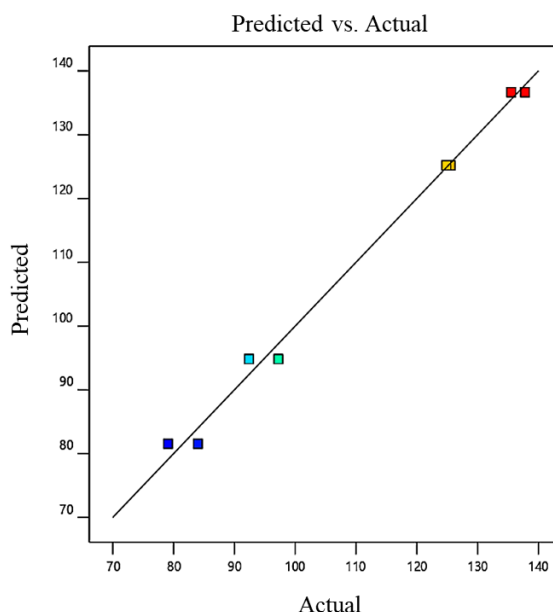
Η F-value του μοντέλου είναι 199.63, τιμή που υποδηλώνει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και ότι υπάρχει πιθανότητα χαμηλότερη από 0.01% η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Ακόμη, από τον Πίνακα 32 παρατηρείται πως μόνο ο όρος A δεν έχει p-value χαμηλότερο από 0.05. Όπως έχει αναφερθεί και στην Ενότητα 3.3.3, για να θεωρηθεί ένας όρος του μοντέλου σημαντικός χρειάζεται το p-value να είναι μικρότερο από 0.05. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, παρότι ο όρος A δεν εμφανίζει p-value μικρότερο από το 0.05, παραμένει στο μοντέλο, ώστε να διατηρηθεί η ιεραρχία αυτού. Να σημειωθεί πως, ο όρος αυτός δεν είναι σημαντικός για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, ωστόσο βοηθάει στην καλύτερη προσαρμογή αυτού.

Στον Πίνακα 33 παρουσιάζεται η τιμή του R^2 του μοντέλου που περιγράφει το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις. Η τιμή του συντελεστή αυτού δεν αποκλίνει κατά πολύ από τη μονάδα (η τιμή του ισούται με 0.9934) γεγονός που αποδεικνύει την ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R^2 » και «Predicted R^2 » δεν αποκλίνουν περισσότερο από 0.2 μονάδες, συνεπώς, η τιμή του R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Τέλος, η τιμή «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι μεγαλύτερη από 4, γεγονός που είναι επιθυμητό και αποδεικνύει ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 33: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

	Std. Dev.	2,57		R^2	0,9934
	Mean	109,56		Adjusted R^2	0,9884
	C.V. %	2,35		Predicted R^2	0,9735
				Adeq Precision	30,3047

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 27) απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο και των πειραματικών τιμών, που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Όπως φαίνεται, η συσχέτιση είναι πολύ ικανοποιητική.



Διάγραμμα 27: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC).

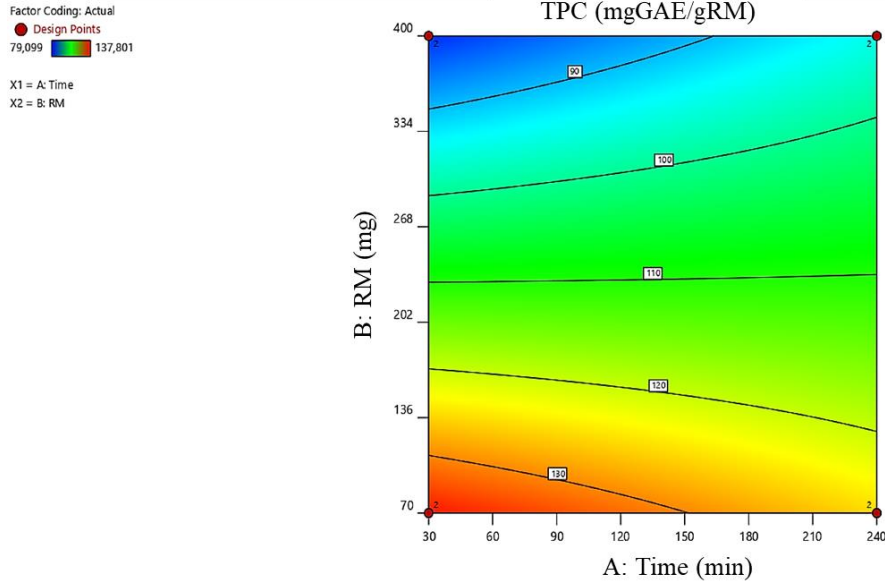
Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 17).

$$TPC = 109.56 + 0.4501 \cdot A - 21.37 \cdot B + 6.19 \cdot AB \quad (17)$$

Τέλος, η πραγματική εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 18). Η εξίσωση με τους πραγματικούς παράγοντες μπορεί να αξιολογηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθούν προβλέψεις σχετικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα κάθε παράγοντα. Η πραγματική εξίσωση είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων, συγκρίνοντας τους παράγοντες των συντελεστών.

$$TPC = 150.74385 - 0.079617 \cdot Time - 0.177726 \cdot RM + 0.000357 \cdot Time \cdot RM \quad (18)$$

Εν συνεχεία, σημαντική είναι η εξέταση της επίδρασης των διαφόρων ανεξάρτητων μεταβλητών στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, γίνεται φανερό πως ο χρόνος εκχύλισης δεν αποτελεί μεταβλητή που επιδρά σημαντικά στην εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων. Από την άλλη, η ποσότητα του άγριου τριαντάφυλλου φανερώσει σημαντική επίδραση και πιο συγκεκριμένα, χαμηλότερες τιμές αυτής επιφέρουν υψηλότερες τιμές ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων. Συμπερασματικά, μικρή ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων για οποιοδήποτε χρόνο εκχύλισης, ωστόσο σε μεγάλες ποσότητες άγριου τριαντάφυλλου, εμφανίζονται ελαφρώς πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε μεγάλους χρόνους εκχύλισης, αντί για μικρούς. Αυτό, πιθανώς, οφείλεται στο γεγονός ότι δεν ευνοείται η μεταφορά μάζας και συνεπώς, για να επιτευχθεί ικανοποιητική εκχύλιση χρειάζεται παραπάνω χρόνος. Τα παραπάνω οπτικοποιούνται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 28).



Διάγραμμα 28: Διάγραμμα Contour του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των μεταβλητών A και B.

Συνολικά, βάσει όλων των παραπάνω, παρατηρείται πως αναφορικά με το χρόνο εκχύλισης, αυτός δεν επιδρά σημαντικά στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων. Η επίδρασή του, ωστόσο, είναι θετική, καθώς με αύξηση του χρόνου εκχύλισης παρατηρούνται ελαφρώς αυξημένες τιμές περιεχομένου σε φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα. Ακόμη, αναφορικά με την ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου, που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση, αυτή φαίνεται να επιδρά με αντίθετο τρόπο από αυτόν του χρόνου εκχύλισης, καθώς με αύξηση αυτής παρατηρείται μείωση του TPC. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται βάσει συγκεκριμένων πειραμάτων, τα οποία έχουν ίδιο χρόνο εκχύλισης, αλλά διαφέρουν ως προς την ποσότητα πρώτης ύλης.

3.3.4.2 Περιεκτικότητα σε φλαβονοειδείς ενώσεις (TFC) των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 34) παρουσιάζονται οι τιμές της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης και της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή (TFC), ανά μονάδα μάζας της στερεής πρώτης ύλης, για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού που διεξήχθη με εκχυλιστικό μέσο το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

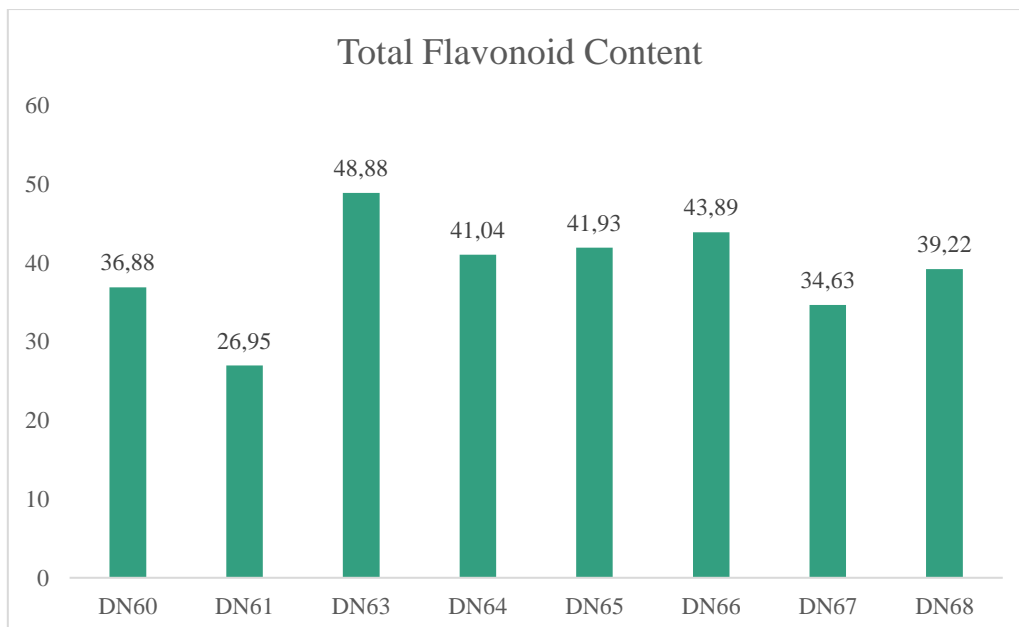
Πίνακας 34: Αποτελέσματα μέτρησης φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₂)	Συγκέντρωση εκχυλίσματος σε ισοδύναμα κατεχίνης (mg _{CAT} /mL)	TFC (mg _{eqCAT} /g _{wild rose})
DN60	30	70	0.100	36.88±0.44
DN61	30	400	0.105	26.95±0.44
DN63	240	70	0.133	48.88±2.05
DN64	240	400	0.160	41.04±0.32
DN65	240	400	0.163	41.93±0.58
DN66	240	70	0.120	43.89±0.55
DN67	30	400	0.135	34.63±0.27
DN68	30	70	0.107	39.22±1.23

*Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες, και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα του Πίνακα 34 παρουσιάζονται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 29).

Αξίζει να υπογραμμιστεί πως οι τιμές ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων κυμαίνονται από 26.95 έως 48.88 mg_{eqCAT}/g_{wild rose}. Οι τιμές αυτές, ακόμα και η χαμηλότερη τιμή που εντοπίζεται, είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές TFC που βρίσκονται στη βιβλιογραφία για εκχυλίσματα άγριου τριαντάφυλλου.



Διάγραμμα 29: Σχηματική αναπαράσταση αποτελεσμάτων ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Από το Διάγραμμα 29 γίνεται φανερό πως η υψηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων επιτυγχάνεται στο πείραμα με κωδικό DN63 και η τιμή που προκύπτει είναι $48.88 \text{ mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$. Το πείραμα αυτό αντιστοιχεί σε συνθήκες εκχύλισης: 240 min χρόνο εκχύλισης και 70 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη. Σε αντίθεση με το πείραμα DN63, το πείραμα DN61 παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, με αυτή να είναι ίση με $26.95 \text{ mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$. Το εν λόγω πείραμα έχει τις ακόλουθες συνθήκες: 30 min χρόνο εκχύλισης και 400 mg άγριο τριαντάφυλλο ανά 3 g διαλύτη.

Για τη μελέτη της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων, επιλέγεται παραγοντικό μοντέλο, το οποίο συμπεριλαμβάνει τους όρους A, B και AB. Να σημειωθεί πως λόγω της ύπαρξης μόνο δύο παραγόντων, καθώς και της επιλογής παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού, οι πιθανοί όροι του μοντέλου είναι οι A, B και AB. Οι όροι A και B συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, όπου A ο χρόνος εκχύλισης και B η ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g διαλύτη. Από αυτή τη μορφή του μοντέλου αφαιρέθηκε ο όρος AB, καθώς προέκυψε μη στατιστικά σημαντικός με p-value μεγαλύτερο από 0.05, σε επίπεδο αξιοπιστίας 95%.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 35) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 35: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	224,20	2	112,10	17,36	0,0056	significant
	A-Time	162,20	1	162,20	25,12	0,0041	
	B-RM	62,01	1	62,01	9,60	0,0269	
	Residual	32,28	5	6,46			
	Lack of Fit	0,8899	1	0,8899	0,1134	0,7532	not significant
	Pure Error	31,39	4	7,85			
	Cor Total	256,49	7				

Από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 35) παρατηρείται πως η F-value είναι ίση με 17.36, γεγονός που αποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό και υπάρχει μόλις 0.56% πιθανότητα η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Παράλληλα, παρατηρείται πως διατηρούνται μόνο οι δύο από τους τρεις όρους στο μοντέλο και συγκεκριμένα, οι όροι A και B. Ο όρος AB δε συμπεριλαμβάνεται στο μοντέλο, μιας και έχει p-value μεγαλύτερο από 0.05. Αντίθετα, οι όροι A και B παρουσιάζουν p-value μικρότερο από 0.05 και είναι στατιστικά σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%. Επιπρόσθετα, η έλλειψη προσαρμογή (Lack of Fit) δεν είναι σημαντική, συνεπώς το μοντέλο προσαρμόζεται ικανοποιητικά.

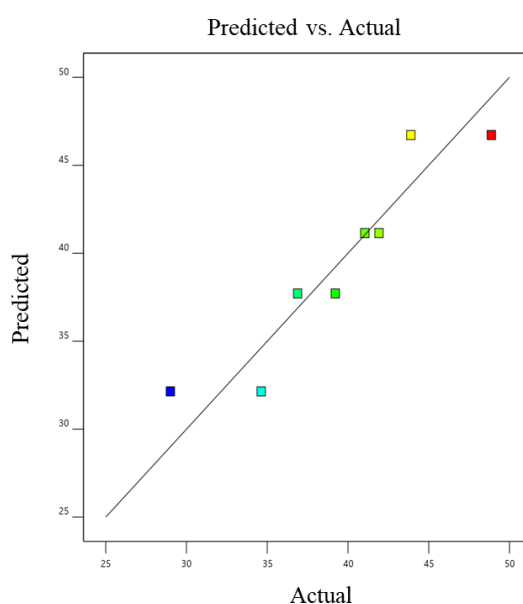
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 36) παρουσιάζεται η τιμή του συντελεστή R^2 του μοντέλου, ο οποίος περιγράφει το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων. Η τιμή του δεν αποκλίνει πάρα πολύ από τη μονάδα, γεγονός που υποδεικνύει μία σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R^2 » και «Predicted R^2 » δεν παρουσιάζουν απόκλιση

μεγαλύτερη από 0.2 μονάδες, οπότε, η τιμή του συντελεστή R^2 κρίνεται ικανοποιητική. Η τιμή «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και προκύπτει μεγαλύτερη από 4, γεγονός το οποίο είναι επιθυμητό και υποδεικνύει ότι μπορεί να γίνει χρήση του μοντέλου για περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 36: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Std. Dev.	2,54	R²	0,8741
Mean	39,43	Adjusted R²	0,8238
C.V. %	6,44	Predicted R²	0,6778
		Adeq Precision	9,3658

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 30) παρουσιάζεται η συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο με τις πραγματικές τιμές που ελήφθησαν από τα πειράματα που διεξήχθησαν, κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού. Όπως γίνεται φανερό η συσχέτιση είναι ικανοποιητική, με ορισμένες τιμές να αποκλίνουν ελαφρώς. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν εμφανίζουν σημαντική απόκλιση.



Διάγραμμα 30: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC).

Η κωδικοποιημένη εξίσωση που περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 19).

$$TFC = 39.43 + 4.50 \cdot A - 2.78 \cdot B \quad (19)$$

Τελικά, η πραγματική εξίσωση, η οποία περιγράφει την απόκριση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι η παρακάτω (Εξίσωση 20).

$$TFC = 37.60931 + 0.042883 \cdot Time - 0.016873 \cdot RM \quad (20)$$

Η παραπάνω εξίσωση, η οποία εμφανίζεται με πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πραγματοποιηθούν προβλέψεις αναφορικά με την απόκριση για

δεδομένα επίπεδα του καθενός από τους παράγοντες. Η πραγματική εξίσωση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων, μέσω σύγκρισης των παραγόντων των συντελεστών.

Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση των παραμέτρων στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων των εκχυλισμάτων. Αναφορικά με την επίδραση του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων, γίνεται φανερό πως και οι δύο μεταβλητές εμφανίζουν σημαντική επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, ο χρόνος εκχύλισης επιδρά θετικά στο ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών, καθώς με αύξηση αυτού παρουσιάζεται αύξηση των φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα. Το παραπάνω συμπέρασμα γίνεται φανερό μέσω σύγκρισης των πειραμάτων που έχουν ίδια ποσότητα πρώτης ύλης, αλλά διαφέρουν ως προς το χρόνο. Από την άλλη, η ποσότητα της πρώτης ύλης έχει αρνητική επίδραση, διότι αύξηση αυτής επιφέρει μείωση του περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις των εκχυλισμάτων. Η συγκεκριμένη διαπίστωση γίνεται μέσω παρατήρησης των αποτελεσμάτων των πειραμάτων, τα οποία διεξάγονται σε ίδιο χρόνο εκχύλισης, αλλά διαφέρουν ως προς την ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου, που χρησιμοποιείται. Συνδυαστικά, για την επίτευξη υψηλού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων απαιτείται μεγάλης χρονικής διάρκειας εκχύλιση και μικρή ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου.

3.3.4.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21

Έπειτα από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης που πραγματοποιήθηκε σε προκαταρκτικά πειράματα, πραγματοποιείται μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων του πειραματικού σχεδιασμού με χρήση ως NaDES το Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Όπως και στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων των προκαταρκτικών πειραμάτων, έτσι και στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού, προσδιορίζεται η % αναστολή των ριζών του DPPH συναρτήσει της συγκέντρωσης διαλύματος του εκχυλίσματος, για τους τέσσερις χρόνους επώασης των δειγμάτων, 15, 30, 45 και 60 min. Ο προσδιορισμός αυτός διεξάγεται μέσω γραφημάτων, στα οποία προσαρμόζεται ευθεία γραμμή και μέσω της κλίσης και της αποτέμνουσας αυτής υπολογίζεται, τελικά, ο δείκτης IC₅₀, από την Εξίσωση 10. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 37) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών του δείκτη IC₅₀ για τους τέσσερις χρόνους επώασης, 15, 30, 45 και 60 min για τα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού.

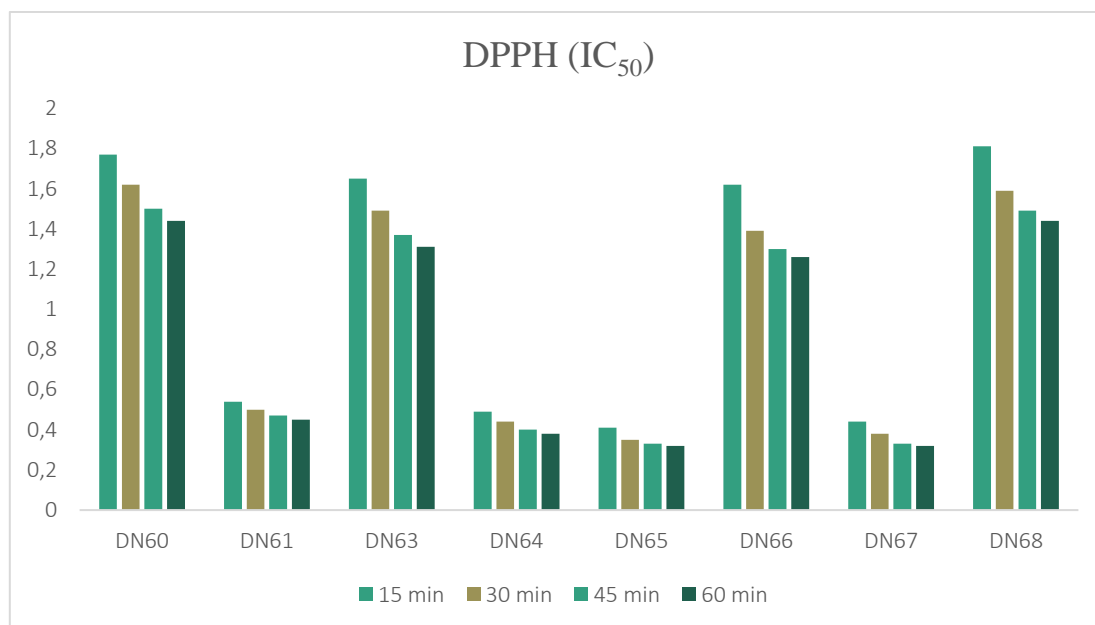
Πίνακας 37: Αποτελέσματα μεθόδου προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης της ρίζας DPPH στα εκχυλίσματα του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min) (x ₁)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη (x ₂)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN60	30	70	1.77	1.62	1.50	1.44
DN61	30	400	0.54	0.50	0.47	0.45
DN63	240	70	1.65	1.49	1.37	1.31
DN64	240	400	0.49	0.44	0.40	0.38
DN65	240	400	0.41	0.35	0.33	0.32
DN66	240	70	1.62	1.39	1.30	1.26
DN67	30	400	0.44	0.38	0.33	0.32
DN68	30	70	1.81	1.59	1.49	1.44

*Αξίζει να σημειωθεί πως οι τιμές του δείκτη IC₅₀ που προκύπτουν αποδίδονται μόνο στις εκχυλισμένες ουσίες, οι οποίες εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, και καθόλου στο εκχυλιστικό μέσο (DES), καθώς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποκλειστικά στο DES και δεν παρουσίασε ικανότητα δέσμευσης των ριζών του DPPH.

** Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης, με τη μέθοδο DPPH, προτύπου, αιθανολικού διαλύματος ασκορβικού οξέος, με συγκέντρωση 1mg / 50 mL. Η τιμή του δείκτη IC₅₀, για χρόνους επώασης 15, 30, 45 και 60 min προκύπτουν ίσοι με 7.07, 7.04, 7.06 και 7.05 mg/mL.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται και σχηματικά στο Διάγραμμα 31.



Διάγραμμα 31: Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων του δείκτη IC₅₀, και κατά συνέπεια της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό πως την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν τα εκχυλίσματα με κωδικούς DN65 και DN67 με τιμές του δείκτη IC₅₀ για χρόνο επώασης 15 min ίσες με 0.41 και 0.44 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος, αντίστοιχα. Παρότι τα εκχυλίσματα αυτά παρουσιάζουν τη χαμηλότερη τιμή δείκτη IC₅₀, και κατά συνέπεια την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, και τα υπόλοιπα εκχυλίσματα παρουσιάζουν εξαιρετικά ικανοποιητικές τιμές και ιδιαίτερα υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Η λιγότερη ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση προκύπτει στο εκχύλισμα με κωδικό DN68, όπου εμφανίζεται ο υψηλότερος δείκτης IC₅₀, με τιμή, για χρόνο επώασης 15 min, ίση με 1.81 μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος.

Αναφορικά με τη μελέτη της απόκρισης της αντιοξειδωτικής δράσης, επιλέγεται παραγοντικό μοντέλο, το οποίο συμπεριλαμβάνει τους όρους A, B και AB. Να σημειωθεί πως λόγω της ύπαρξης μόνο δύο παραγόντων, καθώς και της επιλογής παραγοντικού πειραματικού σχεδιασμού, οι πιθανοί όροι του μοντέλου είναι οι A, B και AB. Συνεπώς, το μοντέλο που εκφράζει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης, μέσω του δείκτη IC₅₀, συμπεριλαμβάνει όλους τους πιθανούς όρους. Οι όροι A και B συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μεταβλητές, όπου A ο χρόνος εκχύλισης και B η ποσότητα της πρώτης ύλης ανά 3 g διαλύτη.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 38) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA.

Πίνακας 38: Αποτελέσματα ANOVA για το παραγοντικό μοντέλο που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένη σε δείκτη IC₅₀.

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	3,10	3	1,03	447,97	< 0.0001	significant
	A-Time	0,0198	1	0,0198	8,57	0,0429	
	B-RM	3,08	1	3,08	1332,16	< 0.0001	
	AB	0,0074	1	0,0074	3,18	0,1489	
	Pure Error	0,0092	4	0,0023			
	Cor Total	3,11	7				

Από τον Πίνακα 38 γίνεται φανερό πως η F-value του μοντέλου είναι ίση με 447.97, τιμή που υποδηλώνει πως το μοντέλο είναι σημαντικό και πως υφίσταται πιθανότητα μικρότερη από 0.01% η τόσο υψηλή F-value να οφείλεται σε θόρυβο. Ακόμη, παρατηρείται πως όλοι οι όροι, A, B και AB, έχουν διατηρηθεί στο μοντέλο. Οι όροι A και B εμφανίζουν p-value μικρότερο από 0.05 και άρα, είναι στατιστικά σημαντικοί για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%. Ο όρος AB, παρότι δεν παρουσιάζει p-value μικρότερο από 0.05 και δεν είναι στατιστικά σημαντικός για το μοντέλο σε επίπεδο σημαντικότητας μεγαλύτερο του 95%, διατηρείται στο μοντέλο για λόγους ιεραρχίας.

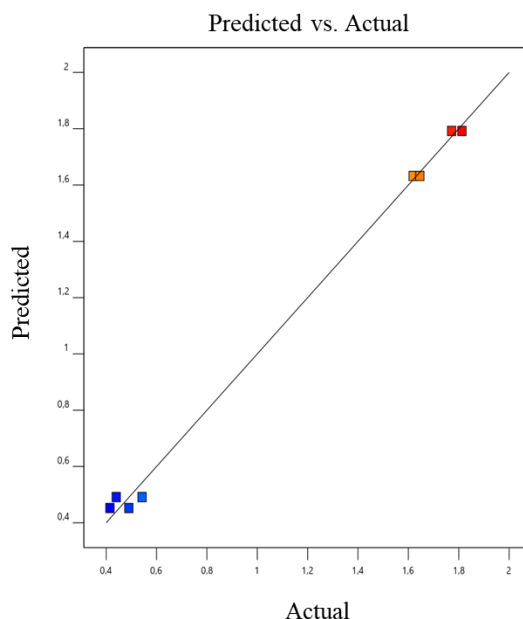
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 39) παρουσιάζεται η τιμή του συντελεστή R² του μοντέλου, το οποίο εκφράζει την αντιοξειδωτική δράση μέσω του δείκτη IC₅₀. Η τιμή του συντελεστή συγκλίνει σημαντικά στη μονάδα, γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει πολύ ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών και των

μεταβλητών απόκρισης. Οι τιμές «Adjusted R²» και «Predicted R²» δεν εμφανίζουν απόκλιση μεγαλύτερη των 0.2 μονάδων και συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή είναι εξαιρετικά κοντινές. Το παραπάνω υποδεικνύει πως η τιμή του R² είναι ικανοποιητική. Τέλος, η τιμή «Adequate precision» υπολογίζει το λόγο του σήματος προς το θόρυβο και είναι υψηλότερη από 4, γεγονός το οποίο είναι επιθυμητό και παράλληλα, υποδεικνύει ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη περιήγηση στο σχεδιαστικό χώρο.

Πίνακας 39: Αποτελέσματα σχετικά με την προσαρμογή του μοντέλου που περιγράφει την απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω του δείκτη IC₅₀.

Std. Dev.	0,0481	R²	0,9970
Mean	1,09	Adjusted R²	0,9948
C.V. %	4,40	Predicted R²	0,9881
		Adeq Precision	39,4262

Το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 32) παρουσιάζει τη συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο και των πραγματικών τιμών που προέκυψαν μέσω των πειραμάτων του πειραματικού σχεδιασμού. Όπως φαίνεται οι τιμές είναι εξαιρετικά κοντά στη διαγώνιο, γεγονός που υποδεικνύει πως οι τιμές πρόβλεψης είναι παραπλήσιες των πειραματικών τιμών.



Διάγραμμα 32: Συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών της απόκρισης του δείκτη IC₅₀ και της αντιοξειδωτικής δράσης.

Η κωδικοποιημένη εξίσωση, μέσω της οποίας περιγράφεται η απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης, δηλαδή ο δείκτης IC₅₀ είναι η παρακάτω (Εξίσωση 21).

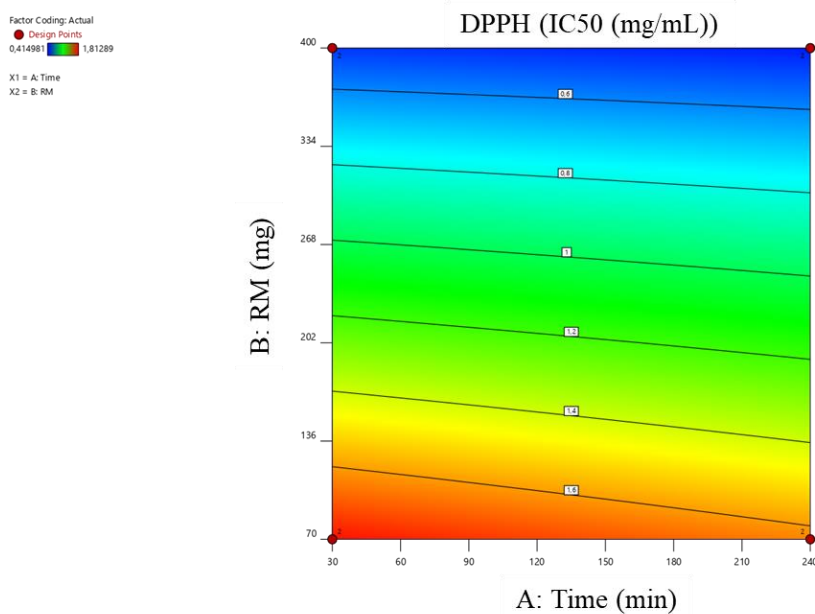
$$IC_{50} = 1.09 - 0.0497 \cdot A - 0.6202 \cdot B + 0.0303 \cdot AB \quad (21)$$

Συμπερασματικά, η πραγματική εξίσωση, μέσω της οποίας περιγράφεται η απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης, δηλαδή ο δείκτης IC_{50} , αναγράφεται παρακάτω (Εξίσωση 22).

$$IC_{50} = 2.09498 - 0.000885 \cdot Time - 0.003995 \cdot RM + 1.75022 \cdot 10^{-6} \cdot Time \cdot RM \quad (22)$$

Η παραπάνω εξίσωση, η οποία χρησιμοποιεί τους πραγματικούς παράγοντες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό να πραγματοποιηθούν προβλέψεις αναφορικά με την απόκριση για δεδομένα επίπεδα καθενός από τους παράγοντες. Η πραγματική εξίσωση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό της σχετικής επίδρασης των παραγόντων, μέσω σύγκρισης των παραγόντων των συντελεστών.

Αναφορικά με την επίδραση που εμφανίζουν οι μεταβλητές στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, λόγω των πολύ χαμηλών τιμών του δείκτη IC_{50} , είναι δύσκολη η εξαγωγή τάσης που ακολουθείται. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το χρόνο εκχύλισης, αυτός φαίνεται να επιδρά θετικά στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, καθώς με αύξηση του παρατηρούνται ελαφρώς μειωμένες τιμές του δείκτη IC_{50} και συνεπώς, αυξημένη αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, όσον αφορά την ποσότητα του άγριου τριαντάφυλλου, αυτή η μεταβλητή φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο δείκτη IC_{50} και κατά συνέπεια, στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος και συγκεκριμένα, η αύξηση της ποσότητας προκαλεί μείωση της τιμής του δείκτη, συνεπώς, αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Το συμπέρασμα αυτό γίνεται φανερό και από το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 33). Αξίζει να σημειωθεί πως, σε αντίθεση με τα διαγράμματα contour στις περιπτώσεις του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, στην περίπτωση του δείκτη IC_{50} , το επιθυμητό αποτέλεσμα βρίσκεται στις μπλε περιοχές των διαγραμμάτων, μιας και οι χαμηλές τιμές του δείκτη αντιστοιχούν σε υψηλή αντιοξειδωτική δράση.



Διάγραμμα 33: Διάγραμμα Contour του δείκτη IC_{50} συναρτήσει των μεταβλητών A και B.

