



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ
ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από τον φλοιό του ροδιού με χρήση περιβαλλοντικά φιλικών διεργασιών

Διπλωματική Εργασία



Αγγάνη Βασιλική

Επιβλέπων Καθηγητής: Επαμεινώνδας Βουτσάς

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούνιος 2023

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του καθηγητή Βουτσά Επαμεινώνδα. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας των πειραμάτων αλλά και της συγγραφής της εργασίας, πολλοί άνθρωποι συνέβαλαν καταλυτικά και θα ήθελα να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή, κύριο Βουτσά Επαμεινώνδα, που με εμπιστεύθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι επιστημονικές γνώσεις, οι εύστοχες παρατηρήσεις, η βοήθεια και η καθοδήγηση του από τα αρχικά στάδια μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωσή της εργασίας αυτής υπήρξαν πολύτιμες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Κωνσταντίνο Μπαμπαλιούτα όπου προσέφερε την απαραίτητα πρώτη ύλη, τα ρόδια αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις του και μπόρεσαν να γίνουν τα απαραίτητα πειράματα για την παρούσα διπλωματική.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη διδάκτορα Μπόλη Ελένη για την βοήθειά και την καθοδήγηση της στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς και ιδιαίτερα, τους υποψήφιους διδάκτορες Πρίνο Νίκο και Γεωργιοπούλου Ιουλία, για το φιλικό κλίμα και τις συμβουλές τους για την διεξαγωγή των πειραμάτων και των εγκλιματισμό μου στο χώρο του εργαστηρίου.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην μελέτη της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από φυτικά υλικά. Συχνά η μελέτη συνδυάζει και πράσινες μεθόδους εκχύλισης, όπως η εκχύλιση με μικροκύματα ή υπερήχους, που είναι πιο φιλικές για το περιβάλλον. Η ταυτόχρονη ανάγκη της βιομηχανίας, στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας, εντατικοποίησαν την έρευνα για αξιοποίηση παραπροϊόντων ή αποβλήτων για την ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών. Η γνωστοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων του χυμού του ροδιού, οδήγησε στην αυξημένη παραγωγή του και κατ' επέκταση την αύξηση των αποβλήτων από την βιομηχανία χυμοποίησης του ροδιού. Έτσι, μιας και ο φλοιός αποτελεί το 50 με 60% του συνολικού βάρους του ροδιού και είναι το κύριο απόβλητο της βιομηχανίας, η έρευνα για αξιοποίηση του έχει εντατικοποιηθεί. Επίσης, η ανάγκη για φυτικά αντιοξειδωτικά, μιας και αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικά από τα συνθετικά, έδωσε κίνητρο για την μελέτη εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού.

Οι Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs) είναι πράσινοι διαλύτες που σχηματίζονται από ένα δότη και ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των διαλυτών είναι ότι το σημείο τήξης του είναι πιο χαμηλό από ότι των συστατικών του. Οι DESs είναι φιλικό προς το περιβάλλον και συχνά τα συστατικά τους είναι από φυσικά συστατικά (Natural Deep Eutectic Solvents ή NADESs), είναι εύκολοι στην σύνθεση τους και οικονομικοί. Βιβλιογραφικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων, αφού συχνά αυξάνουν την απόδοση ή και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες. Η μελέτη των DESs είναι συνεχής, είτε για νέους συνδυασμούς δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου είτε για βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχοντων είτε για καινούργιες εφαρμογές.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού με την κλασική υγρή εκχύλιση και την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, με συμβατικούς διαλύτες και βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες. Στην κλασική εκχύλιση, οι διαλύτες που εξετάστηκαν είναι η αιθανόλη, το νερό και μίγματα αυτών με αναλογία 50-50% και 70-30% αντίστοιχα καθώς και οι πράσινοι διαλύτες χλωριούχος χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη με αναλογία 1:4 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/1,4 βουτανοδιόλη με αναλογία 1:4 κατά mole. Στην εκχύλιση με μικροκύματα εξετάστηκαν οι διαλύτες αιθανόλη- νερό (50%-50% κ.β.) και χλωριούχος χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη, που ήταν οι πιο αποτελεσματικοί στην κλασική εκχύλιση σε σύγκριση με τους συμβατικούς και DES διαλύτες αντίστοιχα.

Οι λειτουργικές παράμετροι που εξετάστηκαν είναι: (α) η θερμοκρασία, στην κλασική εκχύλιση για 50 και 70 °C και στην εκχύλιση με μικροκύματα σε εύρος 40-60 °C, (β) ο χρόνος, με εύρος 5-30 min στην εκχύλιση με μικροκύματα, ενώ στην κλασική έμεινε σταθερός 24h, (γ) ο λόγος διαλύτη/βιομάζα, όπου στην κλασική εκχύλιση ήταν 10:1 και 20:1, ενώ στην εκχύλιση με μικροκύματα είχε εύρος από 10:1 έως 30:1 και (δ) η ισχύς της εκχύλιση με μικροκύματα με εύρος 300-700W. Για όλα τα εκχυλίσματα μετρήθηκε η αντιοξειδωτική δράση (Antioxidant Capacity ή TEAC) και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content ή TPC).

Τα αποτελέσματα από την κλασική υγρή εκχύλιση έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και έχουν αντιοξειδωτική δράση. Τα βέλτιστα αποτελέσματα λήφθηκαν για εκχύλιση στους 50 °C, αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 10:1 και διαλύτη την

χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη. Μάλιστα τόσο το TEAC όσο και το TPC, αυξήθηκαν περίπου 40% χρησιμοποιώντας διαλύτη την χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη αντί του συμβατικού διαλύτη 50% αιθανόλη-50% νερό, που ήταν ο πιο αποτελεσματικός συμβατικός διαλύτης. Στην κλασική εκχύλιση παρατηρήθηκε πως για μικρότερη θερμοκρασία και λόγο διαλύτη / βιομάζα, δηλαδή 50 °C και αναλογία 10:1, λήφθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα TEAC και TPC για τον κάθε διαλύτη.

Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας ως διαλύτες το 50% αιθανόλη-50% νερό και την χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη, που έδωσαν την καλύτερα απόδοση στην κλασική εκχύλιση. Καλύτερα αποτελέσματα στην εκχύλιση με μικροκύματα λήφθηκαν με μείωση του λόγου διαλύτη/βιομάζα στο εύρος 10:1-30:1 και για τις κεντρικές συνθήκες της ισχύος, της θερμοκρασίας και του χρόνου. Οι βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ήταν τα 15 min, 500W, 50°C και 10:1. Η εκχύλιση με μικροκύματα χρησιμοποιώντας τον συμβατικό διαλύτη 50% αιθανόλη-50% νερό ήταν αποτελεσματικότερη σε σχέση με την κλασική εκχύλιση. Αντίθετα στην εκχύλιση με διαλύτη την χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη καλύτερα αποτελέσματα TEAC και TPC λήφθηκαν στην κλασική εκχύλιση.

Η προσθήκη αιθανόλης στην χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη με κατά βάρος αναλογία 30 και 70% αντίστοιχα, δεν επηρέασε τα αποτελέσματα της εκχύλισης με μικροκύματα, στην αναλογία διαλύτη προς βιομάζα 10:1. Αντίθετα στην αναλογία 20:1, η χρήση του, αύξησε τόσο το TEAC όσο και το TPC, σε σχέση με τα εκχυλίσματα με καθαρό διαλύτη χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη και 50% αιθανόλη-50% νερό. Οι υπόλοιπες παράμετροι έμειναν σταθερές, δηλαδή 15 min, 500W και 50°C.

Η χρήση των DESs, στην κλασική εκχύλιση φλοιών ροδιού έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από ότι οι συμβατικοί διαλύτες. Ειδικότερα η χρήση της χλωριούχου χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη είναι πολλά υποσχόμενη για μελλοντική μελέτη, μιας και αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση και την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων πάνω από 40% σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες. Τα βέλτιστα αποτελέσματα από όλα τα πειράματα είναι για το εκχύλισμα με διαλύτη την χλωριούχο χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη με κλασική εκχύλιση και συνθήκες 50°C και αναλογία 10:1, όπου η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε 952 mg Trolox/L και ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων 29704,7 mg GAE/L. Αν και ο συνδυασμός του DES με την μέθοδο της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα δεν έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την κλασική εκχύλιση, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για αναζήτηση άλλων DESs καθώς και βέλτιστων λειτουργικών παραμέτρων ή και το συνδυασμό με άλλη καινοτόμο μέθοδο εκχύλισης των φλοιών του ροδιού.

Λέξεις κλειδιά: βιοδραστικές ουσίες, αντιοξειδωτική δράση, εκχύλιση, φλοιός ροδιού, εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα, βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες

Abstract

In recent years, the scientific community has turned its interest in studying the extraction of high value-added bioactive ingredients from plant materials. Often, green extraction methods, which are more environmentally friendly, are studied, such as microwaved or ultrasound extraction. The simultaneous need of the industry, in the context of the circular economy, intensified the research on the utilization of by-products or wastes for the recovery of bioactive ingredients. The awareness of the beneficial properties of pomegranate led to increased production of pomegranate juice and consequently increased the wastes from the pomegranate juicing industry. Thus, since the peel constitutes 50 to 60 % of the total weight of pomegranate and is the main waste of the industry, research on its utilization has intensified. Also, the need for plant-based antioxidants, as they have proven to be more effective than synthetic ones, has motivated the study of extracting bioactive compounds from pomegranate peel.

Deep Eutectic Solvents (DESs) are green solvents formed by a hydrogen bond donor and a hydrogen bond acceptor. The main characteristic of these solvents is that their melting point is lower than that of their components. DESs are environmentally friendly and often their components are made from natural ingredients (Natural Deep Eutectic Solvents or NADESs), they are easy to synthesize and economical. They have been used in literature for the extraction of phytochemicals since they often increase the extraction efficiency and/or selectivity compared to conventional solvents. The study of DESs is ongoing, either for new combinations of hydrogen bond donors and acceptors or for optimization of existing ones or for new applications.

In the present work, the extraction of bioactive components from pomegranate peel was studied by solid – liquid extraction (SLE) and microwave-assisted extraction (MAE) with conventional solvents and deep eutectic solvents. In the SLE, were tested the solvents: ethanol, water and mixtures of them in the proportions of 50-50% and 70-30% respectively, and the green solvents: choline chloride/1,2 butanediol in a 1:4 molar ratio and choline chloride/1,4 butanediol in a 1:4 molar ratio. In MAE, the solvents ethanol- water (50%-50%) and choline chloride/1,2 butanediol were tested, which were the most effective in SLE extraction compared to conventional and DES solvents, respectively.

The functional parameters investigated were (a) temperature, in SLE for 50 and 70 °C and in MAE in the range of 40-60 °C, (b) time, with a range of 5-30 min in MAE, while in SLE it remained constant for 24 h, (c) solvent/biomass ratio, where in SLE it was 10: 1 and 20:1, while in MAE it had a range of 10:1 to 30:1, and (d) the power of microwave, with a range of 300-700W. Antioxidant capacity (TEAC) and total phenolic content (TPC) were measured for all extracts.

The results from the SLE showed that the extracts are rich in phenolic compounds and have high antioxidant activity. Optimal results were obtained for extraction at 50 °C temperature, solvent/biomass ratio 10:1 and solvent was choline chloride/1,2 butanediol. In fact, both TEAC and TPC were increased by 40% using choline chloride/1,2 butanediol chloride as solvent instead of the conventional 50% ethanol-50% water solvent, which was the most effective conventional solvent. In the classical extraction it was observed that for lower temperature and solvent/biomass ratio, which where 50 °C and 10:1, the best TEAC and TPC results were obtained for each solvent.

In MAE, the experiments were carried out using 50% ethanol-50% water and choline chloride /1,2 butanediol as solvents, which gave the best performance in SLE. Best results in microwave extraction were obtained by reducing the solvent/biomass ratio in the range of 10:1-30:1 and for the central conditions of power, temperature and time, which were 15 min, 500W and 50°C. Microwave assisted extraction using the conventional solvent 50% ethanol-50% water was more efficient than the SLE. On the other hand, in extraction with choline chloride/1,2 butanediol were obtained better TEAC and TPC results in SLE.

The mixture of ethanol with choline chloride/1,2-butenediol at a weight ratio of 30 and 70% respectively did not affect the results of MAE at a solvent to biomass ratio of 10:1. In contrast, at the 20:1 ratio, both TEAC and TPC increased, compared to the extracts with pure solvent choline/1,2 butanediol chloride and 50% ethanol-50% water. The other parameters were kept constant, which were 15 min, 500W and 50°C.

The use of DESs, in classical pomegranate peel extraction gave better results than conventional solvents. In particular, the use of choline chloride/1,2-butenediol is very promising for future studying since it increases the antioxidant activity and total phenolic compounds concentration by more than 40% compared to conventional solvents. The best results from all experiments are for the extract with choline chloride/1,2 butanediol as solvent with SLE and conditions, 50°C and solvent/biomass ratio 10:1, where the antioxidant activity was measured 952 mg Trolox/L and total phenolic compounds concentration 29704.7 mg GAE/L. Although the combination of DES with the microwave-assisted extraction method did not give better results compared to the SLE, further study to search for the optimal functional parameters and/or combination with other innovative method of pomegranate peel extraction is encouraging.

Keywords: bioactive compounds, antioxidant activity, extraction, pomegranate peel, microwave assisted extraction, deep eutectic solvents

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract	6
Πίνακας περιεχομένων.....	8
Ευρετήριο Εικόνων	10
Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	10
Ευρετήριο Πινάκων	12
Εισαγωγή	13
1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	15
1.1 Ο καρπός του ροδιού	15
1.1.1 Προέλευση	15
1.1.2 Παγκόσμια Παραγωγή.....	16
1.1.3 Άλλες χρήσεις- Εφαρμογές.....	17
1.2 Σύσταση φλοιού ροδιού και βιοδραστικότητα	18
1.2.1 Σύσταση φλοιού ροδιού.....	18
1.2.2 Βιοδραστικά συστατικά.....	20
1.2.3 Συγκέντρωση ολικού φαινολικού περιεχόμενου	23
1.2.4 Αντιοξειδωτική δράση.....	23
1.2.5 Βιολογική δράση	26
1.2.6 Οφέλη για την υγεία.....	26
1.3 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φλοιό ροδιού	26
1.3.1 Εκχύλιση Στερεού- Υγρού	27
1.3.2 Κλασική εκχύλιση	28
1.3.3 Εκχύλιση με πράσινους διαλύτες.....	30
1.3.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.....	34
1.3.5 Εναλλακτικοί μέθοδοι εκχύλισης φλοιών ροδιού	36
2 Πειραματικό Μέρος.....	37
2.1 Υλικά	37
2.2 Επεξεργασία φλοιού ροδιού	38
2.3 Σύνθεση DES.....	38
2.4 Διαδικασία εκχύλισης.....	39
2.4.1 Κλασική εκχύλιση	39
2.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.....	40

2.5	Πειραματικός σχεδιασμός.....	40
2.6	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης.....	41
2.7	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων	42
2.8	Μέτρηση πυκνότητας διαλύτη DES.....	43
2.9	Μέτρηση ιξώδους διαλύτη DES	44
3	Αποτελέσματα και συζήτηση μετρήσεων	44
3.1	Εισαγωγή	44
3.2	Κλασική Εκχύλιση (Maceration)	45
3.2.1	Κλασική Εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες	45
3.2.2	Κλασική Εκχύλιση με Βαθείς Ευτηκτικούς Διαλύτες (DESs)	55
3.2.3	Σύγκριση συμβατικών διαλυτών και DESs στην κλασική εκχύλιση.....	59
3.3	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.....	62
3.3.1	Αποτελέσματα εκχύλισης με μικροκύματα.....	62
3.3.2	Επίδραση παραμέτρων εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης.....	64
3.3.3	Μοντελοποίηση αντιοξειδωτικής δράσης και ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων για εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με διαλύτη 50% αιθανόλη- νερό.....	71
3.3.4	Σύγκριση με κλασική εκχύλιση.....	1
3.3.5	Επίδραση ανάμειξης αιθανόλης με ChCl-1,2 βουτανοδιόλη στην αντιοξειδωτική δράση και στην ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων	2
4	Συμπεράσματα	4
5	Προτάσεις για το μέλλον	6
	Παράρτημα Α: Χημικοί τύποι κύριων βιοδραστικών συστατικών του φλοιού του ροδιού.....	8
	Παράρτημα Β : Διαδικασία Χυμοποίησης Ροδιού	8
	Παράρτημα Γ : Κύρια συστατικά των DESs που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών	10
	Βιβλιογραφία.....	12

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Μέρη καρπού ροδιού [6].....	15
Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής για εφαρμογή αποβλήτων ροδιού σε βιοδιυλιστήριο για παραγωγή βιοαιθανόλης	18
Εικόνα 3: Δομή κύριων βιοδραστικών συστατικών του φλοιού του ροδιού: γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνη [35]	22
Εικόνα 4: Αντίδραση ελεύθερης ρίζας DPPH [42]	25
Εικόνα 5: Πορεία πειραματικής διαδικασίας	39
Εικόνα 6: Η χημική δομή των κύριων φαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται στον φλοιό του ροδιού: (α) γαλλικό οξύ, (β) καφεϊκό οξύ, (γ) χλωρογενικό οξύ, (δ) ελλαγικό οξύ, (ε) απιγενίνη, (στ) κερκετίνη, (ζ) πελαργονιδίνη, (η) κυανιδίνη, (θ) πουνικαλαγίνη, (ι) granatin A, (ια) granatin B.....	8
Εικόνα 7:Στάδια επεξεργασίας για την χυμοποίηση του ροδιού από την βιομηχανία	9
Εικόνα 8: Κύρια συστατικά των DESs για εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών	11

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη Αναφοράς Trolox	41
Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με την μέθοδο Folin – Ciocalteu.....	43
Διάγραμμα 3: Καμπύλη Αναφοράς γαλλικού οξέος προσαρμοσμένη για DES	43
Διάγραμμα 4:Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του νερού με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία.	48
Διάγραμμα 5: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 50% αιθανόλη-50% νερό με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία.....	48
Διάγραμμα 7: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλη με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία	49
Διάγραμμα 6: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 70% αιθανόλη-30% νερό με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία.....	49
Διάγραμμα 8: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα	50
Διάγραμμα 9: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 50% αιθανόλη-50% νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.....	50
Διάγραμμα 10: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 70% αιθανόλη-30% νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.....	51
Διάγραμμα 11: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.....	51

Διάγραμμα 12: Εξάρτηση απόδοσης εκχύλισης από ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη	53
Διάγραμμα 13: Εξάρτηση αντιοξειδωτικής δράσης από το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη	54
Διάγραμμα 14: Εξάρτηση ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων από το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη	54
Διάγραμμα 15: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 1 με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία	57
Διάγραμμα 16: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 2 με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία.	57
Διάγραμμα 17: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 1 με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.	58
Διάγραμμα 18: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 2 με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.	58
Διάγραμμα 19: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 10:1 και 50°C.	60
Διάγραμμα 20: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 20:1 και 50°C.	60
Διάγραμμα 21: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 10:1 και 70°C	61
Διάγραμμα 22 : Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 20:1 και 70°C.	61
Διάγραμμα 23: Επίδραση του χρόνου στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 50o C, 500W, 20:1	65
Διάγραμμα 24: Επίδραση της θερμοκρασίας στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 500W, 20:1	65
Διάγραμμα 25: Επίδραση της ισχύος στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 50oC, 20:1	66
Διάγραμμα 26: Επίδραση της αναλογίας διαλύτη/βιομάζα στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 500W, 50oC	66
Διάγραμμα 27: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην αντιοξειδωτική δράση για διαλύτη 50% EthOH-W	67
Διάγραμμα 28 :Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για διαλύτη 50% EthOH-W	67
Διάγραμμα 29: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην αντιοξειδωτική δράση για διαλύτη DES 1.....	68
Διάγραμμα 30: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για διαλύτη DES 1.....	68

Διάγραμμα 31: Σχέση πειραματικών τιμών TPC και τιμών από την πρόβλεψη του μοντέλου και η κανονική κατανομή των τιμών	74
Διάγραμμα 32 Σχέση πειραματικών τιμών TEAC και τιμών από την πρόβλεψη του μοντέλου και η κανονική κατανομή των τιμών	74
Διάγραμμα 33: 3D απεικόνιση της εξάρτησης του TEAC από της θερμοκρασίας και τον λόγο διαλύτη/βιομάζα	75
Διάγραμμα 34: 3D απεικόνιση της εξάρτησης του TEAC από της θερμοκρασίας και τον λόγο διαλύτη/βιομάζα	0

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Σύγκριση απόδοσης φλοιού και χυμού ροδιού	16
Πίνακας 2: Σύσταση φλοιών ροδιού [29-31].....	19
Πίνακας 3: Περιεκτικότητα φλοιών ροδιού σε ανόργανα στοιχεία[29-31]	19
Πίνακας 4: Περιεκτικά φλοιού ροδιού στις κύριες υποομάδες των βιοδραστικών συστατικών [5, 6, 33].....	21
Πίνακας 5: Σύγκριση κύριων βιοδραστικών συναρτήσει της έκθεσης του ροδιού στον ήλιο	21
Πίνακας 6: Αντιοξειδωτική δράση συστατικών φλοιού ροδιών	24
Πίνακας 7: Παραδείγματα κλασικής εκχύλισης φλοιών ροδιού	29
Πίνακας 8: Κατηγοριοποίηση DESs	31
Πίνακας 9: Παράδειγμα εκχυλίσεων φλοιού ροδιού με DESs και ιδιότητες τους	33
Πίνακας 10: Παραδείγματα εκχύλισης φλοιού ροδιού υποβοηθούμενη από μικροκύματα .	35
Πίνακας 11: Παραδείγματα εκχύλισης ροδιού υποβοηθούμενη από υπερήχους	37
Πίνακας 12: Λίστα υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων	38
Πίνακας 13: Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες	46
Πίνακας 14: Αντιοξειδωτική δράση IC50 και ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για συγκέντρωση δείγματος 500 mg _{extract} /L _{solvent}	52
Πίνακας 15: Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με DESs.....	56
Πίνακας 16: Ιξώδη και πυκνότητες των ChCl-1,2butanediol και ChCl-1,4butanediol[64, 94].	56
Πίνακας 17: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων κλασικής εκχύλισης	59
Πίνακας 18 :Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα με διαλύτη 50% EthOH-W και ChCl-1,2butanediol	63
Πίνακας 19: Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και μετρήσεις της ακρίβειας πρόβλεψης του μοντέλου	72
Πίνακας 20 :Σύγκριση εκχυλισμάτων με διαλύτη 50% EthOH-W σε κλασική εκχύλιση με ανάδευση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα.....	1
Πίνακας 21: Σύγκριση εκχυλισμάτων με διαλύτη DES 1 σε κλασική εκχύλιση με ανάδευση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα	2
Πίνακας 22: Ιξώδες και πυκνότητα καθαρής χλωριούχος χολίνη 1,2 βουτανοβιόλη και με μίξη με 30% κατά βάρος αιθανόλη	2
Πίνακας 23: Σύγκριση πειραμάτων με διαλύτες DES 1 και 50% EthOH-W καθώς και ανάμιξη DES 1 με αιθανόλη τόσο για συμβατική όσο και εκχύλιση με μικροκύματα.....	3

Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν ενταθεί οι προσπάθειες για αποβολή του γραμμικού μοντέλου ανάπτυξης και για υιοθέτηση του κυκλικού μοντέλου. Στην κυκλική οικονομία, κύριος άξονας είναι η μείωση κατανάλωσης φυσικών πόρων και η επαναχρησιμοποίηση και η αξιοποίηση των απορρίψεων ή μη χρήσιμων προϊόντων. Η βιομηχανία για να μπορεί να συμβαδίσει με τις επιταγές της εποχής αλλά και για να πληρεί τις νομικές προϋποθέσεις της χώρας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έχει στραφεί στην εφαρμογή μεθόδων κυκλικής οικονομίας και προστασίας του περιβάλλοντος.