3.3.4.4 Βελτιστοποίηση της διεργασίας με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21

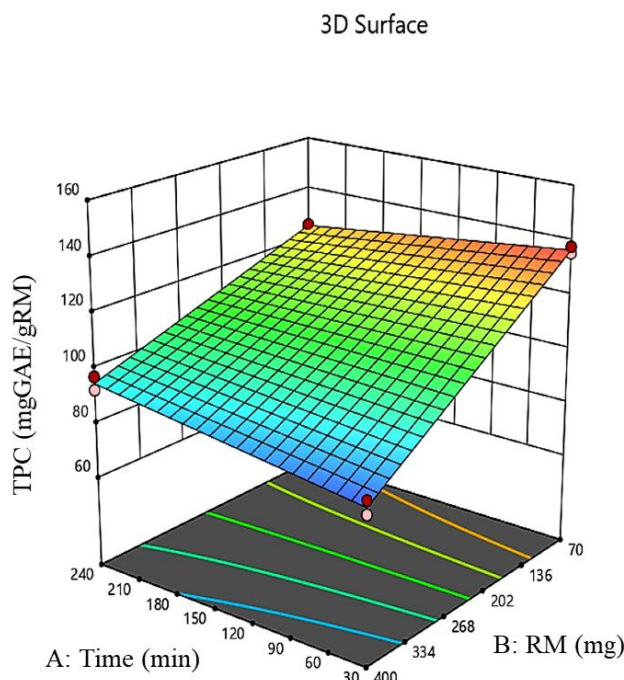
Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της διεργασίας εκχύλισης με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων εντός του πεδίου μελέτης. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης από το λογισμικό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 40).

Πίνακας 40: Βέλτιστες συνθήκες και παράμετροι εκχύλισης για την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πρόβλεψη TPC (mg _{eq} GAL/g _{wild rose})	Πρόβλεψη TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})	Πρόβλεψη DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)
240	70	125.19	46.72	1.63

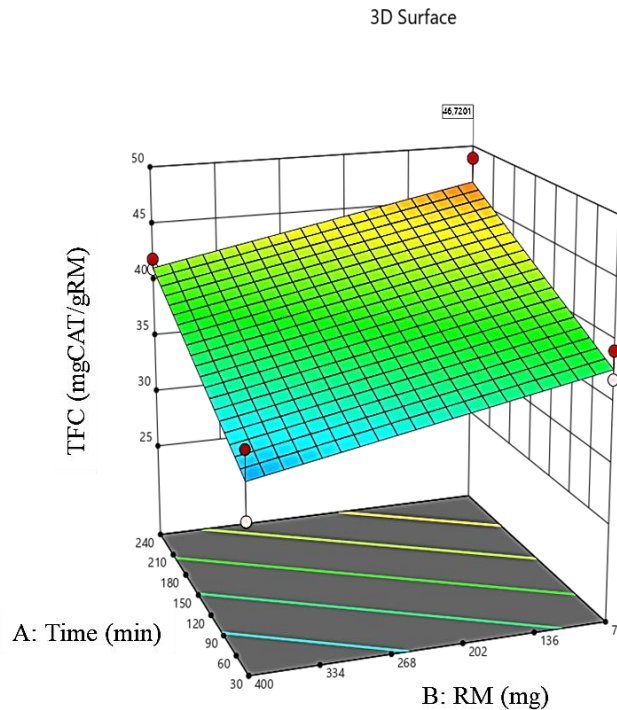
Στη συνέχεια, παρατίθενται οι τρισδιάστατες μορφές διαγραμμάτων των επιφανειών απόκρισης συναρτήσεως δύο ανεξάρτητων μεταβλητών σε κάθε περίπτωση. Αξίζει να σημειωθεί πως ως A συμβολίζεται η μεταβλητή του χρόνου εκχύλισης, και ως B η ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου. Το πρώτο διάγραμμα (Διάγραμμα 34) αφορά το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων, ενώ το δεύτερο (Διάγραμμα 35) αφορά το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων.

Factor Coding: Actual
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 79,099  137,801
 X1 = A: Time
 X2 = B: RM



Διάγραμμα 34: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων (TPC) συναρτήσεως των μεταβλητών A και B.

Factor Coding: Actual
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 29 48,8813
 X1 = A: Time
 X2 = B: RM



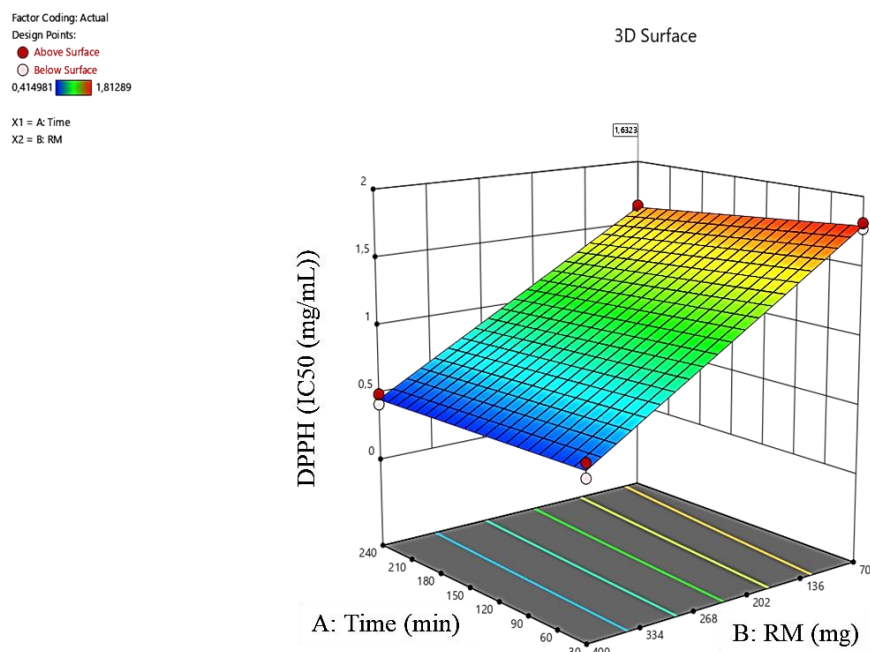
Διάγραμμα 35: Τρισδιάστατη επιφάνεια του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) συναρτήσει των μεταβλητών A και B.

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 34 της επιφάνειας απόκρισης, παρατηρείται πως η αύξηση της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου επιφέρει μείωση του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων. Παράλληλα, γίνεται αντιληπτό πως ο χρόνος εκχύλισης δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές στο TPC, άρα, η συγκεκριμένη ανεξάρτητη μεταβλητή δεν επιδρά σημαντικά στα αποτελέσματα. Συμπερασματικά, με στόχο να είναι όσο το δυνατό υψηλότερο το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, είναι επιθυμητό η ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου να είναι χαμηλή, ενώ ο χρόνος δεν μεταβάλλει σημαντικά τα αποτελέσματα.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το Διάγραμμα 35 της επιφάνειας απόκρισης, παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου εκχύλισης και η μείωση της ποσότητας άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου συμβάλλουν στην αύξηση του περιεχομένου σε φλαβονοειδείς ενώσεις. Πιο αναλυτικά, φαίνεται πως στους μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης το TFC παρουσιάζει σημαντική αύξηση και συνδυαστικά με τη μικρότερη ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου λαμβάνεται η μέγιστη τιμή περιεχομένου φλαβονοειδών. Συμπερασματικά, σε αντίθεση με το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή το επηρεάζουν και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές.

Σύμφωνα με τις παραπάνω συνθήκες, οι οποίες αντιστοιχούν στις βέλτιστες για την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, παρουσιάζεται παρακάτω και η απόκριση του δείκτη IC₅₀, ως συνάρτηση των

δύο ανεξάρτητων μεταβλητών, ο οποίος φανερώνει την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 36: Τρισδιάστατη επιφάνεια του δείκτη IC₅₀, και κατ' επέκταση της αντιοξειδωτικής δράσης, συναρτήσει των μεταβλητών A και B.

Από την παραπάνω τρισδιάστατη απεικόνιση (Διάγραμμα 36) προκύπτει πως ο χρόνος εκχύλισης δεν επιδρά σημαντικά στην τιμή του δείκτη IC₅₀ και κατά συνέπεια, στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Αντίθετα, η ποσότητα της πρώτης ύλης φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην τιμή του δείκτη και πιο συγκεκριμένα, αύξηση της ποσότητας αυτής προκαλεί μείωση της τιμής του δείκτη. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες για την αντιοξειδωτική δράση δεν ακολουθούν την ίδια τάση με αυτή που ακολουθούν οι βέλτιστες για το TPC και το TFC, ωστόσο στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ταυτόχρονη αύξηση του περιεχομένου σε αυτές τις ενώσεις και παραλήφθηκε η ταυτόχρονη μείωση του δείκτη IC₅₀.

3.3.4.5 Μελέτη της επέκτασης του μοντέλου σε συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21

Εκτός του πειράματος ελέγχου με στόχο την επιβεβαίωση του μοντέλου, ελέγχθηκε και η επέκταση του μοντέλου σε συνθήκες οι οποίες δεν ανήκουν στο εύρος των επιλεγόμενων του πειραματικού σχεδιασμού. Πιο συγκεκριμένα, διεξήχθη πείραμα σε χρόνο εντός του εύρους χρόνου του πειραματικού σχεδιασμού (229 min), αλλά σε ποσότητα πρώτης ύλης εκτός του αντίστοιχου εύρους (60 mg πρώτη ύλη). Έπειτα από την εκχύλιση, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του εκχυλίσματος ως προς το ολικό

περιεχόμενο των φαινολικών και των φλαβονοειδών ενώσεων, καθώς και ως προς την αντιοξειδωτική του δράση, μέσω του προσδιορισμού του δείκτη IC₅₀. Τα αποτελέσματα του πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού που προβλέπονται από το λογισμικό φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 41).

Πίνακας 41: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με βάση την πρόβλεψη του λογισμικού.

Χρόνος εκχύλισης (min)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πρόβλεψη TPC (mg _{eq} GAL/g _{wild rose})	Πρόβλεψη TFC (mg _{eq} CAT/g _{wild rose})	Πρόβλεψη DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)
229	60	126.75	46.42	1.68

3.3.4.6 Επιβεβαίωση των μοντέλων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το μοντέλο που προέκυψε από τη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ελέγχου. Το πρώτο πείραμα ελέγχου αποτελεί πείραμα ανεξάρτητο αυτών που διεξήχθησαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, εντός του πεδίου μελέτης που έχει οριστεί και με επιλεγόμενες συνθήκες τις συνθήκες που βελτιστοποιούσαν τη διεργασία εκχύλισης στον πειραματικό σχεδιασμό με διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 (§3.3.3.4). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα ελέγχου, ανεξάρτητο αυτών που διεξήχθησαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, το βέλτιστο που προέκυψε βάσει της βελτιστοποίησης της διεργασίας, όπως αυτή φαίνεται στην Ενότητα 3.3.4.4 της παρούσας εργασίας. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα ελέγχου στο οποίο η μία ανεξάρτητη παράμετρος της εκχύλισης είναι εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού, ώστε να ελεγχθεί αν τα μοντέλα, που προέκυψαν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για συνθήκες εκχύλισης εκτός του εύρους του πειραματικού σχεδιασμού (§3.3.4.5). Βάσει των παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε υπάνθιο άγριου τριαντάφυλλου και προσδιορίστηκε το TPC, το TFC και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μέσω μέτρησης του δείκτη IC₅₀, σε διάφορους χρόνους επώασης. Οι συνθήκες των παραπάνω εκχυλίσεων, καθώς και τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των εκχυλισμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 42).

Πίνακας 42: Συνθήκες και αποτελέσματα πειράματος ελέγχου.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (min)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild rose})	Πειραματικό TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild rose})	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN69	177	101.4	119.93±5.11	47.37±2.46	1.42	1.04	0.96	0.83
DN78	240	70	131.23±7.76	43.24±0.58	1.71	1.55	1.40	1.37
DN91	229	60	135.37±1.58	48.38±3.42	1.71	1.53	1.46	1.42

Οι παραπάνω πειραματικές τιμές, τόσο του ολικού περιεχομένου φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων, όσο και του δείκτη IC₅₀ φαίνεται πως είναι εντός των επιθυμητών ορίων για το πείραμα ελέγχου (Πίνακες 43, 44 και 45).

Πίνακας 43: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
	TPC	125,038	125,038		2,57202	1	2,86415	117,086	119,933	132,99
	TFC	43,4887	43,4887		2,541	1	2,81461	36,2535	47,3672	50,7239
	IC50	1,56462	1,56462		0,0480629	1	0,053522	1,41602	1,42176	1,71322

Πίνακας 44: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις βέλτιστες συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
	TPC	125,193	125,193		2,57202	1	3,15006	116,447	131,234	133,939
	TFC	46,7201	46,7201		2,541	1	2,97959	39,0608	43,2371	54,3794
	IC50	1,6323	1,6323		0,0480629	1	0,0588648	1,46887	1,7112	1,79574

Πίνακας 45: Πειραματικές τιμές των TPC, TFC, καθώς και του δείκτη IC₅₀ της αντιοξειδωτικής δράσης για το πείραμα ελέγχου επιβεβαίωσης του μοντέλου με βάση τις συνθήκες εκτός των επιλεγμένων ορίων του πειραματικού σχεδιασμού με διαλύτη NaDES Γλυκίνη-Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

	Response	Predicted Mean	Predicted Median	Observed	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
	TPC	126,754	126,754		2,57202	1	3,12739	118,071	135,368	135,437
	TFC	46,4171	46,4171		2,541	1	2,9696	38,7835	48,3752	54,0507
	IC50	1,67663	1,67663		0,0480629	1	0,0584411	1,51438	1,70559	1,83889

Από τους παραπάνω πίνακες (Πίνακες 43, 44 και 45) επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία και η σημαντικότητα του μοντέλου, καθώς όλες οι πειραματικές μετρήσεις βρίσκονται εντός των ευρών των προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών. Ταυτόχρονα αξίζει να σημειωθεί πως το μοντέλο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε συνθήκες εκτός των ορίων του πειραματικού σχεδιασμού.

3.3.4.7 Σύγκριση των NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 στην εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου

Ορισμένα από τα πειράματα επιβεβαίωσης των δύο πειραματικών σχεδιασμών πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες συνθήκες εκχύλισης (βλ. ενότητες 3.3.3.6 και 3.3.4.6). Λόγω της επιλογής των ίδιων συνθηκών, είναι εφικτή η σύγκριση των επιλεγμένων αποκρίσεων του πειραματικού σχεδιασμού. Συνεπώς, είναι εφικτή η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο NaDES, ως προς την εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 46) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα, σε TPC, TFC και IC₅₀, των πειραμάτων επιβεβαίωσης των δύο πειραματικών σχεδιασμών, με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21, αντίστοιχα.

Πίνακας 46: Αποτελέσματα πειραμάτων επιβεβαίωσης των δύο πειραματικών σχεδιασμών με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	NaDES	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eqGA} / g _{wild rose})	Πειραματικό TFC (mg _{eqCA} / g _{wild rose})	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (60 min)
DN59	Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	177	50	101.4	133.86	55.92	1.84	1.47	1.41	1.34
DN69	Γλυκίνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	177	-*	101.4	119.93	47.35	1.42	1.04	0.96	0.83

* Στις εκχυλίσεις με χρήση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 δε χρησιμοποιείται επιπλέον ποσότητα νερού στο εκχυλιστικό μέσο.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των δύο NaDES στην εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου.

Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με το TPC, από την εκχύλιση με NaDES Βεταΐνη-D,L γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 προκύπτει εκχύλισμα με περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις ίσο με 133.86 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}, ενώ από την εκχύλιση με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 προκύπτει εκχύλισμα με αντίστοιχη τιμή 119.93 mg_{eqGAL}/g_{wild rose}.

Βάσει των τιμών αυτών, προκύπτει το συμπέρασμα πως ο NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, ως διαλύτης, δίνει εκχυλίσματα πλουσιότερα σε φαινολικές ενώσεις, σε σύγκριση με το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21. Αναφορικά με το TFC, τα αποτελέσματα των δύο διαλυτών είναι παρόμοια, με το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 να δίνει εκχυλίσματα με ελαφρώς υψηλότερες τιμές σε φλαβονοειδή.