Ακόμη, η τάση της νέας εποχής, είναι η επαγρύπνηση των καταναλωτών ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες. Οι νέοι καταναλωτές τείνουν να αναζητούν την επίδραση της κατανάλωσης διαφόρων τροφών στην υγεία. Έτσι η κατανάλωση υπερτροφών, πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ενώσεις, έχει αυξηθεί ραγδαία. Ακόμη, έχει αυξηθεί η ζήτηση για προϊόντα εμπλουτισμένα με βιταμίνες, πρωτεΐνες και φυτικές ίνες καθώς και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής.

Η αύξηση της ζήτησης για κατανάλωση υπερτροφών παράλληλα με τις αποδεδειγμένες ευεργετικές ιδιότητες του χυμού του ροδιού, οδήγησαν στην αύξηση της παραγωγής ροδιών αλλά και την αύξηση των βιομηχανιών χυμοποίησης του ροδιού. Αν και ο χυμός του ροδιού είναι πλούσιος σε αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, από την διαδικασία της χυμοποίησης το απόβλητο είναι περίπου 50-60% της συνολικής ποσότητας. Στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και για να μην απορρίπτεται τόση ποσότητα αποβλήτων είτε στο ΧΥΤΑ, είτε να κομποστοποιείται, μελετήθηκε η αξιοποίηση του.

Σύμφωνα με έρευνες, ο φλοιός του ροδιού έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων, καθώς και εκχυλίσματα του έχουν αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Έχει εξεταστεί ακόμα και η εφαρμογή των εκχυλισμάτων αυτών ως συντηρητικά και πρόσθετα τροφίμων καθώς και στην φαρμακευτική και στην κοσμητολογία, για την παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής, κρεμών και αντηλιακών. Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών από τον φλοιό του ροδιού έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα, ως προς τις συνθήκες και μέθοδο εκχύλισης αλλά και την σταθερότητα των βιοδραστικών συστατικών στο εκχύλισμα. Επίσης πολύ σημαντικός παράγοντας είναι ο διαλύτης της εκχύλισης να είναι τέτοιος ώστε να πληρεί τις προϋποθέσεις για χρήση του εκχυλίσματος σε τρόφιμα, καλλυντικά και φάρμακα. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση νέων πράσινων μεθόδων εκχύλισης, όπως είναι η χρήση πράσινων διαλυτών, όπως είναι οι Βαθείς Ευτηκτικούς Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs), οι οποίοι είναι φιλικό προς το περιβάλλον και η διεξαγωγή εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, μέθοδος που είναι ενεργειακά αποδοτικότερη από την κλασική εκχύλιση, καθώς και ο συνδυασμός αυτών.

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η εκχύλιση φλοιών ροδιού με κλασική υγρή εκχύλιση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Ακόμη, έγινε χρήση νέων πράσινων διαλυτών, των Βαθών Ευτηκτικών Διαλυτών (Deep Eutectic Solvents ή DESs), οι οποίοι είναι μη τοξικοί, βιοδιασπώμενες οργανικές ενώσεις, με χαμηλό κόστος και εύκολοι στην σύνθεσή τους. Η χρήση τέτοιων διαλυτών επιτυγχάνουν μία γρήγορη και ενεργειακά αποδοτική εκχύλιση φυτοχημικών προϊόντων, είναι φιλικό προς το περιβάλλον και έχουν βελτιωμένη επιλεκτικότητα.

Για κάθε μέθοδο εκχύλισης μελετήθηκαν διάφοροι παράμετροι, όπως η θερμοκρασία, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη και ο διαλύτης στην κλασική εκχύλιση και η θερμοκρασία, η ισχύς, η αναλογία βιομάζας/ διαλύτη, ο χρόνος εκχύλισης και ο διαλύτης στην εκχύλιση με μικροκύματα. Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν με βάση την αντιοξειδωτική τους δράση και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, για τους συμβατικούς διαλύτες νερό, αιθανόλη και τα μίγματα αυτών με κατά βάρος αναλογία 50% και 70% αιθανόλη καθώς και τους βαθείς ευτηκτικούς διαλύτες χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη 1:4 κατά mol και χλωριούχος χολίνη/ 1,4 βουτανοδιόλη 1:4 κατά mol. Τέλος έγινε μίξη του διαλύτη DES, χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη με αιθανόλη σε αναλογία 30% κατά βάρος και διεξήχθησαν πειράματα σε εκχύλιση με μικροκύματα στις βέλτιστες συνθήκες καθώς και μετρήθηκε και η πυκνότητα και το ιξώδες.

1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.1 Ο καρπός του ροδιού

1.1.1 Προέλευση

Το ρόδι (*Punica granatum L.*) είναι γνωστό φρούτο από την αρχαιότητα σε λαούς κυρίως της Μεσογείου. Εκτός από την κατανάλωση του ως φρούτο ή ως χυμός, είναι γνωστό για τις θεραπευτικές του ιδιότητες ήδη από την αρχαιότητα. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι και Έλληνες, όπως ο Ιπποκράτης και ο Διοσκουρίδης, χρησιμοποιούσαν εκχυλίσματα από τις ρίζες της ροδιάς για να αντιμετωπίσουν φλεγμονές στο δέρμα και στα μάτια και να αντιμετωπίσουν πόνους στα αυτιά και το στομάχι. Ακόμα άλλοι λαοί χρησιμοποιούσαν τα εκχυλίσματα πλούσια σε ταννίνες για να αναστείλουν την αιμορραγία και την διάρροια αλλά και ως τσάι για να θεραπεύσουν τη βρογχίτιδα. Σήμερα γνωρίζοντας την περιεκτικότητα του ροδιού σε πολυφαινόλες, όπως είναι το ελλαγικό οξύ και η πουνικαλαγίνη, και την αντιοξειδωτική του δράση, μπορεί το ρόδι να χρησιμοποιηθεί για την μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών νόσων καθώς και του κινδύνου καρκίνου. [1] [2]

Αν και το ρόδι συσχετίζεται με την κουλτούρα των λαών της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, η προέλευση του ροδιού φημολογείται πως είναι το Ιράν. Μετέπειτα εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο αλλά κυρίως σε μεσογειακές χώρες λόγω του κλίματος τους με δροσερούς χειμώνες και ζεστά καλοκαίρια. Αν και η ροδιά μπορεί να καλλιεργηθεί σε τροπικά και υποτροπικά μέρη, είναι ευαίσθητη στις καιρικές συνθήκες, όπως η ξηρασία, οι έντονες βροχοπτώσεις ή ο καύσωνας. [1] [2]

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 500 ποικιλίες/είδη ροδιού. Ακόμα και με τον ίδιο γονότυπο, τα χαρακτηριστικά του φρούτου διαφοροποιούνται ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας του. Μερικά χαρακτηριστικά είναι το μέγεθος του φρούτου, το χρώμα του φλοιού, το χρώμα του καρπού (αριλίων), η σκληρότητα του σπόρου, η περιεκτικότητα σε χυμό και η γλυκύτητα ή η οξύτητα.[2]



Εικόνα 1: Μέρη καρπού ροδιού [6]

Ο καρπός του ροδιού έχει σφαιρικό σχήμα και αποτελείται από πολυάριθμα με βαθύ κόκκινο χρώμα αρίλια (arils) τα οποία περικλείονται από γυαλιστερό, δερμάτινο περικάρπιο και το φλοιό (rind/skin/peel). [3] Το βρώσιμο κομμάτι του φλοιού αποτελεί περίπου το 40% ενώ το υπόλοιπο 60% είναι ο φλοιός (50%) και τα σπόρια (10%) τα οποία θεωρούνται ότι περιέχουν περισσότερα βιοδραστικά συστατικά από ότι ο χυμός του ροδιού. [4] [5]

Στον Πίνακα 1 φαίνεται η σύγκριση της απόδοσης της εκχύλισης, των συνολικών φαινολικών ενώσεων, της συγκέντρωσης φλαβονοειδών, προανθοκυανιδών και ασκορβικού οξέος, για χυμό ροδιού και φλοιό. Από τον Πίνακα 1 είναι φανερό πως ο φλοιός του ροδιού περιέχει περισσότερα βιοδραστικά συστατικά από ότι ο χυμός. [5, 6]

Πίνακας 1: Σύγκριση απόδοσης φλοιού και χυμού ροδιού

Εκχυλίσματα	Απόδοση (%)	TPC (mg/g)	Φλαβονοειδή (mg/g)	Προανθοκυανίνες (mg/g)	Ασκορβικό οξύ (mg/g)	TPC (mg/L)	FRAP-TEAC (mmol/L)
Χυμός	14,5±1,7	24,4±2,7	17,2±3,3	5,3±0,7	0,85±0,02	2015,2±21,6 - 5186,0±172.5	30,5± 0,2- 107,9±3,4
Φλοιός	31,5±3,0	249,4±17,2	59,1±4,8	10,9±0,5	0,99±0,02	11856,3±2810	1951±48,4

Η συνολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (TPC) του πίνακα 1 Πίνακας 1, έχει μετρηθεί σύμφωνα με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και είναι εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η μέθοδος έχει αναλυθεί περαιτέρω στην Παράγραφο 1.2.3. Η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε με δύο μεθόδους για μεγαλύτερη αξιοπιστία του αποτελέσματος και εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox. Η μέθοδος μέτρησης TEAC, μετρά την ικανότητα απορρόφησης ριζών των φυτικών εκχυλισμάτων με την μείωση της ρίζας DPPH. Αναλυτικά έχει παρουσιαστεί η μέθοδος στην Παράγραφο 1.2.4.3. Η δοκιμασία FRAP (σιδηρούχος αναγωγική αντιοξειδωτική δύναμη), μετρά τα αντιοξειδωτικά μέσω της αναγωγής τους σε μια οξειδοαναγωγική χρωματομετρική αντίδραση. [6]

Να σημειωθεί ότι οι πρώτες στήλες αφορούν για εκχύλιση με αιθανόλη με απλή διαβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι τελευταίες δυο στήλες αφορούν άλλη μελέτη, όπου τα συνολικά φαινολικά και η αντιοξειδωτική δράση για τον χυμό μετρήθηκε για 3 διαφορετικές πιέσεις κατά την χυμοποίηση (10bar-250bar).

1.1.2 Παγκόσμια Παραγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες που αναδεικνύουν τις φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού μιας και έχουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, κατά του διαβήτη, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές και αντιθρομβωτικές δράσεις. [3] Ως αποτέλεσμα η παγκόσμια κατανάλωση, ζήτηση και παραγωγή ροδιού έχει αυξηθεί ραγδαία. Οι κύριες χώρες-παραγωγοί ροδιού είναι: Ινδία, Ιράν, Τουρκία, Κίνα, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, Ισραήλ, Αίγυπτος, Ισπανία, Αφγανιστάν, Τυνησία, Αζερμπαϊτζάν, Μαρόκο, Αργεντινή, Βραζιλία, Χιλή, Περού, Νότια Αφρική, Αυστραλία και Ιταλία. Η ετήσια παραγωγή ροδιού εκτιμάται στα 3,8 εκατομμύρια τόνους για το 2017. Η παραγωγή αυξήθηκε τα τελευταία χρόνια όμως η παραγωγικότητα των δέντρων είναι μικρότερη λόγω των καιρικών

συνθηκών. Πολλές φορές επίσης αντιμετωπίζουν και προβλήματα ποιότητας του φρούτου. [1] [2]

Μαζί με την αύξηση της καλλιέργειας ροδιού αυξήθηκαν ραγδαία και οι απαιτήσεις για χυμό ροδιού, ειδικότερα τα τελευταία χρόνια που έχουν γίνει γνωστά τα οφέλη για την υγεία. Από την βιομηχανία παραγωγής χυμού ροδιού παράγεται μεγάλος όγκος αποβλήτων όπως ο φλοιός, τα φύλλα και υγρά απόβλητα από την διαδικασία χυμοποίησης, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, στο Παράρτημα Β. Ο φλοιός του ροδιού αποτελεί το 40-50% του συνολικού βάρους του φρούτου και ως απόβλητο από την βιομηχανία παράγεται από τον αρχικό διαχωρισμό (ξεφλούδισμα) του φρούτου καθώς και μετά την διαδικασία της χυμοποίησης. Το παραπροϊόν αυτό είτε κομποστοποιείται είτε χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή, με περιορισμένη όμως χρήση. Απόβλητα με υψηλά επίπεδα πολυφαινόλων, όπως είναι ο φλοιός του ροδιού, μπορούν να προκαλέσουν οικολογικά προβλήματα λόγω του φαινομένου της φυτοτοξικότητας. [7]

Παγκοσμίως, κυρίως από τις βιομηχανίες χυμών, παράγονται περίπου 1,62 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων (συμπεριλαμβανομένων των φλοιών) από το σύνολο των 3 εκατομμυρίων τόνων ροδιών που παράγονται ετησίως. [8] Στα πλαίσια της εποχής, για αξιοποίηση των αποβλήτων και της κυκλικής οικονομίας, αλλά και επειδή έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση των πολυφαινόλων στο φλοιό του ροδιού είναι 10 φορές μεγαλύτερη από ότι στο χυμό του, καθίσταται αναγκαία η αξιοποίηση του είτε ως φυσικό πρόσθετο σε φαγητά είτε σε φάρμακα και σε καλλυντικά. [7]

1.1.3 Άλλες χρήσεις- Εφαρμογές

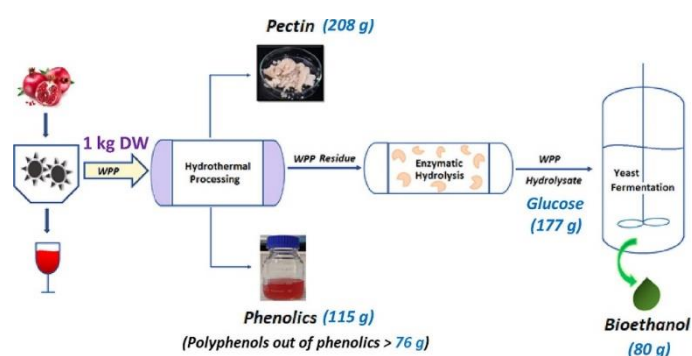
Εκχυλίσματα από το φλοιό του ροδιού και των λουλουδιών του έχουν χρησιμοποιηθεί ως βαφές σε υφάσματα αλλά και ως κύρια πηγή για το μελάνι στην Ευρώπη τον Μεσαίωνα. Ακόμα και σήμερα πολλά μελάνια χειροτεχνίας εξακολουθούν να δημιουργούνται από εκχυλίσματα ροδιού. Τέλος οι ταννίνες που παράγονται από το φλοιό του ροδιού βοήθησαν στη δημιουργία του μαροκινού δέρματος. [1]

Λόγω της πληθώρας αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του φλοιού του ροδιού, εκχυλίσματα αυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλά τρόφιμα και συμπληρώματα διατροφής ως συντηρητικά, σταθεροποιητές, προβιοτικά ή ως ενισχυτικά ποιότητας. [3] Για παράδειγμα έχει χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό σε κατεψυγμένα προϊόντα, σε ψάρι και χοιρινό αλλά και σε διάφορες σάλτσες. Ως πρόσθετο έχει χρησιμοποιηθεί σε φρεσκοκομμένα φρούτα και λαχανικά και μπαχαρικά, τσάι για να αυξηθεί η αντιοξειδωτική τους δράση. Τέλος χρησιμοποιείται και ως τρόφιμο σε υγιεινά ροφήματα, πρωτεϊνούχα προϊόντα και ροφήματα με χαμηλό σε λιπίδια, κατάλληλο για διαβητικούς. [9]

Λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης, το εκχύλισμα από φλοιό ροδιού έχει χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε προϊόντα όπως είναι το γάλα, το ηλιέλαιο, το ιχθυέλαιο, το μαγειρεμένο κοτόπουλο, το βόειο κρέας και το γιαούρτι. [10-15] Σε παγωτό και πραλίνα φουντουκιού έχει προστεθεί ενθυλακωμένο εκχύλισμα από φλοιό ροδιού για την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης τους. [16, 17] Για την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση του το εκχύλισμα από φλοιό ροδιού έχει προστεθεί σε κοτόπουλο, λουκάνικο Φρανκφούρτης, βόειο κρέας, γαρίδες, μαρμαροκυπρίνο, τυρόπηγμα και σε σκόνη γιαουρτιού. [18-24] Τέλος συχνά χρησιμοποιείται

και στην φαρμακευτική, κυρίως για παθήσεις του δέρματος όπως εγκαύματα από τον ήλιο και απολέπιση του προσώπου αλλά και σε αντιγηραντικές κρέμες και σαμπουάν.

Αν και συχνά ο φλοιός του ροδιού διαχειρίζεται ως απόβλητο και είτε κομποστοποιείται είτε απορρίπτεται, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή ειδικότερα στα πρόβατα, μιας και ενισχύει τη μικροβιακή σύνθεση των πρωτεϊνών στο στομάχι και αυξάνει την περιεκτικότητα πρωτεΐνης του παραγόμενου γάλακτος. [25] Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοαιθανόλης. [26] Μάλιστα έχει προταθεί ένα ολοκληρωμένο βιοδιυλιστήριο, που περιέχει υδροθερμική επεξεργασία φλοιών ροδιού (Εικόνα 2). Μέσω της υδροθερμικής επεξεργασίας, στους 115 °C για 40 λεπτά με αναλογία υγρού-στερεού 10:1, ανακτάται πηκτίνη (18,8-20,9%) παρόμοια με την εμπορική, και φαινολικά (10,6-11,8%), χωρίς χρήση οξέων ή οργανικών διαλυτών. Ειδικότερα, τα ανακτώμενα φαινολικά περιέχουν περίπου 60% πουνικαλαγίνη, βιοδραστικό συστατικό όπου είναι υπεύθυνο κατά κύριο λόγο για την αντιοξειδωτική δράση του φλοιού του ροδιού. Έπειτα με ενζυμική υδρόλυση και ζύμωση παράγεται βιοαιθανόλη με απόδοση περίπου 88%. [27] Τέλος ο φλοιός του ροδιού μπορεί, αφού μετατραπεί σε ενεργό άνθρακα με θερμική κατεργασία, να χρησιμοποιηθεί ως προσροφητικό βαρέων μετάλλων από υγρά απόβλητα, όπως χαλκό, μόλυβδο, νικέλιο, ψευδάργυρο.[28]



Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής για εφαρμογή αποβλήτων ροδιού σε βιοδιυλιστήριο για παραγωγή βιοαιθανόλης

1.2 Σύσταση φλοιού ροδιού και βιοδραστικότητα

1.2.1 Σύσταση φλοιού ροδιού

Ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε παλυφαινόλες, και φυτικές ίνες, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, όπως είναι η λυσίνη, λευκίνη και αρωματικά λιπαρά οξέα (φαινυλαλανίνη και τυροσίνη), θρεονίνη και βαλίνη. [29]

Πίνακας 2: Σύσταση φλοιών ροδιού [29-31]

Συστατικό	Περιεκτικότητα (g/100 g ξηρής ουσίας)
Υγρασία	4,00-13,70
Ίνες	11,22-21,60
Τέφρα	3,30-5,00
Πρωτεΐνες	3,10-8,72
Λίπη	1,30-9,40
Υδατάνθρακες	31,38-76,40

Ακόμη ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνη C, βιταμίνη K, το κάλιο και φυλλικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα είναι καλή πηγή βιταμινών καθώς περιέχει βιταμίνη B1 (θειαμίνη), B2 (ριβοφλαβίνη), C (L-ασκορβικό οξύ), E (α-τοκοφερόλη) και A (ρετινόλη) με σύσταση 0,123, 0,07, 12,90, 3,99, 0,164 mg/100 g ξηρής ουσίας αντίστοιχα. [29] Τέλος περιέχει και ανόργανα στοιχεία με κυρίαρχα να είναι το κάλιο, το ασβέστιο, ο φωσφόρος και το νάτριο.

Πίνακας 3: Περιεκτικότητα φλοιών ροδιού σε ανόργανα στοιχεία[29-31]

Στοιχείο	Περιεκτικότητα (mg/100 g ξηρής ουσίας)
Ca	104,60-338,50
K	146,40-1000,00
Na	66,43-110,00
P	117,90
Fe	5,93-47,46
Zn	1,01-1,80
Co	0,60
Se	1,03
Cu	4,69
Mg	32,33
Mn	0,80
Cu	0,60

1.2.2 Βιοδραστικά συστατικά

1.2.2.1 Γενικά

Βιοδραστικά συστατικά είναι τα συστατικά των τροφίμων, όπως στα φρούτα, λαχανικά, καρπούς, έλαια και σιτηρά και δρουν στο ανθρώπινο σώμα ώστε να συμβάλλουν στη βελτίωση της υγείας. Οι βιοδραστικές ουσίες απαντώνται σε μικρές ποσότητες αλλά διαφέρουν από τα θρεπτικά συστατικά μιας και ακόμα δεν υπάρχουν συνιστώμενες τιμές ημερήσιας πρόσληψης.

Μέσα από έρευνες που έχουν γίνει τόσο σε ζώα, αλλά και κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν πως τα βιοδραστικά συστατικά ενισχύουν τον ανθρώπινο οργανισμό βελτιώνοντας την λειτουργία των συστημάτων του μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών. Τα βιοδραστικά συστατικά συνήθως έχουν αντιοξειδωτική δράση όμως μπορεί να έχουν και αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση, προστατεύουν συχνά από καρδιακές παθήσεις και ενισχύουν την επούλωση. [32] Λόγω των ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, αλλά και σε εξελιγμένα βιοτεχνολογικά καλλυντικά .

Οι κύριες κατηγορίες βιοδραστικών συστατικών είναι οι γλυκοζίτες, τα φαινολικά οξέα, τα οποία περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τις ανθοκυανίνες και τις ταννίνες, τις λιγνάνες και τα αλκαλοειδή.