Τέλος, αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, γίνεται αντιληπτό πως το εκχύλισμα με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερες τιμές δείκτη IC₅₀ και συνεπώς, ελαφρώς υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Βέβαια, αξίζει να τονιστεί πως και τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζουν εξαιρετικά χαμηλές τιμές του δείκτη και άρα, πολύ ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο, το εκχύλισμα με διαλύτη το NaDES με συστατικό τη γλυκίνη έχει ελαφρώς ισχυρότερη δράση.

Συμπερασματικά, και τα δύο NaDES είναι κατάλληλα για την εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου, καθώς δίνουν πολύ ικανοποιητικές τιμές, ως προς όλες τις παραμέτρους που εξετάζονται. Ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές και φλαβονοειδείς ενώσεις φαίνεται να υπερτερεί ο NaDES με κύριο συστατικό τη βεταΐνη, ενώ ως προς την αντιοξειδωτική δράση, ο NaDES με κύριο συστατικό τη γλυκίνη.

3.3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΠΩΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους παραπάνω πίνακες των Ενοτήτων 3.3.3.3 και 3.3.4.3, γίνεται φανερό πως οι τιμές του δείκτη IC₅₀ μειώνονται με την αύξηση του χρόνου επώασης. Αναλυτικότερα, οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης έχουν ως αποτέλεσμα μικρότερες τιμές απορρόφησης και συνεπώς, χαμηλότερες τιμές του δείκτη IC₅₀, για το ίδιο διάλυμα εκχυλίσματος. Το παραπάνω είναι αναμενόμενο, καθώς με την πάροδο του χρόνου, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις του εκχυλίσματος αναστέλλουν τις ρίζες του DPPH και έτσι, η ποσότητα των ριζών μειώνεται σημαντικά.

Επιπρόσθετα, το υψηλό ιξώδες των DES, το οποίο αποτελεί και ένα από τα μειονεκτήματά τους, μπορεί να προκαλέσει απώλειες εκχυλίσματος κατά τη δημιουργία του διαλύματος αυτού και επομένως, κατά τη μεταφορά του στο micro-plate. Η πιθανή αυτή απώλεια μπορεί να προκαλέσει σφάλματα κατά τις μετρήσεις απορρόφησης και συνεπώς, μη αξιόπιστα αποτελέσματα. Ακόμη, βάσει αυτού αιτιολογείται μία αντίστροφη τάση που παρατηρείται σε ορισμένα εκχυλίσματα, όπου η τιμή IC₅₀ αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου επώασης, γεγονός που, όμως, παρατηρείται σε μεμονωμένες μετρήσεις και δε μεταβάλλει την τάση της καμπύλης από αύξουσα σε φθίνουσα. Σε ορισμένες πειραματικές σειρές έχουν αφαιρεθεί ορισμένες μετρήσεις απορρόφησης και σε ελάχιστα έχει αφαιρεθεί ένα πειραματικό

σημείο, ώστε να είναι ικανοποιητικότερη η προσαρμογή της ευθείας στις πειραματικές μετρήσεις. Το παραπάνω πιθανότατα οφείλεται στο ιξώδες των DES και επιλύεται στα πειράματα των πειραματικών σχεδιασμών, είτε με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων νερού στο εκχυλιστικό μέσο, είτε με την παρασκευή DES με κατάλληλη ποσότητα νερού εξ' αρχής.

Παράλληλα, πραγματοποιείται μελέτη της επίδρασης της περιεκτικότητας του αρχικού διαλύματος, stock, σε εκχύλισμα στην % αναστολή των ριζών του DPPH. Η παραπάνω μελέτη διεξάγεται με μέτρηση της % αναστολής στους τέσσερις χρόνους, 15, 30, 45 και 60 min, για το ίδιο εκχύλισμα, με διαφορετική συγκέντρωση αυτού στο stock.

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται το εκχύλισμα με κωδικό DN17, σε συγκέντρωση stock ίση με 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ και 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Οι τιμές του δείκτη IC_{50} για τους τέσσερις χρόνους επώασης των δύο διαλυμάτων του συγκεκριμένου εκχυλίσματος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 47).

Πίνακας 47: Επίδραση της συγκέντρωσης του υδατικού διαλύματος εκχυλίσματος στην % αναστολή των ριζών του DPPH.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος εκχύλισης (h)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	DPPH	DPPH	DPPH	DPPH
				IC_{50} (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	IC_{50} (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN17 (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	1	-	100	24.13	22.44	19.89	17.32
DN17 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$)				2.24	1.92	1.76	1.66

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 47, προκύπτει πως για μικρότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος στο αρχικό διάλυμα παρατηρούνται σημαντικά χαμηλότερες τιμές του δείκτη IC_{50} . Με άλλα λόγια, παρατηρείται πως για να ανασταλεί το 50% της αρχικής ποσότητας των ριζών του DPPH απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση διαλύματος σε εκχύλισμα. Το παραπάνω αιτιολογείται από τη δράση που έχουν οι DES στα εκχύλισματα. Όπως έχει αναφερθεί και αναλυτικότερα στην Ενότητα 1, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες παρουσιάζουν προστατευτική δράση όταν χρησιμοποιούνται ως εκχυλιστικά μέσα και για αυτό αποτελούν και αποθηκευτικά μέσα. Η προστατευτική τους δράση γίνεται φανερή μέσω των τιμών του δείκτη IC_{50} , καθώς στην περίπτωση της μεγαλύτερης περιεκτικότητας εκχυλίσματος στο διάλυμα είναι μεγαλύτερη η ποσότητα του DES και συνεπώς, τα μόρια του εκχυλίσματος αποδεσμεύονται και αναστέλλουν τις ρίζες του DPPH σταδιακά κατά την επώαση (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Δείγματα εκχυλισμάτων σε micro-plate, κατά σειρά μειούμενης συγκέντρωσης και εις διπλούν ή τριπλούν μετά από χρόνο επώασης 60 min.

3.3.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΩΝ

Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, και αφού βελτιστοποιήθηκε η διεργασία εκχύλισης με τη μέθοδο της θέρμανσης και ανάδευσης, κρίθηκε, επίσης, σκόπιμο να διερευνηθεί η χρήση μίας ακόμα εκχυλιστικής μεθόδου, που αποτελεί πράσινη τεχνική, αυτή της χρήσης των υπερήχων.

Αναφορικά με το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων, όπως και τα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων και των δύο πειραματικών σχεδιασμών, έτσι και τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται μέσω εκχύλισης με υπερήχους, αξιολογούνται ως προς τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία εκφράζεται μέσω του δείκτη IC₅₀. Ο τρόπος προσδιορισμού των τιμών αυτών έχει περιγραφεί αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος της παρούσας εργασίας.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 48 και 49) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των χαρακτηρισμών των εκχυλισμάτων ως προς τις εξεταζόμενες παραμέτρους, τόσο για τις εκχυλίσεις με χρήση θέρμανσης και ανάδευσης και NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21, όσο και για τις εκχυλίσεις με χρήση υπερήχων και αντίστοιχα τους ίδιους NaDES.

Πίνακας 48: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση και εκχύλισης με χρήση υπερήχων για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5.

Κωδικός πειράματος	Θέρμανση (40 °C) & Ανάδευση	Υπέρηχοι (120 Watt)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eqGA} l/ g _{wild rose})	Πειραματικό TFC (mg _{eqCA} l/ g _{wild rose})	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN59	✓	-	177	50	101.4	133.86±1.64	55.92±4.45	1.84	1.47	1.41	1.34
DN72	-	✓	30	50	101.4	131.16±3.28	61.55±3.82	1.21	1.03	0.91	0.84

Πίνακας 49: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση και εκχύλισης με χρήση υπερήχων για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21.

Κωδικός πειράματος	Θέρμανση (40 °C) & Ανάδευση	Υπέρηχοι (120 Watt)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eqGA} l/ g _{wild rose})	Πειραματικό TFC (mg _{eqCA} l/ g _{wild rose})	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (μL εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN69	✓	-	177	-*	101.4	119.93±5.11	47.35±2.46	1.42	1.04	0.96	0.83
DN73	-	✓	30	-*	101.4	151.53±6.85	57.36±1.44	1.30	1.11	1.00	0.94

*Στις εκχυλίσεις με χρήση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 ως εκχυλιστικό μέσο δε χρησιμοποιείται επιπλέον ποσότητα νερού στο διαλύτη.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες (Πίνακες 48 και 49), στις δύο μεθόδους εκχύλισης επιλέγονται ίδιες συνθήκες, με εξαίρεση το χρόνο εκχύλισης, όπου στην περίπτωση της εκχύλισης με χρήση υπερήχων ο χρόνος είναι σημαντικά μικρότερος, μιας και η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μέθοδος υψηλής ενέργειας και κατά συνέπεια, οι εκχυλίσεις διεξάγονται σε μικρότερους χρόνους. Η ποσότητα του άγριου τριαντάφυλλου, καθώς και το ποσοστό του νερού στο διαλύτη, στις περιπτώσεις που το νερό προστίθεται, παραμένουν ίδια στις δύο μεθόδους.

Στην περίπτωση όπου ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιείται ο NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 σε συνδυασμό με νερό (Πίνακας 48), παρατηρείται πως η χρήση υπερήχων, ως μέθοδο εκχύλισης, επιφέρει αντίστοιχο αποτέλεσμα στη τιμή του TPC και πιο συγκεκριμένα, ελάχιστα μικρότερο. Επιπρόσθετα, αναφορικά με την τιμή

του TFC, φαίνεται η χρήση μεθόδου υψηλής ενέργειας να επιφέρει αύξηση αυτής, της τάξης των 10 μονάδων σε $\text{mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$.

Τέλος, αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται φανερό πως η χρήση υπερήχων έναντι της θέρμανσης και της ανάδευσης οδηγεί σε εκχυλίσματα με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύεται πως οι υπέρηχοι ενισχύουν την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων και την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, ενώ αναφορικά με την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων επιφέρουν αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά της μεθόδου με θέρμανση και ανάδευση, και ελαφρώς λιγότερο ικανοποιητικά. Ωστόσο, δεν πρέπει να παραλειφθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος διεξήχθη για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα.

Στην περίπτωση όπου ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιείται ο NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 (Πίνακας 49), παρατηρείται πως η χρήση υπερήχων, ως μέθοδο εκχύλισης, ενισχύει τόσο την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων, όσο και την εκχύλιση φλαβονοειδών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση της τιμής του TPC, καθώς και της τιμής του TFC, κατά περίπου 10 μονάδες ($\text{mg}_{\text{eqGAL}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$ για τις φαινολικές ενώσεις και $\text{mg}_{\text{eqCAT}}/\text{g}_{\text{wild rose}}$ για τις φλαβονοειδείς ενώσεις).

Τέλος, αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που προκύπτουν με τις δύο μεθόδους, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές και οι τιμές του δείκτη IC_{50} είναι παρόμοιες και στους δύο τρόπους εκχύλισης.

Αξίζει να σημειωθεί πως, τα αποτελέσματα, τόσο για τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση θέρμανσης και ανάδευσης, όσο και για τη μέθοδο εκχύλισης με χρήση υπερήχων, είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά ως προς όλες τις παραμέτρους, TPC, TFC και IC_{50} . Όπως έχει αναφερθεί και στην Ενότητα 1, υπάρχουν διάφορα πλεονεκτήματα, καθώς και μειονεκτήματα στις διάφορες μεθόδους εκχύλισης και ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση επιλέγεται η κατάλληλη. Η μέθοδος με χρήση θέρμανσης και ανάδευσης αποτελεί μία ιδιαίτερα απλή και οικονομική μέθοδο εκχύλισης, ενώ από την άλλη η χρήση υπερήχων είναι ενδεικτική για περιπτώσεις όπου χρειάζεται η αποφυγή της θέρμανσης και των υψηλών θερμοκρασιών, ή η αποφυγή μεγάλων χρόνων εκχύλισης.

3.3.7 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Αναφορικά με το χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων, όπως και τα εκχυλίσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων και των δύο πειραματικών σχεδιασμών, έτσι και τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται μέσω συμβατικής εκχύλισης με χρήση συμβατικών διαλυτών (νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού), αξιολογούνται ως προς τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, τη συνολική τους περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία εκφράζεται μέσω του δείκτη IC_{50} . Ο τρόπος προσδιορισμού των τιμών αυτών έχει περιγραφεί αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 50 και 51) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των χαρακτηρισμών των εκχυλισμάτων ως προς το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδείς ενώσεις και το δείκτη IC₅₀ για χρόνο επώασης 15, 30, 45 και 60 min, τόσο για τις εκχυλίσεις με χρήση θέρμανσης και ανάδευσης και NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21, όσο και για τις εκχυλίσεις με χρήση συμβατικών διαλυτών.

Πίνακας 50: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση για NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και συμβατικής εκχύλισης με νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού.

Κωδικός πειράματος	NaDES	Συμβατικοί Διαλύτες	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσότητα εκχυλιστικού μέσου (g)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild} rose)	Πειραματικό TFC (mg _{eq} CA T/ g _{wild} rose)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN59	Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5	-	177	3	50	101.4	133.86±1.64	55.92±4.45	2.28*	1.82*	1.74*	1.66*
DN82	-	EtOH/H ₂ O	177	3	30	101.4	14.24±0.48	12.11±0.27	0.046	0.040	0.037	0.036
DN84	-	H ₂ O	177	3	100	101.4	51.65±0.97	20.71±0.52	0.099	0.091	0.086	0.084

*Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει έπειτα από μετατροπή της μονάδας του δείκτη IC₅₀ από μL/mL σε mg/mL, με χρήση της πυκνότητας του NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, η οποία είναι ίση με 1.236 g/mL.

Πίνακας 51: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση για NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 και συμβατικής εκχύλισης με νερό και σύστημα αιθανόλης/νερού.

Κωδικός πειράματος	NaDES	Συμβατικοί Διαλύτες	Χρόνος εκχύλισης (min)	Ποσότητα εκχυλιστικού μέσου (g)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/ 3 g διαλύτη	Πειραματικό TPC (mg _{eq} GA T/ g _{wild} rose)	Πειραματικό TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild} rose)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	Πειραματικό DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN78	Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-	-	240	3	30*	70	131.23±7.76	43.24±0.58	1.99**	1.81*	1.63*	1.60*

Νερό
1:5:21

DN83	-	$\frac{\text{EtOH/H}_2\text{O}}{\text{O}}$	240	3	30	70	18.13 ± 0.80	$\frac{9.94 \pm 0.5}{1}$	0.041	0.036	0.034	0.033
DN85	-	H_2O	240	3	100	70	64.78 ± 0.14	$\frac{27.56 \pm 0.3}{8}$	0.055	0.045	0.040	0.036

*Το ποσοστό του νερού έχει προστεθεί εξ'αρχής στην παρασκευή του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.

**Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει έπειτα από μετατροπή της μονάδας του δείκτη IC_{50} από $\mu\text{L/mL}$ σε mg/mL , με χρήση της πυκνότητας του DES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21, η οποία είναι ίση με 1.166 g/mL .

Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παραπάνω (Πίνακες 50 και 51) φαίνεται πως η χρήση συμβατικών διαλυτών, ως εκχυλιστικό μέσο, εμφανίζει σημαντικά χαμηλότερες τιμές αναφορικά με το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων (TPC, TFC).

Πιο αναλυτικά, η χρήση συστήματος αιθανόλης/νερού (70:30) ως διαλύτη εκχύλισης παρουσιάζει εξαιρετικά μειωμένες τιμές σε σύγκριση με το βαθέως ευτηκτικό διαλύτη Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5, ως μέσο εκχύλισης. Το TPC του εκχυλίσματος με διαλύτη NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 προκύπτει ίσο με $133.86 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$ και εξαιρετικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού, το οποίο προκύπτει $14.24 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$, και με διαλύτη νερό, το οποίο προκύπτει $51.65 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$. Η τιμή του TPC με χρήση πράσινου διαλύτη προκύπτει σχεδόν δεκαπλάσια συγκριτικά με την αντίστοιχη του συστήματος αιθανόλης/νερού, ως διαλύτη, και υπερδιπλάσια συγκριτικά με την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη νερό.

Όμοια, το ολικό περιεχόμενο των φλαβονοειδών ενώσεων του εκχυλίσματος με διαλύτη NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 προκύπτει ίσο με $52.98 \text{ mg}_{\text{eqCAT}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$ και εξαιρετικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού, το οποίο προκύπτει $12.11 \text{ mg}_{\text{eqCAT}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$, και με διαλύτη νερό, το οποίο προκύπτει $20.71 \text{ mg}_{\text{eqCAT}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$. Στην περίπτωση του TFC, η τιμή αυτού στο εκχύλισμα με χρήση πράσινου διαλύτη είναι παραπάνω από τετραπλάσια από την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/νερού και υπερδιπλάσια από την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη μόνο νερό.

Τα ίδια συμπεράσματα απορρέουν και από τη σύγκριση του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 με τους διαλύτες της συμβατικής εκχύλισης. Πιο αναλυτικά, το TPC του εκχυλίσματος με διαλύτη NaDES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 προκύπτει ίσο με $131.23 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$ και εξαιρετικά υψηλότερο με το αντίστοιχο με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού, το οποίο προκύπτει $18.13 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$, και με διαλύτη νερό, το οποίο προκύπτει $64.78 \text{ mg}_{\text{eqGAL}} / \text{g}_{\text{wild rose}}$. Η τιμή του TPC με χρήση πράσινου διαλύτη προκύπτει σχεδόν επταπλάσια συγκριτικά με την αντίστοιχη του συστήματος αιθανόλης/ νερού και διπλάσια συγκριτικά με την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη αποκλειστικά νερό.

Ομοίως, το TFC του εκχυλίσματος με διαλύτη NaDES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 προκύπτει ίσο με 43.24 mg_{eq}CAT/ g_{wild rose} και εξαιρετικά υψηλότερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού, το οποίο προκύπτει 9.94 mg_{eq}CAT/ g_{wild rose}, και με διαλύτη νερό, το οποίο προκύπτει 27.56 mg_{eq}CAT/ g_{wild rose}. Στην περίπτωση του TFC, η τιμή αυτού στο εκχύλισμα με χρήση πράσιου διαλύτη είναι παραπάνω από τετραπλάσια από την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού και σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη του εκχυλίσματος με διαλύτη αποκλειστικά νερό.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φαίνεται πως είναι εξίσου ικανοποιητική, τόσο στα εκχυλίσματα με χρήση NaDES ως εκχυλιστικό μέσο, όσο και στα εκχυλίσματα με χρήση συμβατικών διαλυτών. Οι τιμές του δείκτη IC₅₀ είναι ελαφρώς πιο χαμηλές στα εκχυλίσματα με χρήση συμβατικών διαλυτών. Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των τιμών του δείκτη IC₅₀ για τα εκχυλίσματα με χρήση NaDES και τα ξηρά εκχυλίσματα των συμβατικών εκχυλίσεων είναι άτοπη. Αξίζει να υπογραμμιστεί πως οι διαλύτες NaDES δε συνεισφέρουν καθόλου στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, συμπεράσμα το οποίο απορρέει έπειτα από μετρήσεις που έχουν διεξαχθεί για τους σκέτους NaDES με τη μέθοδο DPPH.

Τέλος, αξίζει να διεξαχθεί και σύγκριση μεταξύ των δύο συμβατικών διαλυτών. Οι τιμές, τόσο του ολικού περιεχομένου φαινολικών ενώσεων, όσο και του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων είναι πιο υψηλές στα εκχυλίσματα με διαλύτη αποκλειστικά νερό, συγκριτικά με τα εκχυλίσματα με διαλύτη σύστημα αιθανόλης/ νερού, αναλογίας 70:30. Ο δείκτης IC₅₀ είναι πολύ χαμηλός σε όλα τα εκχυλίσματα, γεγονός το οποίο συνεπάγεται υψηλή αντιοξειδωτική δράση, τόσο στα εκχυλίσματα με διαλύτη νερό, όσο και στα εκχυλίσματα με διαλύτη αιθανόλη/νερό.

3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ & ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗΣ ΚΡΕΜΑΣ

3.4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Η καλλυντική κρέμα, η οποία παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα (§2.11), αρχικά χωρίζεται σε δύο ισόποσα μέρη. Το ένα μέρος διατηρείται ως έχει, χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος (κρέμα Blank), ενώ στο δεύτερο μέρος πραγματοποιείται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας εκχυλίσματος. Εν συνεχεία, τόσο η κρέμα απουσία εκχυλίσματος, όσο και η κρέμα που εμπεριέχει το εκχύλισμα, υποβάλλονται σε ελέγχους σταθερότητας, όπως η φυγοκέντριση και ο κύκλος ψύξης-θέρμανσης. Η σταθερότητά τους ελέγχεται μέσω οπτικής παρατήρησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 18) παρουσιάζονται, τόσο η κρέμα απουσία εκχυλίσματος, όσο και η κρέμα που περιέχει το βέλτιστο εκχύλισμα και αξιολογούνται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και η σταθερότητάς τους.



Εικόνα 18: Αξιολόγηση της υφής των κρεμών. Αριστερή κρέμα: κρέμα με εκχυλίσμα, Δεξιά κρέμα: κρέμα απουσία εκχυλίσματος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 52) παρουσιάζονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και οι έλεγχοι σταθερότητας των δύο κρεμών, καθώς και ορισμένα συμπεράσματα αναφορικά με τα παραπάνω. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της κρέμας, τα οποία εξετάζονται, είναι το χρώμα, η υφή, καθώς και η ομοιογένεια αυτής. Επιπρόσθετα, στους ελέγχους σταθερότητας συμπεριλαμβάνονται η φυγοκέντριση και ο κύκλος ψύξης-θέρμανσης.

Πίνακας 52: Συγκεντρωτικός πίνακας των ποιοτικών χαρακτηριστικών των κρεμών και των ελέγχων σταθερότητας.

Κρέμα	Ποιοτικά Χαρακτηριστικά			Έλεγχοι Σταθερότητας	
	Χρώμα	Υφή	Ομοιογένεια	Φυγοκέντριση	Κύκλος freeze-thaw
Blank	Λευκό	Λιπαρή	Καλή	Ελαφρύς διαχωρισμός φάσεων	Καμία αλλοίωση
Extract	Εκρού	Λιπαρή	Εξαιρετική	Ελαφρύς διαχωρισμός φάσεων	Καμία αλλοίωση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 52, αναφορικά με το χρώμα της κρέμας, η προσθήκη του εκχυλίσματος μετέβαλε ελαφρώς αυτό, και από λευκό χρώμα (blank κρέμα) η τελική κρέμα έχει εκρού χρώμα. Ακόμη, όσον αφορά,

τόσο την κρέμα Blank, όσο και την κρέμα Extract, παρατηρήθηκε ελαφρύς διαχωρισμός φάσεων κατά τη φυγοκέντριση. Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει τη μερική υποβάθμιση του γαλακτώματος σε περίπτωση μεταφορών, οι οποίες προσομοιάζονται με την παραπάνω διαδικασία, όπου η κρέμα υποβάλλεται σε εξαιρετικά έντονη καταπόνηση, όπως είναι αυτή της άσκησης υψηλών βαρυτικών δυνάμεων κατά τη φυγοκέντριση και μάλιστα, σε μεγάλη χρονική διάρκεια (30 min), καθώς και εναλλαγή θερμοκρασιών. Άλλωστε, ο διαχωρισμός των φάσεων δεν αποτελεί μοναδικό αίτιο απόρριψης μίας κρέμας, καθώς μία εμπορική κρέμα δεν είθισται να υποβληθεί σε τέτοιες ακραίες συνθήκες. Τέλος, αναφορικά με την υφή των δύο κρεμών, αυτή χαρακτηρίζεται κρεμώδης και λιπαρή και για τις δύο περιπτώσεις, μιας και πρόκειται για γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (w/o). Ωστόσο, η υφή και η αίσθηση της κρέμας που εμπεριέχει το εκχύλισμα (extract κρέμα) είναι πιο ικανοποιητική από την κρέμα blank, όπως γίνεται φανερό και από την παραπάνω εικόνα (Εικόνα 18).

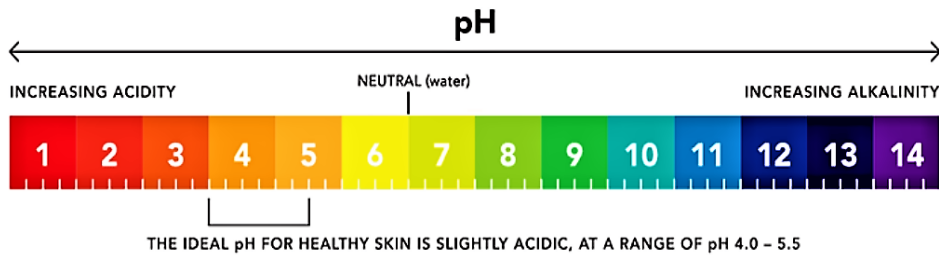
3.4.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ pH

Αναφορικά με την αξιολόγηση της κρέμας μέσω μέτρησης της τιμής του pH, αυτή διεξάγεται και για την κρέμα απουσία εκχυλίσματος, καθώς και για αυτή μετά την προσθήκη αυτού. Παράλληλα, πραγματοποιείται μέτρηση του pH, τόσο προτού διεξαχθεί ο κύκλος ψύξης-θέρμανσης, όσο και μετά το πέρας αυτού.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τιμής του pH της κρέμας που δεν περιέχει εκχύλισμα (κρέμα blank), προτού αυτή υποβληθεί στο κύκλο ψύξης-θέρμανσης. Η τιμή του pH αυτής είναι ίση με 7.08. Η αντίστοιχη της κρέμας, έπειτα από την προσθήκη εκχυλίσματος, είναι ίση με 4.92. Η τιμή του pH της κρέμας που περιέχει εκχύλισμα ρυθμίστηκε κατάλληλα με προσθήκη μικρής ποσότητας υδατικού διαλύματος NaOH 50%, καθώς η αρχική τιμή του pH αυτής ήταν ίση με 3.29. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να ρυθμιστεί το pH της κρέμας είναι εγκεκριμένη και σε βιομηχανική κλίμακα. Η χαμηλή τιμή του pH της κρέμας με το εκχύλισμα οφείλεται στον ισχυρά όξινο χαρακτήρα του εκχυλίσματος.

Οι τιμές 7.08, για την κρέμα blank, και 4.92, για την κρέμα με το εκχύλισμα, θεωρούνται εντός του εύρους των επιθυμητών ορίων του pH για ποικίλες εφαρμογές στο δέρμα, ιδιαίτερα της κρέμας παρουσία εκχυλίσματος (εύρος pH: 4-6)[114], [115].

Κατά αντιστοιχία, πραγματοποιείται μέτρηση της τιμής του pH των δύο κρεμών και έπειτα από τη διεξαγωγή του κύκλου ψύξης-θέρμανσης. Αναφορικά με την κρέμα blank, απουσία εκχυλίσματος, η τιμή του pH αυτής προκύπτει ίση με 7.01, τιμή εξαιρετικά παραπλήσια της αρχικής τιμής, πριν τη διεξαγωγή του κύκλου. Ακόμη, αναφορικά με την κρέμα extract, με προσθήκη εκχυλίσματος, η τιμή του pH αυτής προκύπτει ίση με 4.98, που και σε αυτή την περίπτωση η τιμή είναι παραπλήσια της αρχικής. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως και οι δύο κρέμες είναι σταθερές, μιας και η τιμή του pH τους δε μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του κύκλου ψύξης-θέρμανσης, και παράλληλα, όλες οι μετρήσεις pH οδηγούν στο συμπέρασμα πως και οι δύο κρέμες είναι εντός του ενδεδειγμένου εύρους τιμών.



Εικόνα 19: Ενδεικτικό εύρος τιμών pH για προϊόντα περιποίησης του δέρματος[116].

3.4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΡΕΜΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του αποδεσμευμένου από την κρέμα εκχυλίσματος πραγματοποιείται μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.12.1. Όπως και στη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, έτσι και στα δείγματα που λαμβάνονται κατά τη μελέτη αποδέσμευσης, προσδιορίζεται η % αναστολή των ριζών του DPPH για τους τέσσερις χρόνους επώασης (15, 30, 45 και 60 min) των δειγμάτων των διαφορετικών χρόνων αποδέσμευσης (20 min, 1 h, 2h, 3h και 4 h). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 53) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών του ποσοστού αναστολής των ριζών για τους τέσσερις χρόνους επώασης, 15, 30, 45 και 60 min για τα δείγματα των διαφόρων χρόνων.

Πίνακας 53: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για τα δείγματα διαφόρων χρόνων αποδέσμευσης, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Δείγματα	% Αναστολής			
	15 min	30 min	45 min	60 min
20 min	31.1	32.9	33.7	34.6
1 hour	40.6	44.2	45.5	47.4
2 hours	50.4	55.7	58.7	60.6
3 hours	57.5	62.4	65.7	67.6
4 hours	60.6	66.2	69.2	71.3

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 53 μπορούν να προκύψουν συμπεράσματα, τόσο αναφορικά με την επίδραση του χρόνου λήψης δείγματος στην αντιοξειδωτική ικανότητα, όσο και του χρόνου επώασης σε αυτή. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά το χρόνο λήψης δείγματος, παρατηρείται πως με την αύξηση του ποσοστού αποδέσμευσης του εκχυλίσματος, το δείγμα που λαμβάνεται εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής των ριζών του DPPH. Το αποτέλεσμα αυτό συνεπάγεται ότι η αύξηση του ποσοστού αποδέσμευσης του εκχυλίσματος έχει ως απόρροια την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και άρα, το υψηλότερο ποσοστό δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH. Παράλληλα, όσον αφορά το χρόνο επώασης των δειγμάτων, γίνεται φανερό πως η αύξηση του χρόνου επώασης έχει ως αποτέλεσμα

μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής, που υποδηλώνει το προστατευτικό ρόλο του πράσινου διαλύτη, ως εκχυλιστικού μέσου, για τη βιοδραστικά συστατικά.

Στον Πίνακα 54 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH που επιτεύχθηκαν από την εφαρμογή της μεθόδου στο εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή της κρέμας.

Πίνακας 54: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για το βέλτιστο εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στην παρασκευή της κρέμας, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Κωδικός πειράματος	Χρόνος (min)	Ποσοστό νερού στο διαλύτη (%)	Μάζα άγριου τριαντάφυλλου (mg)/3 g διαλύτη	% Αναστολής			
				15 min	30 min	45 min	60 min
DN59	177	50	101.4	61.9	67.6	71.2	73.3

Αξίζει να αναφερθούν και τα αποτελέσματα της επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH που επιτεύχθηκαν από την εφαρμογή της μεθόδου σε πρότυπο, ασκορβικό οξύ, συγκέντρωσης, αιθανολικού διαλύματος, 1 mg/ 50 mL (Πίνακας 55).

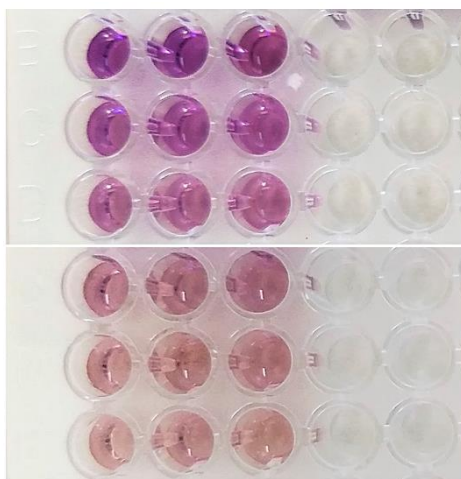
Πίνακας 55: Αποτελέσματα επί τοις εκατό αναστολής των ριζών του DPPH για πρότυπο ασκορβικό οξύ, σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Πρότυπο	Συγκέντρωση (mg/ mL)	% Αναστολής			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Ασκορβικό οξύ	0.02	72.9	73.3	73.3	73.4

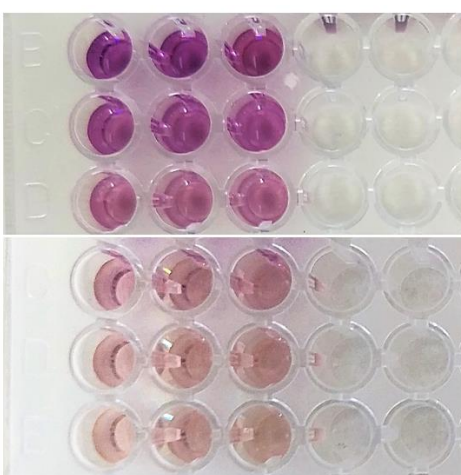
Συγκρίνοντας τα ποσοστά αναστολής του εκχυλίσματος με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από το αποδεσμευμένο, από την κρέμα, εκχύλισμα, προκύπτει πως με το πέρασμα του χρόνου παρατηρείται η πλήρης αποδέσμευση του ενσωματωμένου, στην κρέμα, εκχυλίσματος. Ειδικότερα, για χρόνο δειγματοληψίας 4 h, το ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται είναι παραπλήσιο με το ποσοστό αναστολής αποκλειστικά του εκχυλίσματος και ελαφρώς μικρότερο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικά αναφορικά με την αποδέσμευση των αντιοξειδωτικών ουσιών του εκχυλίσματος από την κρέμα στο διάλυμα και τον προστατευτικό ρόλο που παρουσιάζει ο πράσινος διαλύτης ως εκχυλιστικό μέσο.