Η σύσταση των βιοδραστικών συστατικών στα εκχυλίσματα φλοιών ροδιού μπορεί να διαφέρουν ανάλογα ναι την μέθοδο εκχύλισης, τις συνθήκες ή και τον διαλύτη αλλά ακόμα σημαντικό ρόλο στην σύσταση τους παίζει όχι μόνο η ποικιλία ροδιού αλλά και οι διαφορετικές εδαφοκλιματικές συνθήκες καλλιέργειας. [4]

Τα πιο κοινά βιοδραστικά συστατικά του ροδιού είναι οι ανθοκυανίνες και οι υδρολειωμένες ταννίνες και πιο συγκεκριμένα οι ελλαγιταννίνες, τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες και τα φαινολικά οξέα. Το κύριο βιοδραστικό του φλοιού του ροδιού είναι η πουνικαλαγίνη που αποτελεί και το 85% των συνολικών ταννινών στον φλοιό.[4]

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στα φυτά για την άμυνα τους απέναντι σε θηρευτές, ακτινοβολία και παθογενείς οργανισμούς. Χαρακτηρίζονται ανάλογα με την θέση του αρωματικού δακτυλίου συνδεδεμένου με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα.[4]

1.2.2.2 Βιοδραστικά συστατικά στον φλοιό ροδιού

Όπως έχει αναφερθεί ανάλογα με την ποικιλία και τον τρόπο εκχύλισης του φλοιού του ροδιού αλλάζει και η ποσότητα των βιοδραστικών συστατικών που ανακτώνται. Στο εκχύλισμα από τον φλοιό του ροδιού ανιχνεύθηκαν 48 φαινολικές ενώσεις, που χαρακτηρίστηκαν με HPLC-DAD-ESI/MSⁿ και ταυτοποιήθηκαν με UV spectra 9 ανθοκυανίνες, 2 γαλλοταννίνες, 22 ελλαγιταννίνες, 2 γαλλαγυλεστέρες, 4 υδροξυβενζοϊκά οξέα, 7 υδροξυκιναμωμικά οξέα και 1 διυδροφλαβονόλη. [6]

Πίνακας 4: Περιεκτικά φλοιού ροδιού στις κύριες υποομάδες των βιοδραστικών συστατικών [5, 6, 33]

Συστατικά	(mg GAE/g)
Ολικά Φαινολικά	249-299
Φλαβονοειδή	49,8-59,1
Προανθοκυανιδίνες	10,9-14
Ταννίνες	422-499

Τα κύρια βιοδραστικά συστατικά είναι η πουνικαλαγίνη, το ελλαγικό οξύ, το γαλλικό οξύ και η κατεχίνη.

Πιο συγκεκριμένα εκχυλίσματα από φλοιό ροδιού περιέχουν φαινολικά οξέα όπως χλωρογενικό, καφεϊκό, συριγγικό, συναπικό, p-κουμαρικό, φερουλικό, βανιλικό, ελλαγικό, γαλλικό και κινναμικό οξύ. Η συγκέντρωση σε ελλαγικό οξύ στα εκχυλίσματα ποικίλει από 0,35 έως 201,3 mg/g dry weight, το γαλλικό οξύ από 1,24 έως 32,6 mg/g dry weight και το καφεϊκό οξύ από 0,21 έως 22,7 mg/g dry weight. Τα υπόλοιπα βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις της τάξης του 0,1-1 mg/g dry weight. Η συνολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (TPC) σε εκχυλίσματα εκφράζεται συνήθως σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και έχει εύρος 10,96-841,5 mg GAE/g dry weight και υπολογίζεται ότι είναι 4 φορές μεγαλύτερο από ότι στα σπόρια ενώ είναι 10 με 25 φορές μεγαλύτερη από το χυμό του ροδιού. [3] Εκτός από την ποικιλία του ροδιού και την περιοχή καλλιέργειας του, έχει διαπιστωθεί πως και η έκθεση του φρούτου στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα του φλοιού σε συνολικό φαινολικό φορτίο όπως φαίνεται στον πίνακα 5 παρακάτω.[30]

Πίνακας 5: Σύγκριση κύριων βιοδραστικών συναρτήσεων της έκθεσης του ροδιού στον ήλιο

Φλοιός ροδιού	Συνολικές φαινόλες (mg EHHDP-G/g)	Προανθοκυανιδίνη (mg CE/g)	Ανθοκυανιδίνη (mg/g)
Σε σκιά	176,7 ± 1,2	55,4 ± 3,0	0,52 ± 0,02
Εκτεθειμένη στο ήλιο	85,8 ± 2,7	34,4 ± 2,7	1,03±0,03

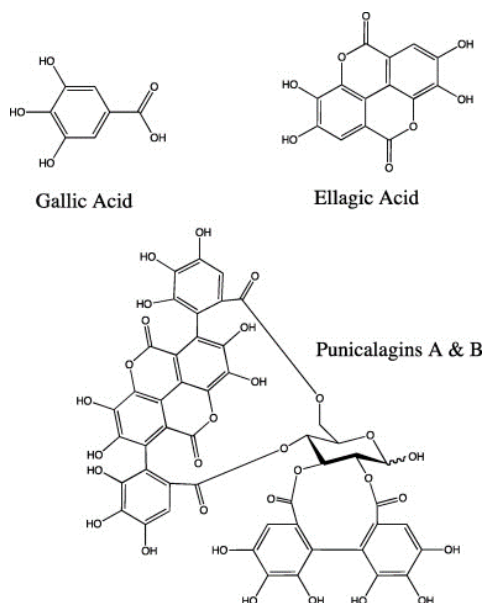
Στον πίνακα 5, η συγκέντρωση των φαινολών εκφράζεται σε εξαϋδροξυδιφαινοϋλο γλυκόζη (mg EHHDP-G/g) και η συγκέντρωση προανθοκυανιδίνης σε ισοδύναμα κατεχίνης (mg CE/g).

Ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε φλαβονοειδή όπως είναι η κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη, ανθοκυανίνες και προκυανίδες. Η συνολική συγκέντρωση των φλαβονοειδών εκφρασμένο σε ισοδύναμα κατεχίνης κυμαίνεται από 7,57-121,1 mg CE/g dry weight και εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης του φρούτου. Η ρουτίνη που θεωρείται το κύριο συστατικό 3,44 mg/g dry weight είναι πολύ ασταθές και μειώνεται η συγκέντρωση του κατά 65% σε αποθήκευση του για 4 μήνες σε κρύο περιβάλλον. Η κατεχίνη έχει συγκέντρωση 0,57-1,26 mg/g dry weight και η επικατεχίνη 0,06-0,99 mg/g dry weight. Οι ανθοκυανίνες αποτελούν το 30% του φλοιού και είναι υπεύθυνα για το χρώμα του φρούτου. Η συνολική συγκέντρωση ανθοκυανινών εκφρασμένη σε ισοδύναμα Cyanidin 3,5-diglucoside είναι 0,0684-102,2 mg C3G/g dry weight. [3]

Τέλος ο φλοιός του ροδιού είναι πλούσιος σε ταννίνες, όπως η πουνικαλαγίνη και τα παράγωγα της που θεωρούνται κύριες ταννίνες στα εκχυλίσματα φλοιών ροδιού. Η ολική

συγκέντρωση υδρολυόμενων ταννινών είναι 144,96-292,23 mg GAE/g dry weight ή 11,23-504,8 mg TAE/g dry weight, σε ισοδύναμα ταννικού οξέος. Εκτός από τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας και την ποικιλία σημαντικό ρόλο για την συγκέντρωση των ταννινών παίζει και το πάχος του φλοιού. [3]

Η πουνικαλαγίνη (2,3-HHDP-4,6-gallagyl-glucoside) εντοπίζεται σε 2 ισομερή τα α- και β-ανομερές και είναι το κύριο βιοδραστικό συστατικό του φλοιού του ροδιού. Η συγκέντρωση της κυμαίνεται από 10,5 έως 653,8 mg/g dry weigh [34] και η αντιοξειδωτική της δράση είναι $6,3 \pm 0,3 \text{ mmol Trolox equivalent /L}$. [6]



Εικόνα 3: Δομή κύριων βιοδραστικών συστατικών του φλοιού του ροδιού: γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ και πουνικαλαγίνης [35]

Περισσότερα βιοδραστικά συστατικά του φλοιού του ροδιού, με τους χημικούς τους τύπους φαίνονται στο Παράρτημα Α.

Η πουνικαλαγίνη έχει αντικαρκινική δράση, για τύπους καρκίνου όπως: του τραχήλου της μήτρας, του μαστού, του ήπατος, των οστών και της γλοίας. Ακόμη έχει αντιφλεγμονώδη δράση καθώς και προστατεύει την καρδιαγγειακή υγεία, την υγεία του ήπατος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία πνευμονοπαθειών. Η πουνικαλαγίνη επιδρά και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως την νόσο Alzheimer's, την νόσο Parkinson's και την σκλήρυνση κατά πλάκας. Επίσης, επιδρά κατά της παχυσαρκίας και του διαβήτη, μειώνοντας το λίπος στο έντερο και το συκώτι και επιδρώντας στην παραγωγή της ινσουλίνης. Τέλος η πουνικαλαγίνη βοηθά στην υγεία του δέρματος δρώντας κατά της οξειδωτικής καταστροφής. [36]

1.2.3 Συγκέντρωση ολικού φαινολικού περιεχομένου

Μια σημαντική παράμετρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι και η μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC). Η πιο γνωστή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος μέτρησης του TPC είναι η δοκιμασία Folin-Ciocalteu, λόγω της απλότητας και της αναπαραγωγιμότητάς της. Η ανάλυση Folin-Ciocalteu βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστήριου, που πιστεύεται ότι περιέχει σύμπλοκα φωσφομολυβδικού /φωσφοτουγγικού οξέος, από φαινολικές ενώσεις και δίνει ένα μπλε χρώμα στο διάλυμα με μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm. Συνήθως το TPC εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ή ακόμη και σε ισοδύναμα κατεχίνης, καφεϊκού οξέος, χλωρογενικού οξέος ή φερουλικού οξέος. [37, 38]

Μερικά από τα μειονεκτήματα της διαδικασίας Folin-Ciocalteu είναι η ευαισθησία της στο pH, τη θερμοκρασία και το χρόνο αντίδρασης. Επίσης ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το αντιδραστήριο μπορεί να αναχθεί και από μη φαινολικά αναγωγικά όπως είναι τα αναγωγικά σάκχαρα και κάποια αμινοξέα και να δώσει αποτελέσματα υπερεκτιμημένα έως και μια τάξης μεγέθους σε σχέση με τα αποτελέσματα μεθόδων HPLC. Τέλος ένα άλλο πρόβλημα που δημιουργείται από την διαδικασία είναι ότι το σύστημα της ανάλυσης είναι υδατικό και έτσι λιπόφιλες φαινόλες δεν μετρούνται. Γι' αυτό έχουν προταθεί τροποποιήσεις της μεθόδου, όπως το να χρησιμοποιηθεί ως μέσο το μίγμα ισοβουτανόλης/νερού. [37]

Άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί για την μέτρηση του TPC είναι η χρήση βιοισθητήρων για τη μέτρηση της περιεκτικότητας των φαινολικών συστατικών που οξειδώνουν την τυροσινάση καταναλώνοντας οξυγόνο, η οποία μετράται αμπερομετρικά και συσχετίζεται με την περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών. Άλλη μια μέθοδος είναι η OXY-adsorbent, η οποία αξιοποιεί την αντίδραση των φαινολικών με το υπερχλωρικό οξύ και φασματοφωτομετρικά ποσοτικοποιεί την TPC μετρώντας τη μη αντιδρώσα περίσσεια υπερχλωρικού οξέος. [37]