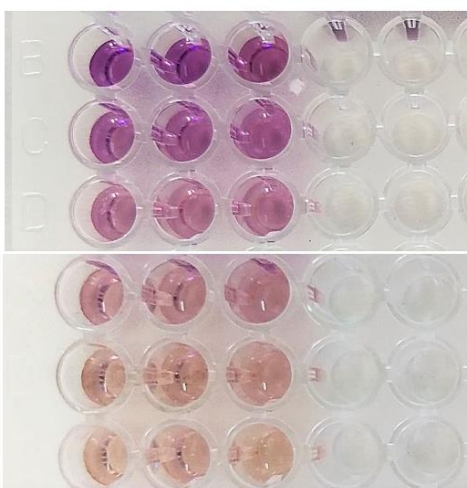
Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες του plate (Εικόνες 20, 21, 22 και 23) στο οποίο έχουν τοποθετηθεί τα δείγματα που λήφθηκαν από τη μελέτη αποδέσμευσης για τους διάφορους χρόνους επώασης. Βάσει των εικόνων αξίζει να σημειωθεί πως η πρώτη γραμμή αφορά το control, η δεύτερη το δείγμα για μελέτη 20 min, η τρίτη το δείγμα της 1 h, η τέταρτη των 2 h, η πέμπτη των 3 h και η τελευταία των 4 h. Κάθε δείγμα έχει μετρηθεί εις τριπλούν, όπως αναφέρεται και σε προηγούμενη υποενότητα (§2.12.1), για λόγους επαναληψιμότητας.



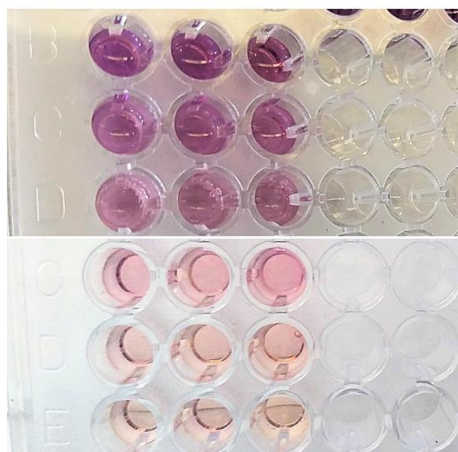
Εικόνα 20: Δείγματα για χρόνο επώασης 15 min.



Εικόνα 21: Δείγματα για χρόνο επώασης 30 min.



Εικόνα 22: Δείγματα για χρόνο επώασης 45 min.



Εικόνα 23: Δείγματα για χρόνο επώασης 60 min.

Μελετώντας τις παραπάνω εικόνες (Εικόνες 20, 21, 22 και 23) αποδεικνύονται τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν και μέσω χρωματικής απεικόνισης. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τις διάφορες σειρές του plate μεταξύ τους, παρατηρείται πως τα δείγματα που έχουν ληφθεί σε μεγαλύτερους χρόνους της μελέτης αποδέσμευσης, εμφανίζουν μεγαλύτερο αποχρωματισμό. Το παραπάνω συνεπάγεται πως τα δείγματα αυτά εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό αποδέσμευσης των αντιοξειδωτικών ουσιών, άρα και υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Ακόμη, συγκρίνοντας τις εικόνες των διαφορετικών χρόνων επώασης μεταξύ τους, παρατηρείται πως η αύξηση του χρόνου επώασης των δειγμάτων οδηγεί σε μεγαλύτερο αποχρωματισμό αυτών. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο μεγαλύτερος αποχρωματισμός των δειγμάτων οφείλεται στη μεγαλύτερη απελευθέρωση αντιοξειδωτικών ουσιών και άρα, στη μεγαλύτερη αναστολή των ριζών του DPPH.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση της πράσινης διεργασίας εκχύλισης φυτικής πρώτης ύλης και πιο συγκεκριμένα, καρπών άγριου τριαντάφυλλου, με χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES), ως εκχυλιστικό και «αποθηκευτικό» μέσο για τις βιοδραστικές ενώσεις, με στόχο την παραλαβή και αξιοποίηση εκχυλισμάτων για την ανάπτυξη καινοτόμων καλλυντικών σκευασμάτων προστιθέμενης αξίας. Σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφική μελέτη που έγινε στα πλαίσια αυτής της εργασίας, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να αφορούν τη χρήση πράσινων διαλυτών, και πιο συγκεκριμένα NaDES, για την εκχύλιση του άγριου τριαντάφυλλου.

Πιο αναλυτικά, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών και επιλογή των δύο καταλληλότερων για εκχύλιση υπάνθιου άγριου τριαντάφυλλου. Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που επιλέχθηκαν είναι ο Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 και ο Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21. Οι διαλύτες αυτοί επιλέχθηκαν με βάση την πολύ καλή εκχυλιστική τους ικανότητα βιοδραστικών ενώσεων, την εύκολη διαχείρισή τους ως προς το ιξώδες, τους μικρούς χρόνους παρασκευής τους και το χαμηλό κόστος πρώτων υλών. Με τους δύο παραπάνω διαλύτες διεξήχθησαν προκαταρκτικά πειράματα εκχυλίσεων, εξετάζοντας διάφορες παραμέτρους εκχύλισης, και τα εκχυλίσματα που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν ως προς το ολικό περιεχόμενο φαινολικών ενώσεων (TPC), το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών ενώσεων (TFC) και την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών DPPH.

Βελτιστοποίηση εκχύλισης με χρήση NaDES ως εκχυλιστικό μέσο

Οι διεργασίες εκχύλισης με τους δύο επιλεγόμενους πράσινους διαλύτες βελτιστοποιήθηκαν με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού, Box-Behnken για το NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:2:2.5) και Κλασματικό Παραγοντικό Σχεδιασμό Δύο Επιπέδων για το NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:5:21). Τα 17 πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken και τα 8 πειράματα του Κλασματικού Παραγοντικού Σχεδιασμού Δύο Επιπέδων χαρακτηρίστηκαν ως προς τα TPC, TFC και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.

Από τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken του NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 προέκυψαν τρεις εξισώσεις πρόβλεψης, τα οποία αφορούν το TPC, το TFC και την αντιοξειδωτική δράση, εκφρασμένη ως προς το δείκτη IC₅₀, τα οποία είναι:

- $TPC = 82.95190 + 0.373383 \cdot Time + 0.209375 \cdot \% Water + 0.036917 \cdot RM - 0.000425 \cdot Time \cdot RM + 0.001237 \cdot \% Water \cdot RM - 0.000886 \cdot Time^2 - 0.000111 \cdot RM^2$
- $TFC = 41.55635 - 0.010450 \cdot Time + 0.782961 \cdot \% Water - 0.051919 \cdot RM - 0.003502 \cdot Time \cdot \% Water + 0.000525 \cdot Time \cdot RM + 0.000605 \cdot \% Water \cdot RM + 0.000723 \cdot Time^2 - 0.012637 \cdot \% Water^2 - 0.000014 \cdot$

$$Time^2 \cdot \% Water - 2.45874 \cdot 10^{-6} \cdot Time^2 \cdot RM + 0.000101 \cdot Time \cdot \% Water^2$$

- $1/IC_{50} = +0.143838 - 0.004032 \cdot Time + 0.020595 \cdot \% Water + 0.004554 \cdot RM + 0.000059 \cdot Time \cdot \% Water + 0.000018 \cdot Time \cdot RM + 5.31959 \cdot 10^{-6} \cdot Time^2 - 0.000399 \cdot \% Water^2 - 3.37087 \cdot 10^{-6} \cdot RM^2 - 4.64939 \cdot 10^{-8} \cdot Time^2 \cdot RM.$

Από τον Κλασματικό Παραγοντικό Σχεδιασμό Δύο Επιπέδων του NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 προέκυψαν τρεις εξισώσεις πρόβλεψης, οι οποίες αφορούν το TPC, το TFC και την αντιοξειδωτική δράση, εκφρασμένη ως προς το δείκτη IC₅₀ και είναι:

- $TPC = 150.74385 - 0.079617 \cdot Time - 0.177726 \cdot RM + 0.000357 \cdot Time \cdot RM$
- $TFC = 37.60931 + 0.042883 \cdot Time - 0.016873 \cdot RM$
- $IC_{50} = 2.09498 - 0.000885 \cdot Time - 0.003995 \cdot RM + 1.75022 \cdot 10^{-6} \cdot Time \cdot RM.$

Και για τους δύο πειραματικούς σχεδιασμούς, προκύπτει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών, καθώς οι εξισώσεις που προέκυψαν έχουν R² υψηλότερο από 0.87 (όλες οι εξισώσεις με εξαίρεση μία παρουσιάζουν R² μεγαλύτερο από 0.95).

Έπειτα από την εξαγωγή των μοντέλων των αποκρίσεων, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των δύο διεργασιών εκχύλισης, με στόχο την ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των τιμών TPC και TFC. Οι βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση με χρήση NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:2:2.5) είναι:

- ✓ χρόνος εκχύλισης: 177 min,
- ✓ ποσοστό νερού στο εκχυλιστικό μέσο: 50% και
- ✓ ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου: 101.4 mg.

Οι τιμές των αποκρίσεων με τις συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης είναι: TPC 129.85 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC 56.60 mg_{CAT}/g_{wild rose} και IC₅₀ 1.65 μL/mL. Οι τιμές αυτές βρίσκονται εντός του εύρους των προβλεπόμενων τιμών από το πρόγραμμα Design-Expert 12 (Free Trial Version), γεγονός που αποδεικνύει την εγκυρότητα των μοντέλων.

Επιπρόσθετα, οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:5:21) είναι:

- ✓ χρόνος εκχύλισης: 240 min και
- ✓ ποσότητα άγριου τριαντάφυλλου ανά 3 g εκχυλιστικού μέσου: 70 mg.

Να σημειωθεί πως στην περίπτωση του δεύτερου πειραματικού σχεδιασμού δεν εξετάστηκε ως παράμετρος το ποσοστό νερού στο διαλύτη, καθώς το νερό προστέθηκε εξ'αρχής ως συστατικό κατά τη σύνθεση του NaDES. Οι βέλτιστες τιμές των αποκρίσεων με τις συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης είναι: TPC 131.23 mg_{GAL}/g_{wild rose}, TFC 43.24 mg_{CAT}/g_{wild rose} και IC₅₀ 1.71 μL/mL. Οι τιμές αυτές βρίσκονται εντός του εύρους των προβλεπόμενων τιμών από το πρόγραμμα Design-Expert 12 (Free Trial Version), γεγονός που αποδεικνύει την εγκυρότητα των μοντέλων.

Παράλληλα, διεξήχθησαν πειράματα επιβεβαίωσης των μοντέλων, και για τους δύο πειραματικούς σχεδιασμούς, για συνθήκες εκτός των επιλεγόμενων ευρών και οι πειραματικές τιμές των αποκρίσεων βρέθηκαν πολύ κοντά στις θεωρητικά προβλεπόμενες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά, καθώς αποδεικνύεται ότι τα μοντέλα έχουν καλή προσαρμογή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόβλεψη και εκτός των ορίων που τέθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης των NaDES-εκχυλισμάτων

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε πως η αύξηση του χρόνου αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH συνεπάγεται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί μία σημαντική πρώτη ένδειξη της προστατευτικής δράσης των πράσινων διαλυτών, NaDES, για τις εκχυλιζόμενες βιοδραστικές ενώσεις. Με την πάροδο του χρόνου, τα εκχυλισμένα βιοδραστικά μόρια απελευθερώνονται από το πλέγμα του NaDES και η αλληλεπίδραση με την ελεύθερη, σταθερή ρίζα του DPPH είναι ισχυρότερη.

Εκχύλιση με χρήση συμβατικών διαλυτών

Εν συνεχεία, θεωρήθηκε σκόπιμη η σύγκριση των αποτελεσμάτων των αποκρίσεων των εκχυλισμάτων με πράσινους διαλύτες με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από εκχυλίσεις με χρήση συμβατικών διαλυτών. Πιο αναλυτικά, διεξήχθησαν εκχυλίσεις με διαλύτες σύστημα αιθανόλης/νερού (αναλογίας 70:30) και αποκλειστικά νερού, στις ίδιες συνθήκες με αυτές των πειραμάτων βελτιστοποίησης των δύο πειραματικών σχεδιασμών. Η σύγκριση αυτή φανέρωσε πως οι πράσινοι διαλύτες δίνουν πολύ πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα αναφορικά με τα TPC και TFC, γεγονός που συνεπάγεται την πολύ καλύτερη εκχυλιστική τους ικανότητα αναφορικά με τις βιοδραστικές ενώσεις. Το παραπάνω φαίνονται αναλυτικά και στους Πίνακες 56 και 57.

Πίνακας 56: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5 και συμβατικών διαλυτών για συνθήκες εκχύλισης: 177 min, 101.4 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη.

Κωδικός Πειράματος	Εκχυλιστικό μέσο	TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild rose})	DPPH	DPPH	DPPH	DPPH
				IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN59	NaDES/H ₂ O (50:50): Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:2:2.5	133.86±1.64	55.92±4.45	2.28	1.82	1.74	1.66
DN82	EtOH/H ₂ O (70:30)	14.24±0.48	12.11±0.27	0.046	0.040	0.037	0.036
DN84	H ₂ O	51.65±0.97	20.71±0.52	0.099	0.091	0.086	0.084

Πίνακας 57: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21 και συμβατικών διαλυτών για συνθήκες εκχύλισης: 240 min, 70 mg άγριο τριαντάφυλλο/ 3 g διαλύτη.

Κωδικός Πειράματος	Εκχυλιστικό μέσο	TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild rose})	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (60 min)
DN78	NaDES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό οξύ-Νερό 1:5:21	131.23±7.76	43.24±0.58	1.99	1.81	1.63	1.60
DN83	EtOH/H ₂ O	18.13±0.80	9.94±0.51	0.041	0.036	0.034	0.033
DN85	H ₂ O	64.78±0.14	27.56±0.38	0.055	0.045	0.040	0.036

Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε και η εκχύλιση με χρήση πράσινης τεχνικής υψηλής ενέργειας και πιο συγκεκριμένα, η εκχύλιση με χρήση υπερήχων και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων των αποκρίσεων της εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση και NaDES, ως εκχυλιστικά μέσα, και της εκχύλισης με χρήση υπερήχων και τους ίδιους διαλύτες εκχύλισης. Οι συνθήκες των εκχυλίσεων με χρήση υπερήχων επιλέχθηκαν ίδιες με αυτές των βέλτιστων πειραμάτων, όπως αυτές προέκυψαν από τους πειραματικούς σχεδιασμούς, με μόνη διαφοροποίηση το χρόνο εκχύλισης. Στις εκχυλίσεις με τεχνικές υψηλής ενέργειας χρησιμοποιούνται μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης, προκειμένου να μην υπερθερμανθεί και υποβαθμιστεί το εκχύλισμα, καθώς και για λόγους κόστους. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ήταν αρκετά παρόμοια, χωρίς να αποδεικνύεται πως κάποια από τις δύο μεθόδους είναι προτιμότερη, γεγονός το οποίο γίνεται φανερό στους Πίνακες 58 και 59.

Πίνακας 58: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES: Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:2:2.5 με δύο τεχνικές εκχύλισης για συνθήκες εκχύλισης: 50% νερό στο εκχυλιστικό μέσο και 101.4 mg/ 3 g διαλύτη.