1.2.4 Αντιοξειδωτική δράση

1.2.4.1 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικά είναι ενδογενή ή εξωγενή μόρια που εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου δρώντας ως δότες ηλεκτρονίων, δηλαδή είναι αναγωγικές ουσίες. Ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί ως "κάθε ουσία που όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με εκείνες του οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του εν λόγω υποστρώματος". [39] Τα αντιοξειδωτικά, στην βιομηχανία των τροφίμων, ορίζονται ως οι ουσίες που λειτουργούν ως συντηρητικά και προστατεύουν τα τρόφιμα από την οξείδωση των λιπιδίων και των βιταμινών και έτσι αποφεύγεται ο ταγγισμός και άλλες ανεπιθύμητες γεύσεις. Έτσι στην φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, τα αντιοξειδωτικά μειώνουν τις δυσμενείς επιπτώσεις των αντιδρώντων ειδών όπως του οξυγόνου και του αζώτου. [4] Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species-ROS) δρουν είτε ως οξειδωτικά είτε ως αναγωγικά και σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη φυσιολογία, όπως στη μεταγραφή γονιδίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη

φλεγμονή και την κυτταρική απόσταση. Αντίθετα αν η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών είναι μεγαλύτερη, τότε αποσπούν ηλεκτρόνια από τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA και προοδευτικά, οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία, γήρανση, καρκίνο και θάνατο. Τα αντιοξειδωτικά δίνοντας ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες, καθυστερούν είτε εμποδίζουν την οξείδωση ή ακόμα και επιδιορθώνουν το DNA και έτσι διατηρούν την υγεία των κυττάρων και του οργανισμού.[39]

Εκχυλίσματα από φλοιό ροδιού είναι πολύ καλή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο των συνθετικών αντιοξειδωτικών για τα τρόφιμα, λόγω της αυξημένης ανησυχίας σχετικά με την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών. [40] Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως στην παρουσία των ελλαγιταννινών, δηλαδή της πουνικαλαγίνης και των παραγόντων της. Άλλες ενώσεις που προσφέρουν αντιοξειδωτική δράση στα εκχυλίσματα είναι οι ανθοκυανίνες, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το ελλαγικό και γαλλικό οξύ. Η αντιοξειδωτική δράση έχει άμεση σχέση με τα επίπεδα φαινολικών ενώσεων που επηρεάζεται από τον διαλύτη που έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση. Έχει βρεθεί ότι τα εκχυλίσματα από φλοιό ροδιού έχουν περίπου 10 φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από ότι ο χυμός.[3]

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος φλοιού ροδιού αλλά και μερικών από των κυρίων βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται στο φλοιό του ροδιού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 6. Η τιμή TEAC για το εκχύλισμα φλοιού ροδιού δείχνει πως οι περιεχόμενες ενώσεις δρουν συνεργιστικά στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών όταν αναμειγνύονται στο εκχύλισμα. [6]

Πίνακας 6: Αντιοξειδωτική δράση συστατικών φλοιού ροδιών

Συστατικά φλοιού ροδιού:	TEAC (mmol/L)
Πουνικαλαγίνη	6,3 ± 0,3
Ελλαγικό οξύ	0,4± 0,1
Γαλλικό οξύ	0,9± 0,0
Προτοκατεχικό οξύ	0,4± 0,0
p-κουμαρικό οξύ	0,5± 0,0
Φλοιός Ροδιού	21,7 ± 0,0

1.2.4.2 Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Δράσης

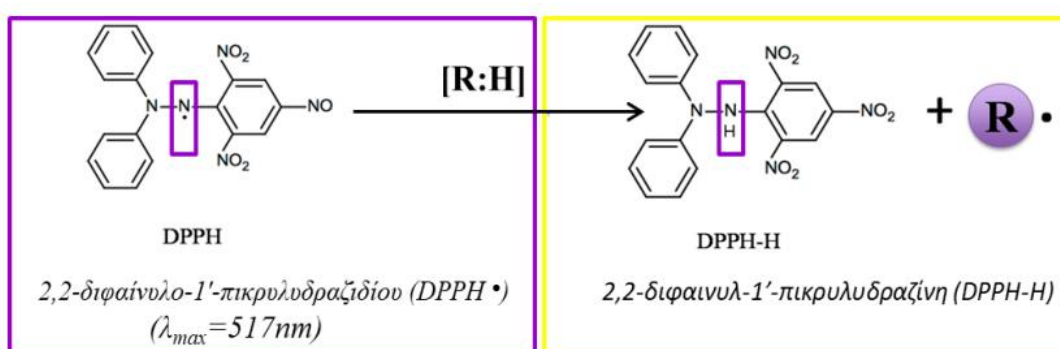
Η αντιοξειδωτική δράση μετράτε έμμεσα μέσω του ελέγχου της έκτασης της οξείδωσης του οξειδωτικού. [39] Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράση αν και αρχικά βασιζόταν στην μέτρηση της οξείδωσης των λιπιδίων, με την πρόοδο της επιστήμης μπορεί να προσδιορισθεί με διαφορετικούς τρόπους όπως είναι η μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT), η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου(ET), η μείωση της ισχύος και η χηλοποίηση μετάλλων καθώς και η δέσμευση ορισμένων τύπων ελεύθερων ριζών (ROS). [37] Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται είτε άμεσα είτε έμμεσα μετρώντας τον ρυθμό ή την έκταση της διάσπασης του υποστρώματος ή της ουσίας του ανιχνευτή ή της κατανάλωσης οξυγόνου, του σχηματισμού προϊόντων οξείδωσης, του σχηματισμού ή της διάσπασης ελεύθερων ριζών του ανιχνευτή. [39]

Στην περίπτωση που η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης βασίζεται στην αναστολή της οξείδωσης του ανιχνευτή με το ROS, αυτή εκφράζεται είτε ως ποσοστό αναστολής είτε ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για να μειώσει την αρχική συγκέντρωση της εκάστοτε προστιθέμενης ρίζας κατά 50% (IC50) είτε ως ισοδύναμα ενός επιλεγμένου αντιοξειδωτικού αναφοράς όπως το Trolox, το ασκορβικό οξύ ή άλλης ένωσης. Μερικές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ικανότητας να εξουδετερώνουν οι ελεύθερες ρίζες τις αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι οι μέθοδοι : DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, TRAP, TBARS, με τις πρώτες δύο να χρησιμοποιούνται περισσότερο μιας και οι ρίζες είναι πιο σταθερές και οι μέθοδοι είναι πιο ευαίσθητες, γρήγορες, απλές και με χαμηλό κόστος. [37, 39, 41]

Η μέτρηση της οξείδωσης γίνεται με διάφορες τεχνολογίες ανίχνευσης όπως φασματομετρικές, φθορομετρικές, χημειοφωταύγειας, EPR (παραμαγνητικός συντονισμός ηλεκτρονίων), FT-IR (μετασχηματισμός Fourier-υπέρυθρο), NMR (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός) και αμπερομετρικές. [37, 39]

1.2.4.3 Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ελεύθερης ρίζας του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζιλίου (DPPH[•]) με τα αντιοξειδωτικά μόρια και αδρανοποιείται είτε με την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (ET) είτε με την μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (HAT).[37] Η ελεύθερη ρίζα σχηματίζει με τον δότη υδρογόνου της αντιοξειδωτικής ουσίας, την μη ριζική μορφή DPPH-H και ο μετασχηματισμός αυτός έχει ως συνέπεια την αλλαγή του χρώματος από μωβ σε κίτρινο. [40] Η μεταβολή της απορρόφησης του διαλύματος της ρίζας DPPH[•] μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρία. Η μέθοδος δηλαδή βασίζεται στην υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση είναι ίση με την ικανότητα δωρεάς ηλεκτρονίων ή την αναγωγική ισχύ της.[37]



Εικόνα 4: Αντίδραση ελεύθερης ρίζας DPPH [42]

1.2.5 Βιολογική δράση

Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση τα εκχυλίσματα από φλοιό ροδιού έχουν και αντιμικροβιακή δράση, πολύ σημαντική ιδιότητα για την εφαρμογή τους κυρίως σε καλλυντικά. Ειδικότερα οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες μπορούν να αναστείλουν παραπάνω από ένα μικροοργανισμό την φορά και αυτό τους δίνει πλεονέκτημα έναντι των συνθετικών.[4] Εκχυλίσματα φλοιών ροδιού έδειξαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα *Staphylococcus aureus* και *Bacillus cereus* με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 0,01% και στο *Pseudomonas* με συγκέντρωση 0,1%. [40]

Τέλος, προσθήκη εκχυλίσματος σε φιλμ και δισκία έχει δείξει αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* και *Salmonella Typhimurium*. [4]

1.2.6 Οφέλη για την υγεία

Τα οφέλη του φλοιού του ροδιού στην υγεία είναι πολλά μιας και περιλαμβάνει πολλά βιοενεργά συστατικά, που έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιογόνες δράσεις. Ο φλοιός του ροδιού δρα είτε προληπτικά είτε για την αντιμετώπιση πολλών προβλημάτων υγείας. Μερικά από τα προβλήματα υγείας που αποδεδειγμένα βοηθά ο φλοιός του ροδιού είναι : αναστολή της ογκογένεσης του δέρματος, αντικαρκινικές επιδράσεις στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, αντιπολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και του όγκου στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, χημειοπροληπτικές δράσεις κατά του καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου, αναστολή της ανάπτυξης και της μετάστασης του καρκίνου του θυρεοειδούς. Γενικότερα έχει αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και προκαλεί απόπτωση. [3, 36, 43]

Εκτός από την αντικαρκινική δράση του φλοιού του ροδιού, βοηθά στην διαχείριση του διαβήτη τύπου 2 καθώς έχει ηπατοπροστατευτικές επιδράσεις, αντιδιαβητική και υπολιπιδαιμική δράση, αποτρέπει την απώλεια ακοής που σχετίζεται με την ηλικία, είναι ευεργετικό στη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας του γόνατος, στη θεραπεία του γλαυκώματος και της διούρησης και προλαμβάνει τις αυτοάνοσες διαταραχές. [3, 36, 43]

Προσφέρει ακόμα αντιμικροβιακή δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, αντιμυκητιακή δράση κατά των δερματόφυτων, αντιαλλεργική δράση, αντιελκωτικές επιδράσεις καθώς προστατεύει από τραυματισμούς στο στομάχι και έλκος. Τέλος έχει δυνατότητα επούλωσης πληγών, ενίσχυσης της μνήμης και είναι αποτελεσματικός παράγοντας λεύκανσης του δέρματος. [3, 36, 43]

1.3 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από φλοιό ροδιού

Η εκχύλιση είναι μια φυσική διεργασία παραλαβής επιθυμητής ουσίας ή ομάδας ουσιών από φυτικής προέλευσης πρώτη ύλη, δηλαδή η ουσία μεταφέρεται από την στερεή σε μια υγρή φάση και έτσι η ουσία-στόχος απομονώνεται και διαλύεται επιλεκτικά σε ένα διαλύτη.