Κωδικός Πειράματος	Μέθοδος εκχύλισης	Χρόνος εκχύλισης (min)	TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild rose})	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (60 min)
DN59	Θέρμανση & Ανάδευση	177	133.86±1.64	55.92±4.45	1.84	1.47	1.41	1.34
DN72	Υπερήχοι	30	131.16±3.28	61.55±3.82	1.21	1.03	0.91	0.84

Πίνακας 59: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων των εκχυλίσεων με NaDES: Γλυκίνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό 1:5:21 με δύο τεχνικές εκχύλισης για συνθήκη εκχύλισης: 101.4 mg/ 3 g διαλύτη.

Κωδικός Πειράματος	Μέθοδος εκχύλισης	Χρόνος εκχύλισης (min)	TPC (mg _{eq} GAL/ g _{wild rose})	TFC (mg _{eq} CAT/ g _{wild rose})	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος/ mL διαλύματος) (15 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (30 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (45 min)	DPPH IC ₅₀ (mg εκχυλίσματος / mL διαλύματος) (60 min)
DN69	Θέρμανση & Ανάδευση	177	119.93±5.11	47.35±2.46	1.42	1.04	0.96	0.83
DN73	Υπέρηχοι	30	151.53±6.85	57.36±1.44	1.30	1.11	1.00	0.94

Παρασκευή καλλυντικής κρέμας προστιθέμενης αξίας

Τέλος, με στόχο την αξιοποίηση του υψηλής προστιθέμενης αξίας εκχυλίσματος, παρασκευάστηκε καλλυντική κρέμα νερού σε έλαιο. Πιο συγκεκριμένα, το εκχύλισμα που προέκυψε από τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης του πειραματικού σχεδιασμού με NaDES Βεταΐνη-D,L Γαλακτικό Οξύ-Νερό (1:2:2.5) ενσωματώθηκε σε καλλυντική κρέμα και διεξήχθησαν μελέτες αξιολόγησης παραμέτρων, όπως η σταθερότητα και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της κρέμας. Από τις μελέτες αυτές προέκυψε το συμπέρασμα πως η κρέμα με το ενσωματωμένο εκχύλισμα (κρέμα extract) παρουσίασε βελτιωμένα χαρακτηριστικά, σε σύγκριση με την κρέμα βάσης (κρέμα blank). Επιπρόσθετα, ακολούθησε μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων του εκχυλίσματος που έχει ενσωματωθεί στο καλλυντικό σκεύασμα. Η εν λόγω μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών DPPH.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν πως με το πέρασμα του χρόνου φανερώθηκε πλήρης αποδέσμευση του ενσωματωμένου, στην κρέμα, εκχυλίσματος. Ειδικότερα, για χρόνο δειγματοληψίας 4 h, το ποσοστό αναστολής που επιτυγχάνεται είναι παραπλήσιο με το ποσοστό αναστολής αποκλειστικά του εκχυλίσματος και ελαφρώς μικρότερο. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εξαιρετικά ενθαρρυντικά αναφορικά με την αποδέσμευση των αντιοξειδωτικών ουσιών του εκχυλίσματος από την κρέμα στο διάλυμα και τον προστατευτικό ρόλο που παρουσιάζει ο πράσινος διαλύτης ως εκχυλιστικό μέσο.

5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και συμπεράσματα που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη φανερώνουν την ύπαρξη νέων προοπτικών για την ανάπτυξη και την υλοποίηση ιδεών και καινοτόμων διεργασιών εκχύλισης άγριου τριαντάφυλλου. Παρακάτω παρατίθενται ορισμένες δυνατότητες συνέχισης και εξέλιξης της έρευνας του τομέα αυτού, οι οποίες θα ανοίξουν νέα επιστημονικά μονοπάτια.

- ❖ Δοκιμή διαφορετικών φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, υπό τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης, ώστε να αναδειχθούν και νέοι πράσινοι διαλύτες, ικανοί να εκχυλίσουν βιοδραστικές ενώσεις από το άγριο τριαντάφυλλο.
- ❖ Μελέτη της κυτταροτοξικότητας των NaDES που χρησιμοποιήθηκαν, των εκχυλισμάτων, καθώς και του τελικού προϊόντος (καλλυντική κρέμα).
- ❖ Δοκιμή διαφορετικών τμημάτων του άγριου τριαντάφυλλου, ως πρώτες ύλες, στη διεργασία εκχύλισης (ολόκληρος καρπός, φύλλα κ.α.).
- ❖ Πλήρης ταυτοποίηση του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου με ενόργανες μεθόδους ανάλυσης (π.χ. HPLC).
- ❖ Εφαρμογή εκχύλισης άγριου τριαντάφυλλου διαφορετικού τύπου προέλευσης, με στόχο την εξέταση της γεωγραφικής περιοχής ως παράμετρο.
- ❖ Εφαρμογή εκχύλισης υποβοηθούμενης από εναλλακτική τεχνική υψηλής ενέργειας (μικροκύματα) ή συνδυασμό τεχνικών υψηλής ενέργειας (υπέρηχοι και μικροκύματα).
- ❖ Διερεύνηση της αξιοποίησης του υπολείμματος άγριου τριαντάφυλλου που προκύπτει από την εκχύλιση σε διεργασίες βιοδιύλιση, με στόχο την πιθανή απόκτηση δευτερευόντων προϊόντων (βιοκαύσιμα ή άλλα χημικά).
- ❖ Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με διαφορετικές μεθόδους, εκτός της μεθόδου δέσμευσης ριζών DPPH (μέθοδος ABTS, FRAP, AAPH).
- ❖ Εξέταση πιθανού εγκλωβισμού εκχυλισμάτων σε νανοσυστήματα για την επίτευξη τροποποιημένης αποδέσμευσης των δραστικών συστατικών τους.
- ❖ Εξέταση πιθανής ενσωμάτωσης εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου σε συστήματα υδρογελών ή άλλα τελικά προϊόντα τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.
- ❖ Μελέτη της διάρκειας ζωής των εκχυλισμάτων άγριου τριαντάφυλλου, ως προς τη διατήρηση της βιοδραστικότητάς τους στο χρόνο.
- ❖ Ανάπτυξη διεργασίας εκχύλισης πιλοτικής κλίμακας στις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που προέκυψαν από την εν λόγω έρευνα και για τους δύο NaDES που σχεδιάστηκαν και αξιοποιήθηκαν και παράλληλη ανάλυση της οικονομικής βιωσιμότητας.
- ❖ Μελέτη της βιομηχανικής εφαρμογής της εκχύλισης άγριου τριαντάφυλλου, εξετάζοντας την αποδοτικότητα της διεργασίας και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] P. T. Anastas and J. C. Warner, *Πράσινη Χημεία - Θεωρία και Πράξη*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2007.
- [2] H. C. Erythropel *et al.*, “The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles,” *Green Chemistry*, vol. 20, no. 9, pp. 1929–1961, 2018, doi: 10.1039/C8GC00482J.
- [3] N. Ahmad, F. Anwar, and A.-H. Gilani, “Rose Hip (*Rosa canina* L.) Oils,” in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Elsevier, 2016, pp. 667–675. doi: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00076-6.
- [4] S. Patel, “Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 63, pp. 29–38, May 2017, doi: 10.1016/j.tifs.2017.03.001.
- [5] K. Zahara, Y. Bibi, I. Riaz, N. Sardar, H. M. Sadaf, and F. Bibi, “Pharmacological Attributes of *Rosa Canina* L: A Potential Nutraceutical,” *Journal of Medicinal and Spice Plants*, vol. 24, no. 2, pp. 92–96, Aug. 2020.
- [6] S. Miraj, “Phytochemical Composition and in Vitro Pharmacological Activity of Rose Hip (*Rosa canina* L.),” *Der Pharma Chemica*, vol. 8, no. 13, pp. 117–122, 2016.
- [7] N. Koczka, É. Stefanovits-Bányai, and A. Ombódi, “Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some *Rosa* Species,” *Medicines*, vol. 5, no. 3, p. 84, Aug. 2018, doi: 10.3390/medicines5030084.
- [8] Olcay ŞENDİL, “Effect of some parameters on the extraction and decomposition of ascorbic acid in the rosehip,” *Turkish J. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 61–72, 2006.
- [9] H. Ghazghazi *et al.*, “Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities,” *Afr J Biotechnol*, vol. 9, no. 18, pp. 2709–2716, May 2010.
- [10] V. Okatan, A. M. Çolak, S. F. Güçlü, N. Korkmaz, and A. Şekara, “Local genotypes of dog rose from Interior Aegean region of Turkey as a unique source of pro-health compounds,” *Bragantia*, vol. 78, no. 3, pp. 397–408, Sep. 2019, doi: 10.1590/1678-4499.20180386.
- [11] M. Polumackanycz *et al.*, “Phenolic Composition and Biological Properties of Wild and Commercial Dog Rose Fruits and Leaves,” *Molecules*, vol. 25, no. 22, p. 5272, Nov. 2020, doi: 10.3390/molecules25225272.
- [12] Amin Selahvarzian, Abuzar Alizadeh, Peyman Amanolahi Baharvand, Omayma A. Eldahshan, and Bahram Rasoulia, “Medicinal Properties of *Rosa canina* L.,” *Herbal Medicines Journal*, vol. 3, no. 2, pp. 77–84, Feb. 2018.
- [13] J. Živković, D. Stojković, J. Petrović, G. Zdunić, J. Glamočlija, and M. Soković, “*Rosa canina* L. – new possibilities for an old medicinal herb,” *Food Funct*, vol. 6, no. 12, pp. 3687–3692, 2015, doi: 10.1039/C5FO00820D.
- [14] M. Kubczak *et al.*, “Bioactive Compounds and Antiradical Activity of the *Rosa canina* L. Leaf and Twig Extracts,” *Agronomy*, vol. 10, no. 12, p. 1897, Dec. 2020, doi: 10.3390/agronomy10121897.
- [15] Elham Baher, Naser Montazeri, Zahra Barami, and Khalil Purshamsian, “Chemical Evaluation of *Rosa canina* Fruit to Determine Ascorbic Acid Content,” *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 27, no. 3, pp. 1049–1052, 2011.

- [16] M. Javanmard, H. A. Asadi-Gharneh, and P. Nikneshan, "Characterization of biochemical traits of dog rose (*Rosa canina* L.) ecotypes in the central part of Iran," *Nat Prod Res*, vol. 32, no. 14, pp. 1738–1743, 2018, doi: 10.1080/14786419.2017.1396591.
- [17] Z. İlbay, S. Şahin, and Ş. Kirbaşlar, "Investigation of Polyphenolic Content of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Tea Extracts: A Comparative Study," *Foods*, vol. 2, no. 1, pp. 43–52, Feb. 2013, doi: 10.3390/foods2010043.
- [18] G. Angelov, S. Boyadzhieva, and S. Georgieva, "Rosehip extraction: Process optimization and antioxidant capacity of extracts," *Central European Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 4, pp. 502–508, 2014, doi: 10.2478/s11532-013-0395-0.
- [19] D. Ousaaid, I. Mansouri, H. Laaroussi, A. ElGhouzi, B. Lyoussi, and I. ElArabi, "Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Flesh Fruits *Rosa canina* Extracts Collected from Ait Ayach Midelt," *Indian J Agric Res*, vol. 54, no. 3, pp. 373–377, Jun. 2020, doi: 10.18805/IJARE.A-494.
- [20] A. STĂNILĂ *et al.*, "Extraction and Characterization of Phenolic Compounds from Rose Hip (*Rosa canina* L.) Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization - Mass Spectrometry," *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*, vol. 43, no. 2, pp. 349–354, Dec. 2015, doi: 10.15835/nbha43210028.
- [21] E. Maloupa *et al.*, "Molecular Authentication, Phytochemical Evaluation and Asexual Propagation of Wild-Growing *Rosa canina* L. (Rosaceae) Genotypes of Northern Greece for Sustainable Exploitation," *Plants*, vol. 10, no. 12, p. 2634, Nov. 2021, doi: 10.3390/plants10122634.
- [22] J. Gruenwald, R. Uebelhack, and M. I. Moré, "Rosa canina – Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanisms counteracting osteoarthritis – A systematic review," *Phytomedicine*, vol. 60, p. 152958, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.152958.
- [23] Silviya Georgieva, George Angelov, and Stanislava Boyadzhieva, "Concentration of Vitamin C and Antioxidant Activity of Rosehip Extracts," *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, vol. 49, no. 5, pp. 451–454, 2014.
- [24] N. T. Ul'chenko, N. P. Bekker, O. A. Aripov, and A. I. Glushenkova, "Lipids of *Rosa canina* pericarp," *Chem Nat Compd*, vol. 45, no. 6, pp. 867–869, 2009.
- [25] O. Yi, E. M. Jovel, G. H. N. Towers, T. R. Wahbe, and D. Cho, "Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada," *Int J Food Sci Nutr*, vol. 58, no. 3, pp. 178–189, Jan. 2007, doi: 10.1080/09637480601121318.
- [26] K. Winther, J. Campbell-Tofte, and A. S. Vinther Hansen, "Bioactive ingredients of rose hips (*Rosa canina* L) with special reference to antioxidative and anti-inflammatory properties: in vitro studies," *Botanics*, vol. 6, pp. 11–23, Feb. 2016, doi: 10.2147/BTAT.S91385.
- [27] Amelia Scalise, "Rosehip Pericarps and Seeds as Possible Food and Natural Antioxidants in Food and Beverage," in *on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology*, Sep. 2019, pp. 300–302.
- [28] D. P. Makris and S. Lalas, "Glycerol and Glycerol-Based Deep Eutectic Mixtures as Emerging Green Solvents for Polyphenol Extraction: The Evidence So Far," *Molecules*, vol. 25, no. 24, p. 5842, Dec. 2020, doi: 10.3390/molecules25245842.
- [29] D. Stagos, "Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts," *Antioxidants*, vol. 9, no. 1, p. 19, Dec. 2019, doi: 10.3390/antiox9010019.

- [30] R. Guimarães *et al.*, “Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal,” *Food Chem*, vol. 141, no. 4, pp. 3721–3730, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.071.
- [31] M. Knez Hrnčič, D. Cör, P. Kotnik, and Ž. Knez, “Extracts of White and Red Grape Skin and Rosehip Fruit: Phenolic Compounds and their Antioxidative Activity,” *Acta Chim Slov*, vol. 66, pp. 751–761, Dec. 2019, doi: 10.17344/acsi.2019.5253.
- [32] L. A. de la Rosa, J. O. Moreno-Escamilla, J. Rodrigo-García, and E. Alvarez-Parrilla, “Phenolic Compounds,” in *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, Elsevier, 2019, pp. 253–271. doi: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9.
- [33] Ali Ghasemzadeh and Neda Ghasemzadeh, “Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human,” *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 31, pp. 6697–6703, Dec. 2011, doi: 10.5897/JMPR11.1404.
- [34] I. Mármol, C. Sánchez-de-Diego, N. Jiménez-Moreno, C. Ancín-Azpilicueta, and M. Rodríguez-Yoldi, “Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species,” *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 6, p. 1137, May 2017, doi: 10.3390/ijms18061137.
- [35] Δ. Τσιμογιάννης, “Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών,” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ) Σχολή Χημικών Μηχανικών Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, 2008. doi: 10.12681/eadd/17345.
- [36] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, and Y. M. Hijji, “Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation,” *LWT*, vol. 150, p. 111932, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111932.
- [37] D. Skarpalezos and A. Detsi, “Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources,” *Applied Sciences*, vol. 9, no. 19, p. 4169, Oct. 2019, doi: 10.3390/app9194169.
- [38] M. A. Hanif, S. Nisar, G. S. Khan, Z. Mushtaq, and M. Zubair, “Essential Oils,” in *Essential Oil Research*, Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 3–17. doi: 10.1007/978-3-030-16546-8_1.
- [39] C. Turek and F. C. Stintzing, “Stability of Essential Oils: A Review,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 12, no. 1, pp. 40–53, 2013, doi: 10.1111/1541-4337.12006.
- [40] H. Ghazghazi *et al.*, “Chemical variability of the essential oils from *Rosa canina* L. and *Rosa sempervirens* L. flowers collected at Tunisia,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 24, no. 5, pp. 475–480, Aug. 2012, doi: 10.1080/10412905.2012.703509.
- [41] Ira Taneva, Nadezhda Petkova, Ivan Dimov, Ivan Ivanov, and Panteley Denev, “Characterization of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Fruits Extracts and Evaluation of Their in vitro Antioxidant Activity,” *J Pharmacogn Phytochem*, vol. 5, no. 2, pp. 35–38, 2016.
- [42] D. Mihaylova *et al.*, “Analysis of the GC-MS of volatile compounds and the phytochemical profile and antioxidant activities of some Bulgarian medicinal plants,” *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 74, no. 1–2, pp. 45–54, Dec. 2018, doi: 10.1515/znc-2018-0122.
- [43] Esfandiar Hassani Moghaddam and Mahdi Shaaban, “The Determination of Flavonoid Components, Total Phenolic Content, and Antioxidant Capacity in Dog Rose (*Rosa canina* L.) in Lorestan Province,” *Herbal Medicines Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 85–91, 2018.
- [44] C. Chrubasik, B. D. Roufogalis, U. Müller-Ladner, and S. Chrubasik, “A Systematic Review on the *Rosa canina* Effect and Efficacy Profiles,” *Phytotherapy Research*, vol. 22, no. 6, pp. 725–733, Apr. 2008, doi: 10.1002/ptr.2400.

- [45] A. Rajakaruna *et al.*, “Application of solvent pH under pressurized conditions using accelerated solvent extraction and green solvents to extract phytonutrients from wild berries,” *Food Biosci*, vol. 47, p. 101471, 2022, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101471.
- [46] Aurelia Cristina Nechifor, Mihaela Neagu, Daniela-Elena Pascu, and Gina Alina Traistaru, “Antioxidant Activities of Plants Extracts Produced by Microfiltration Process,” *Rev. Chim. (Bucharest)*, vol. 64, no. 3, pp. 238–241, 2013.
- [47] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, and A. R. C. Duarte, “Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century,” *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 2, no. 5, pp. 1063–1071, 2014, doi: 10.1021/sc500096j.
- [48] H. Vanda, R. Verpoorte, P. G. L. Klinkhamer, and Y. H. Choi, “Natural Deep Eutectic Solvents: From Their Discovery to Their Applications,” in *Deep Eutectic Solvents*, Wiley, 2019, pp. 61–81. doi: 10.1002/9783527818488.ch4.
- [49] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F. J. V. Gomez, and M. F. Silva, “Natural Designer Solvents for Greening Analytical Chemistry,” *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 126–136, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.11.006.
- [50] Karine De Oliveira Vigier and François Jérôme, “Synthesis and Properties,” in *Deep eutectic solvents: synthesis, properties, and applications*, 2020, pp. 1–23.
- [51] K. M. Jeong *et al.*, “Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products,” *J Clean Prod*, vol. 151, pp. 87–95, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.038.
- [52] A. Lakka *et al.*, “Saffron Processing Wastes as a Bioresource of High-Value Added Compounds: Development of a Green Extraction Process for Polyphenol Recovery Using a Natural Deep Eutectic Solvent,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 12, p. 586, Nov. 2019, doi: 10.3390/antiox8120586.
- [53] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S.-N. Chen, and G. F. Pauli, “Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives,” *J Nat Prod*, vol. 81, no. 3, pp. 679–690, 2018, doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
- [54] L. Wils, S. Hilali, and L. Boudesocque-Delaye, “Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What’s New in France?,” *Molecules*, vol. 26, no. 21, p. 6556, Oct. 2021, doi: 10.3390/molecules26216556.
- [55] A. Ali Redha, “Review on Extraction of Phenolic Compounds from Natural Sources Using Green Deep Eutectic Solvents,” *J Agric Food Chem*, vol. 69, no. 3, pp. 878–912, Jan. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.0c06641.
- [56] A. Tzani *et al.*, “Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs) as Alternative Green Extraction Media for Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe),” *Sustainable Chemistry*, vol. 2, no. 4, pp. 576–599, Oct. 2021, doi: 10.3390/suschem2040032.
- [57] A. Mišan *et al.*, “The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 60, no. 15, pp. 2564–2592, Aug. 2020, doi: 10.1080/10408398.2019.1650717.
- [58] Z. Yang, “Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology,” in *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*, 2018, pp. 31–59. doi: 10.1007/10_2018_67.
- [59] Andrea Škulcová and Michal Jablonský, “Properties and Thermal Behavior of Deep Eutectic Solvents based Lactic Acid,” *Journal of Hygienic Engineering and Design*, vol. 25, pp. 75–80, 2018.

- [60] C. Benoit, C. Virginie, and V. Boris, “The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry,” in *Advances in Botanical Research*, vol. 97, 2021, pp. 309–332. doi: 10.1016/bs.abr.2020.09.009.
- [61] Ashish Aswal, Mohini Kalra, and Abhiram Rout, “Preparation and evaluation of polyherbal cosmetic cream,” *Pharm Lett*, vol. 5, no. 1, pp. 83–88, 2013.
- [62] I. S. Mohammad *et al.*, “Phytocosmeceutical formulation development, characterization and its in-vivo investigations,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 107, pp. 806–817, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.024.
- [63] Janus P. F. Macedo *et al.*, “Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 7, pp. E146–E152, Mar. 2006.
- [64] A. Tzani *et al.*, “Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation,” *Sustainable Chemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 8–25, Dec. 2022, doi: 10.3390/suschem4010002.
- [65] S. Akbari, N. H. Abdurahman, R. M. Yunus, F. Fayaz, and O. R. Alara, “Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review,” *Biotechnology Research and Innovation*, vol. 2, no. 1, pp. 81–90, 2018, doi: 10.1016/j.biori.2018.09.001.
- [66] M. Soto, M. Parada, E. Falqué, and H. Domínguez, “Personal-Care Products Formulated with Natural Antioxidant Extracts,” *Cosmetics*, vol. 5, no. 1, p. 13, Jan. 2018, doi: 10.3390/cosmetics5010013.
- [67] A. P. Mishra, S. Saklani, L. Milella, and P. Tiwari, “Formulation and evaluation of herbal antioxidant face cream of *Nardostachys jatamansi* collected from Indian Himalayan region,” *Asian Pac J Trop Biomed*, vol. 4, no. 2, pp. S679–S682, Jul. 2014, doi: 10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0223.
- [68] Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, and W.-C. Ye, “Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review,” *Chin Med*, vol. 13, no. 1, p. 20, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [69] Mohammed Golam Rasul, “Extraction, Isolation and Characterization of Natural Products from Medicinal Plants,” *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*, vol. 2, no. 6, Dec. 2018.
- [70] H. Bart, “Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction,” in *Industrial Scale Natural Products Extraction*, Wiley, 2011, pp. 1–25. doi: 10.1002/9783527635122.ch1.
- [71] J. Chandrapala, C. M. Oliver, S. Kentish, and M. Ashokkumar, “Use of Power Ultrasound to Improve Extraction and Modify Phase Transitions in Food Processing,” *Food Reviews International*, vol. 29, pp. 67–91, 2013, doi: 10.1080/87559129.2012.692140.
- [72] Z. İlbay, S. Şahin, and Ş. İ. Kırbaşlar, “Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology,” *J Sci Food Agric*, vol. 93, no. 11, pp. 2804–2809, 2013, doi: 10.1002/jsfa.6104.
- [73] O. Kaltsa *et al.*, “A Green Extraction Process for Polyphenols from Elderberry (*Sambucus nigra*) Flowers Using Deep Eutectic Solvent and Ultrasound-Assisted Pretreatment,” *Molecules*, vol. 25, no. 4, p. 921, Feb. 2020, doi: 10.3390/molecules25040921.
- [74] M. Ivanović, M. Islamčević Razboršek, and M. Kolar, “Innovative Extraction Techniques Using Deep Eutectic Solvents and Analytical Methods for the Isolation and Characterization of Natural Bioactive Compounds from Plant Material,” *Plants*, vol. 9, p. 1428, Oct. 2020, doi: 10.3390/plants9111428.

- [75] T. J. Mason, F. Chemat, and M. Vinatoru, “The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves ,” *Curr Org Chem*, vol. 15, no. 2, pp. 237–247, 2011.
- [76] M. D. Esclapez, J. v. García-Pérez, A. Mulet, and J. A. Cárcel, “Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products,” *Food Engineering Reviews*, vol. 3, pp. 108–120, May 2011, doi: 10.1007/s12393-011-9036-6.
- [77] M. Llompart, C. Garcia-Jares, M. Celeiro, and T. Dagnac, “Microwave-Assisted Extraction ☆,” in *Encyclopedia of Analytical Science* , Third., Elsevier, 2019, pp. 67–77. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14442-7.
- [78] B. Socas-Rodríguez, M. V. Torres-Cornejo, G. Álvarez-Rivera, and J. A. Mendiola, “Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Compounds from Natural Sources and Agricultural By-Products,” *Applied Sciences*, vol. 11, p. 4897, May 2021, doi: 10.3390/app11114897.
- [79] L. Benvenuti, A. A. F. Zielinski, and S. R. S. Ferreira, “Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES?,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 90, pp. 133–146, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.06.003.
- [80] N. P. E. Hikmawanti, D. Ramadon, I. Jantan, and A. Mun'im, “Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development,” *Plants*, vol. 10, no. 10, p. 2091, Oct. 2021, doi: 10.3390/plants10102091.
- [81] J. Huang, X. Guo, T. Xu, L. Fan, X. Zhou, and S. Wu, “Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products,” *J Chromatogr A*, vol. 1598, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.046.
- [82] M. Xu, L. Ran, N. Chen, X. Fan, D. Ren, and L. Yi, “Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent,” *Food Chem*, vol. 297, p. 124970, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.124970.
- [83] S. Koutsoukos, T. Tsiaka, A. Tzani, P. Zoumpoulakis, and A. Detsi, “Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds,” *J Clean Prod*, vol. 241, p. 118384, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118384.
- [84] D. C. Murador, L. M. de Souza Mesquita, N. Vannuchi, A. R. C. Braga, and V. v de Rosso, “Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: advantages over conventional organic solvents,” *Curr Opin Food Sci*, vol. 26, pp. 25–34, 2019, doi: 10.1016/j.cofs.2019.03.002.
- [85] G.J. Park, “Design of experiments,” in *Analytic Methods for Design Practice*, 2007, pp. 309–391.
- [86] A. Dean, D. Voss, and D. Draguljić, “Response Surface Methodology,” in *Design and Analysis of Experiments*, 2017, pp. 565–614. doi: 10.1007/978-3-319-52250-0_16.
- [87] A. I. Khuri and S. Mukhopadhyay, “Response surface methodology,” *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*, vol. 2, no. 2, pp. 128–149, 2010, doi: 10.1002/wics.73.
- [88] K. Kandananond, “Using the Response Surface Method to Optimize the Turning Process of AISI 12L14 Steel,” *Advances in Mechanical Engineering*, vol. 2, p. 362406, 2010, doi: 10.1155/2010/362406.
- [89] I. Prgomet, B. Gonçalves, R. Domínguez-Perles, N. Pascual-Seva, and A. I. R. N. A. Barros, “A Box-Behnken Design for Optimal Extraction of Phenolics from Almond By-products,” *Food Anal Methods*, vol. 12, no. 9, pp. 2009–2024, 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01540-5.

- [90] B. Yang, M. Zhang, H. Weng, Y. Xu, and L. Zeng, "Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Kinsenoside Compound from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl by Response Surface Methodology (RSM)," *Molecules*, vol. 25, p. 193, 2020, doi: 10.3390/molecules25010193.
- [91] M. Mojaddam and K. Pullen, "Optimization of a Centrifugal Compressor Using the Design of Experiment Technique," *Applied Sciences*, vol. 9, no. 2, p. 291, Jan. 2019, doi: 10.3390/app9020291.
- [92] S. L. C. Ferreira *et al.*, "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods," *Anal Chim Acta*, vol. 597, pp. 179–186, 2007, doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.
- [93] R. F. Gunst and R. L. Mason, "Fractional factorial design," *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*, vol. 1, no. 2, pp. 234–244, Sep. 2009, doi: 10.1002/wics.27.
- [94] Rahul Mukerjee and C.F. Jeff Wu, "Two-Level Fractional Factorial Designs," in *A Modern Theory of Factorial Design*, 2006, pp. 49–84.
- [95] N. A. Butler, "Defining equations for two-level factorial designs," *J Stat Plan Inference*, vol. 138, pp. 3157–3163, 2008, doi: 10.1016/j.jspi.2008.01.002.
- [96] W. H. Wong *et al.*, "Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product," *Ind Crops Prod*, vol. 63, pp. 238–248, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.09.049.
- [97] W. Chen *et al.*, "The formation and physicochemical properties of PEGylated deep eutectic solvents," *New Journal of Chemistry*, vol. 43, pp. 8804–8810, 2019, doi: 10.1039/C9NJ02196E.
- [98] M. Jablonsky, V. Majova, K. Ondrigova, and J. Sima, "Preparation and characterization of physicochemical properties and application of novel ternary deep eutectic solvents," *Cellulose*, vol. 26, pp. 3031–3045, Feb. 2019, doi: 10.1007/s10570-019-02322-2.
- [99] T. Raja Sekharan, R. Margret Chandira, S.C. Rajesh, Shunmugaperumal Tamilvanan, CT. Vijayakumar, and B.S. Venkateswarlu, "pH, Viscosity of Hydrophobic Based Natural Deep Eutectic Solvents and the Effect of Curcumin Solubility in it," *Biointerface Res Appl Chem*, vol. 11, no. 6, pp. 14620–14633, Mar. 2021, doi: 10.33263/BRIAC116.1462014633.
- [100] T. Jurić, D. Uka, B. B. Holló, B. Jović, B. Kordić, and B. M. Popović, "Comprehensive physicochemical evaluation of choline chloride-based natural deep eutectic solvents," *J Mol Liq*, vol. 343, p. 116968, 2021, doi: 10.1016/j.molliq.2021.116968.
- [101] M. Q. Farooq, N. M. Abbasi, and J. L. Anderson, "Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography," *J Chromatogr A*, vol. 1633, p. 461613, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461613.
- [102] K. Mulia, E. Krisanti, F. Terahadi, and S. Putri, "Selected Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of α -Mangostin from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp," *International Journal of Technology*, vol. 7, pp. 1211–1220, 2015, doi: 10.14716/ijtech.v6i7.1984.
- [103] K. Haražna *et al.*, "Polyhydroxyalkanoate-derived hydrogen-bond donors for the synthesis of new deep eutectic solvents," *Green Chemistry*, vol. 21, no. 11, pp. 3116–3126, 2019, doi: 10.1039/C9GC00387H.
- [104] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology," *Anal Chim Acta*, vol. 766, pp. 61–68, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019.

- [105] E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent,” *Nat Protoc*, vol. 2, no. 4, pp. 875–877, Apr. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.102.
- [106] P. Matic, M. Sabljic, and L. Jakobek, “Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content,” *JAOAC Int*, vol. 100, no. 6, pp. 1795–1803, Nov. 2017, doi: 10.5740/jaoacint.17-0066.
- [107] K. Sirivibulkovit, S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, “Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis,” *Analytical Sciences*, vol. 34, pp. 795–800, Jul. 2018, doi: 10.2116/analsci.18P014.
- [108] I. G. Munteanu and C. Apetrei, “Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, p. 3380, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22073380.
- [109] “National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 247, Betaine. Retrieved February 3, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betaine>.”
- [110] “National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 750, Glycine. Retrieved February 3, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycine>.”
- [111] V. Macchioni, K. Carbone, A. Cataldo, R. Frascini, and S. Bellucci, “Lactic acid-based deep natural eutectic solvents for the extraction of bioactive metabolites of *Humulus lupulus* L.: Supramolecular organization, phytochemical profiling and biological activity,” *Sep Purif Technol*, vol. 264, p. 118039, 2021, doi: 10.1016/j.seppur.2020.118039.
- [112] C. Bakirtzi, K. Triantafyllidou, and D. P. Makris, “Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants,” *J Appl Res Med Aromat Plants*, vol. 3, pp. 120–127, 2016, doi: 10.1016/j.jarmap.2016.03.003.
- [113] “National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 612, Lactic Acid. Retrieved February 3, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>.”
- [114] M. X. Chen, K. S. Alexander, and G. Baki, “Formulation and Evaluation of Antibacterial Creams and Gels Containing Metal Ions for Topical Application,” *J Pharm (Cairo)*, vol. 2016, p. 5754349, 2016, doi: 10.1155/2016/5754349.
- [115] F. Rahmandari, F. Swastawati, and R. A. Kurniasih, “Quality Characteristics of Body Cream with the Addition of Gelatin from *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) Scales as an Emulsifier,” *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 750, no. 1, p. 012008, 2021, doi: 10.1088/1755-1315/750/1/012008.
- [116] C. Lynde *et al.*, “Skin Surface pH,” *J Drugs Dermatol*, vol. 18, no. 12, p. 214, Dec. 2019.