Ανάλογα με την πρώτη ύλη μπορεί να εφαρμοστούν διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, για παράδειγμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν τεχνικές που βασίζονται στους διαλύτες ή στις απορροφητικές μεμβράνες. Η εκχύλιση είναι πολύ σημαντική για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων και η επιλογή της τεχνικής εκχύλισης βασίζεται σε διαφορετικές φυσικοχημικές αρχές. Ανάλογα με την μέθοδο εκχύλισης, τον τύπο και την σύσταση των μιγμάτων διαλυτών επηρεάζεται η απόδοση της εκχύλισης και η σύσταση των βιοδραστικών συστατικών. [7]

Η κινητική της εκχύλιση αποτελείται από τρία διαφορετικά στάδια. Το πρώτο στάδιο, το στάδιο της ισορροπίας, λαμβάνουν χώρα τα φαινόμενα διαλυτοποίησης και διαχωρισμού, δηλαδή τα προς εκχύλιση μόρια μεταφέρονται από το στερεό στον διαλύτη με σταθερή ταχύτητα. Στο δεύτερο στάδιο επικρατεί η μεταφορά μάζας μέσω διάχυσης και το τελικό στάδιο όπου ο ρυθμός της εκχύλισης είναι χαμηλός, αφού οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης της ουσίας με την βιομάζα δυσκολεύουν την διάχυση της προς τον διαλύτη.[44]

1.3.1 Εκχύλιση Στερεού- Υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μια φυσική διεργασία διαχωρισμού, όπου μία ή περισσότερες ενώσεις του στερεού απομονώνεται και απομακρύνονται από το στερεό και μεταφέρονται στον διαλύτη (υγρό). Ο μηχανισμός της εκχύλισης βασίζεται στη μεταφορά μάζας με διάχυση και τα στάδια του είναι τα εξής: ο διαλύτης διαβρέχει το στερεό, διεισδύει στη μάζα του και διαλυτοποιεί κάποια από τα συστατικά του. Ο βαθμός διείσδυσης του διαλύτη εξαρτάται από τις διαμοριακές δυνάμεις ανάμεσα σε στερεό και διαλύτη. Οι εκχυλισμένες ουσίες μεταφέρονται προς την επιφάνεια του στερεού και έπειτα μεταφέρονται στον όγκο του διαλύματος σύμφωνα με τον νόμο διάχυσης του Fick:

$$J = -D\nabla C$$

όπου J είναι η γραμμομοριακή ροή της ουσίας που διαχέεται, D ο συντελεστής διάχυσης αυτής στο περιβάλλον που βρίσκεται και C η γραμμομοριακή συγκέντρωση.

Ο διαλύτης με τα εκχυλισμένα συστατικά μεταφέρεται από το εσωτερικό του στερεού, που έχει μέγιστη συγκέντρωση, στον διαλύτη, όπου στην αρχική κατάσταση έχει μηδενική συγκέντρωση του συστατικού. [45, 46]

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση είναι ο χρόνος, η θερμοκρασία, η αναλογία διαλύτη/ βιομάζα, ο ρυθμός ανάδευσης, η ισχύς των μικροκυμάτων σε εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και η συχνότητα σε εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Ακόμα την εκχύλιση μπορεί να την επηρεάσει η φύση της προς εκχύλισης ουσίας, η κοκκομετρία και η υγρασία, η φύση του διαλύτη, η πολικότητα, το ιξώδες, η διηλεκτρική σταθερά καθώς και η συσχέτιση του με το προς εκχύλιση στερεό.

Η εκχύλιση υγρού-στερεού βρίσκει εφαρμογή σε πολλές διεργασίες από την καθημερινότητα μέχρι και σε βιομηχανικό επίπεδο. Μερικές από τις βιομηχανικές εφαρμογές της είναι στην φαρμακευτική, στην παραγωγή λαδιού αλλά και στην εκχύλιση καφέ, τσαγιού και μπύρας.

Στόχος της εκχύλισης μπορεί να είναι η ανάκτηση βιοδραστικών συστατικών της βιομάζας, χρωστικές ουσίες ή και το άρωμα της βιομάζας. Οι διαλύτες μπορεί να είναι οργανικοί ή ανόργανοι ή και μίγματα αυτών, με τον πιο κοινό διαλύτη στις εκχυλίσεις να είναι το νερό,

αλλά υπάρχουν και άλλοι συμβατικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνά όπως είναι το τολουόλιο, η μεθανόλη, η αιθανόλη, η αιθυλενογλυκόλη, το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, το χλωροβενζόλιο, το χλωροφόρμιο, η βουτανόλη, η ακετόνη, το οξικό οξύ, το βενζόλιο και ο διαιθυλαιθέρας. [47] Η επιλογή του διαλύτη είναι πολύ σημαντική για την απόδοση της εκχύλισης μιας και θα πρέπει ο διαλύτης να είναι εκλεκτικός ως προς την ουσία-στόχο. Ακόμη ο διαλύτης θα πρέπει να είναι καθόλου ή μερικώς αναμίξιμος με το στερεό και να έχει χαμηλή επιφανειακή τάση, ώστε να μπορεί να ανακτηθεί, και ιδανικά να έχει χαμηλό ιξώδες, ώστε να γίνεται ταχύτερα η διάχυση στη φάση του. Τέλος συχνά οι διαλύτες, επειδή τα εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία των τροφίμων και των καλλυντικών, θα πρέπει να είναι κατάλληλοι για τρόφιμα (food grade solvent).[48] Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία οι επιτρεπόμενοι διαλύτες εκχύλισης είναι το προπάνιο, το βουτάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα, η ακετόνη και το υποξείδιο του αζώτου. [49]

1.3.2 Κλασική εκχύλιση

Οι κλασικές μέθοδοι εκχύλισης είναι η υδροαπόσταξη με νερό, ατμό ή και συνδυασμό αυτών, η μέθοδος Soxhlet και η συμβατική εκχύλιση με διαλύτη υποβοηθούμενη από θέρμανση ή/και ανάδευση.

Στη συμβατική εκχύλιση, η στερεή βιομάζα, αφού έχει αλεσθεί για να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής της με τον διαλύτη, εμποτίζεται με τον διαλύτη. Συχνά για να επιταχυνθούν οι διαδικασίες διάχυσης το μίγμα θερμαίνεται ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητα του διαλύτη και η κινητική ενέργεια των μορίων του στερεού προς εκχύλιση. Επίσης για την διευκόλυνση των διαδικασιών διάχυσης σε όλη την μάζα του υγρού εκχύλισης, εφαρμόζεται ανάδευση. Η μέθοδος αυτή, αν και είναι απλή στην εφαρμογή της, συχνά είναι λιγότερο αποδοτική στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών έναντι μη συμβατικών μεθόδων και έχει αρκετά μειονεκτήματα στην εφαρμογή της. [50, 51]

Τα κύρια προβλήματα των τις κλασικών μεθόδων εκχύλισης που πρέπει να αντιμετωπιστούν είναι ο μεγάλος χρόνος εκχύλισης, η απαίτηση δαπανηρού και υψηλής καθαρότητας διαλύτη, η απομάκρυνση της μεγάλης ποσότητας διαλύτη, η χαμηλή εκλεκτικότητα εκχύλισης και η θερμική αποσύνθεση θερμοευαίσθητων ενώσεων.[50, 52-54]

1.3.2.1 Παράμετροι εκχύλισης

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τις κλασικές μεθόδους εκχύλισης είναι: η πυκνότητα, η πολικότητα, η τοξικότητα, η εκλεκτικότητα, η πτητικότητα, το ιξώδες το pH, η κοκκομετρία, η αναλογία διαλύτη/βιομάζα και η καθαρότητα της βιομάζας αλλά και των διαλυτών. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας είναι ο χρόνος, που σε αυτές τις μεθόδους είναι μεγάλος και στην περίπτωση της εκχύλισης με θέρμανση και ανάδευση παράγοντες που επηρεάζουν είναι και η θερμοκρασία και η ταχύτητα ανάδευσης. [53, 55]

Τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών μεθόδων εκχύλισης, όπως η απλή ανάδευση, είναι η χαμηλή απόδοση, ο μεγάλος χρόνος επεξεργασίας, το υψηλό κόστος και οι υψηλές περιβαλλοντικές παράμετροι που έχουν οδηγήσει στην έρευνα για νέες διεργασίες εκχύλισης. [7]

1.3.2.2 Επιλογή διαλυτών

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας, που συχνά συνδυάζονται με νερό. Χρησιμοποιούνται και μη οργανικοί διαλύτες όπως το νερό, η γλυκερίνη ή τα υδατικά διαλύματα κυκλοδεξτρινών.[54]

Για την εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών από τον φλοιό του ροδιού συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ακετόνη και το νερό. Όμως, συχνά, οι συμβατικοί διαλύτες συνεκχυλίζουν και άλλες ουσίες και μειώνουν την απόδοση των αντιοξειδωτικών στόχων. Μεταξύ των παραπάνω υψηλότερη συνολική απόδοση του εκχυλίσματος δίνουν η μεθανόλη και το νερό καθώς και μίγματα αυτών. [7]

1.3.2.3 Εφαρμογές κλασικής εκχύλισης σε ρόδι

Τα τελευταία χρόνια, τόσο λόγω της αύξησης της ανάγκης για αξιοποίηση των υπολειμμάτων τροφίμων, αλλά και από την ανάγκη για ανάκτηση βιοδραστικών από αυτά, όπως είναι τα φυτικά αντιοξειδωτικά, έχει γίνει εκτενής έρευνα για την εκχύλιση τους από φυτικά υπολείμματα τροφών, όπως το μαύρο τσάι, σταφύλια, φλοιό πορτοκαλιού, πατάτας και από διάφορα βότανα. Στον παρακάτω πίνακα 7 φαίνονται μερικά παραδείγματα εκχυλίσεων φλοιών ροδιού με κλασική εκχύλιση από την βιβλιογραφία.

Πίνακας 7: Παραδείγματα κλασικής εκχύλισης φλοιών ροδιού

Διαλύτης	Χρόνος	TPC (mg GAE/ g dw)	Αναφορές
Νερό	1 h	119	[56]
Οξικό οξύ	4 h	202,4	[57]
70% Μεθανόλη - 30% Νερό (w/w)	0,5 h	101,59	[6]
Νερό	3 h	84,6	[58]
80% Αιθανόλη- 20% Νερό (w/w)	2 min	17,78	[11]
60% Αιθανόλη- 40% Νερό (w/w)	45 min	510	[59]
80% Αιθανόλη- 20% Νερό (w/w)	3 min	19,3	[60]
80% Αιθανόλη- 20% Νερό (w/w)	48 h	361	[61]
Ακετόνη	16h	106,31	[62]
Μεθανόλη	4 h	442,48	[63]

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού βάρους βιομάζας, δηλαδή του φλοιού του ροδιού.

Από τον Πίνακα 7 είναι φανερό ότι με την αύξηση του χρόνου η ολική συγκέντρωση φαινολικών αυξάνεται, όπως για παράδειγμα τα πειράματα με διαλύτη 80% Αιθανόλη-20% Νερό κ.β, όπου με αύξηση του χρόνου η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων γίνεται 19 φορές

μεγαλύτερη. Ακόμα πολύ καλά αποτελέσματα έδωσε το εκχύλισμα με διαλύτη την μεθανόλη, όμως αυτός ο διαλύτης δεν είναι αποδεκτός για τρόφιμα και φάρμακα, οπότε δεν προτιμάτε.

1.3.3 Εκχύλιση με πράσινους διαλύτες

Η εκχύλιση βιομορίων υψηλής αξίας, είναι πολύ σημαντική λόγω των ιδιοτήτων τους κυρίως για τον κλάδο της φαρμακευτικής. Συνήθως οι εκχυλίσεις από διάφορες φυσικές πηγές πραγματοποιούνται με τη χρήση παραδοσιακών οργανικών διαλυτών, που έχουν χαμηλή απόδοση, αυξημένη κατανάλωση ενέργειας και συχνά είναι τοξικοί, πτητικοί, αναφλέξιμοι, μη βιοδιασπώμενοι και μη ανανεώσιμοι. Εναλλακτικοί πράσινοι διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις εκχυλίσεις είναι επιφανειοδραστικά, υδρότροπα και ιοντικά υγρά, όπως είναι δηλαδή οι Μεταβαλλόμενης Υδροφιλίας διαλύτες (switchable hydrophilicity solvents-SHS), τα Ιοντικά Υγρά (IL) και οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DESs).[64, 65]

Η εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από τον φλοιό του ροδιού με χρήση DES είναι αποδοτικότερη σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες και μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες μεθόδους ώστε να μεγιστοποιηθεί η απόδοση. Μάλιστα έρευνες έχουν δείξει ότι συνδυασμός της τεχνικής DES και της εκχύλισης με τη βοήθεια υπέρυθρης ακτινοβολίας IR εκχυλίζει περισσότερα φαινολικά σε σχέση με την συμβατική εκχύλιση και με την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους καθώς και έδωσε υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.[7] Άλλες μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούν DES διαλύτες είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και με μικροκύματα. [66]

Τα κύρια πλεονεκτήματα των DES για εκχυλίσεις δευτερογενών μεταβολιτών από φυτά, καρπούς και άνθη σε σχέση με τα ιοντικά υγρά και τους οργανικούς διαλύτες είναι η χαμηλή πτητικότητα, η αμελητέα τοξικότητα, η αναμιξιμότητα με το νερό, το ρυθμιζόμενο ιξώδες και η δυνατότητα σχηματισμού διαλυτών με ευρύ φάσμα πολικότητας. [67] Σε σύγκριση ειδικότερα με τα ιοντικά υγρά, μια άλλη κατηγορία πράσινων διαλυτών, η σύνθεση των DES μπορεί να γίνει από συστατικά φυσικής προέλευσης (NADES). Ακόμη τα DESs μπορεί να είναι πολικά ή μη, υδρόφιλα ή υδροφοβικά, δίνοντας έτσι την ευελιξία να γίνεται η σύνθεση τους ανάλογα με την μέθοδο εκχύλισης και τον τύπο βιομάζας ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποτελεσματικότητα. [68]

Οι διαλύτες DES πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών διαλυτών μιας και είναι μη τοξικοί, μη πτητικοί, μη αναφλέξιμοι, βιοδιασπώμενοι και ανανεώσιμοι. Οπότε οι DES είναι πράσινοι διαλύτες αφού δεν εισέρχονται στην ατμόσφαιρα, δεν οξειδώνονται και δε δεσμεύουν όζον. Ακόμη έχουν χαμηλή πυκνότητα και είναι υγροί σε ένα μεγάλο φάσμα θερμοκρασιών.[69, 70]

Ένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η εκχύλιση με DES είναι ότι συνήθως έχουν μεγάλα ιξώδη, πράγμα που μπορεί να δυσκολεύει διεργασίες που απαιτούν διάχυση ή ροή. Όμως η ερευνά γύρω από την δομή τους και η προσθήκη άλλων διαλυτών όπως νερό μπορεί να διευκολύνει την χρήση τους. Ακόμα η θέρμανση, που συχνά χρησιμοποιείτε στις εκχυλίσεις, βοηθά στην μείωση του ιξώδους αλλά θέλει προσοχή μιας και πολλά φυτοχημικά είναι θερμοευαίσθητα. [68]

1.3.3.1 Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)

Οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DES) είναι εναλλακτικοί "πράσινοι" διαλύτες εκχύλισης, φιλικό προς το περιβάλλον, μη τοξικοί και βιοδιασπώμενες οργανικές ενώσεις, με χαμηλό κόστος και εύκολοι στην σύνθεση τους. [7, 71] Η σύνθεση τους γίνεται είτε με απλή ανάμιξη σε εύρος θερμοκρασιών από περιβάλλοντος έως 80°C, με freeze-dry ανάμιξη ή υποβοηθούμενη από υπερήχους.[68] Όταν τα συστατικά του DES προέρχονται από την φύση τότε λέγονται NADES (φυσικοί βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες). Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο για την εκχύλιση όσο και για την προσυγκέντρωση οργανικών ενώσεων. Από DESs έχουν απομονωθεί φυτοφάρμακα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, βιοδραστικές ενώσεις, φλαβονοειδή, φαινολικές και φαρμακευτικές ενώσεις, χρωστικές ουσίες, τερπένια, πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, πτητικές οργανικές ενώσεις και άλλοι ρύποι, συντηρητικά ή άλλες οργανικές ενώσεις. Κυρίως έχει μελετηθεί η εκχύλιση φαινολικών, πρωτεϊνών και πεπτιδίων από διάφορες βιομάζες. [71, 72]

Τα DES σχηματίζονται από δύο ενώσεις, έναν δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) και ενός δέκτη δεσμών υδρογόνου (HBA), που σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι συνήθως στερεά. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες τους, όπως η διαλυτότητα, η πτητικότητα, η πολικότητα και το ιξώδες, εξαρτώνται από τα συστατικά του DES. Το σημείο τήξης του DES είναι συνήθως μικρότερο από τα σημεία τήξης οποιουδήποτε από τα αρχικά στοιχεία του, που οφείλεται στην δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ HBD και HBA όταν αναμιγνύονται στην ευτηκτική αναλογία τους. Συχνά ως δέκτης δεσμών υδρογόνου χρησιμοποιείται ένα τεταρτοταγές άλας του αμμωνίου (π.χ. χλωριούχος χολίνη) ή αμινοξέα, ενώ σαν δότης συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικά οξέα όπως γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ και οξικό οξύ, υδατάνθρακες (π.χ. σακχαρόζη, γλυκόζη), αμίνες, αλκοόλες, πολυόλες, αμίδια οξέος [34, 72]

Πιο συγκεκριμένα οι ευτηκτικοί διαλύτες μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις τύπους, όπως φαίνεται από τον πίνακα 8. [71, 73]

Πίνακας 8: Κατηγοριοποίηση DESs

Τύπος	Γενική Περιγραφή	Φόρμουλα	Όροι Φόρμουλας
Τύπος I	Άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου + χλωριούχο μέταλλο	$Cat^+X^- + zMCl_x$	Ml = Zn, Sn, Ga, In, Al, Fe
Τύπος II	Άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου + ένυδρο χλωριούχο μέταλλο	$Cat^+X^- + zMCl_x \cdot yH_2O$	M=Cr, Cu, Fe, Ni, Co
Τύπος III	Τεταρτοταγές άλας αμμωνίου + δότης δεσμού υδρογόνου	$Cat^+X^- + zRZ$	Z = COOH, CONH ₂ , OH
Τύπος IV	Ένυδρο χλωριούχο μέταλλο + δότης δεσμού υδρογόνου	$MCl_x + RZ$	M = Al, Zn and Z = CONH ₂ , OH

Όπου Cat⁺: οποιαδήποτε κατιόν αμμωνίου, φωσφονίου ή σουλφονίου, X⁻: βάση κατά Lewis, συχνά ένα ανιόν αλογονιδίου, MCl_x: χλωρίδιο μετάλλου και RZ: οργανική ένωση. [71]

Για την εκχύλιση φλαβονοειδών συνήθως ως δέκτες δεσμού υδρογόνου (HBA) χρησιμοποιούνται: χλωριούχος χολίνη, χλωριούχος βηταΐνη, L-προλίνη, προπιονικό νάτριο. Ως δότης δεσμού υδρογόνου (HBD) χρησιμοποιούνται: ουρία, γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη, 1,2 βουτανοδιόλη, 1,3 βουτανοδιόλη, 1,4 βουτανοδιόλη, 2,3 βουτανοδιόλη, 1,6 εξανοδιόλη, μαλικό, μαλονικό, κιτρικό και λεβουλινικό οξύ, φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη και

σορβιτόλη. [68] Στο Παράρτημα Γ, φαίνονται τα παραπάνω συστατικά με τον χημικό τους τύπο.

Οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες έχουν βρει εφαρμογή στην ηλεκτροφύτευση μετάλλων, αφού έχουν χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτρολύτες. [74, 75] Ακόμη έχουν μελετηθεί και για την εφαρμογή τους στην παραγωγή και τον καθαρισμό του βιοντίζελ και την ικανότητά τους να εξάγουν μέταλλα. [76]

1.3.3.2 Παράμετροι εκχύλισης

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με DES είναι η θερμοκρασία, η μοριακή δομή και η σύνθεση του DES, ο χρόνος εκχύλισης, η αναλογία διαλύτη προς βιομάζα και το pH. Συχνά στην σύνθεση των διαλυτών DES προστίθεται και νερό για την μείωση του ιξώδους, οπότε και η περιεκτικότητα σε νερό είναι παράμετρος που επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης. [68]

Γενικότερα, με την αύξηση της θερμοκρασίας, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται αφού αυξάνεται η μοριακή κινητικότητα και επιτρέπει στα μόρια μέσω της διάχυσης να μετακινηθούν στον διαλύτη. Επιπλέον, με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται και το ιξώδες πράγμα επιθυμητό για την εκχύλιση. Οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από 25°C έως 60 °C, μιας και υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να επηρεάσουν τόσο τον διαλύτη όσο και τις ουσίες προς εκχύλιση αφού συνήθως είναι θερμοευαίσθητες. [68]

Η μοριακή δομή και η σύσταση του DES, είναι πολύ σημαντικές παράμετροι της εκχύλισης μιας και η σύνθεση του διαλύτη είναι αυτή που του δίνει και τις μοναδικές του ιδιότητες. Αρχικά η πολικότητα του διαλύτη πρέπει να είναι κοντά με την πολικότητα της ένωσης-στόχου ώστε η εκχύλιση να είναι πιο αποτελεσματική. Ακόμα τα συστατικά που δρουν ως δέκτες και δότες υδρογόνου στον διαλύτη, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για το αν αντιδρούν με κάποιο άλλο συστατικό του συστήματος. Η αναλογία HBA/HBD επηρεάζει το ιξώδες του διαλύτη, συνεπώς και την απόδοση της εκχύλισης, αφού με αύξηση της περιεκτικότητας σε δότη δεσμού υδρογόνου, μειώνεται το ιξώδες του διαλύτη. Τέλος, η αύξηση των ομάδων υδροξυλίου σε οποιοδήποτε συστατικό του DES οδηγεί σε ένα σταθερότερο DES αφού ενισχύεται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου. [68]

Η αναλογία στερεού προς τον διαλύτη επηρεάζει την εκχύλιση αφού με μείωση του λόγου αυτού αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης, μιας και ο διαλύτης διαβρέχει καλύτερα την βιομάζα και συμβάλει στην ρήξη του φυτικού υλικού και την τελική απελευθέρωση των ενώσεων προς εκχύλιση στον διαλύτη. Βέβαια και μεγάλη αύξηση της αναλογίας διαλύτη/βιομάζα, μπορεί να οδηγήσει σε αργή διασπορά του διαλύτη γύρω από το δείγμα οπότε και η απόδοση να είναι μικρότερη. Βιβλιογραφικά συνήθως προτείνεται αναλογία στερεού δείγματος προς διαλύτη 1:10. [68]

1.3.3.3 Παραδείγματα εκχύλισης φλοιών ροδιού με DES

Οι Bertolo et al. μελέτησαν την ανάκτηση πολυφαινολών από φλοιό ροδιού με 5 διαφορετικούς ευτηκτικούς διαλύτες που έχουν ως δέκτη την χλωριούχο χολίνη και ως δότη

υδρογόνου την γλυκόζη (CC-GLUC), σουκρόζη (CC-SUC), γλυκερόλη (CC-GLYC), λακτικό οξύ(CC-LAC) και οξικό οξύ (CC-CIT). Από τα παραπάνω την μεγαλύτερη συνολική ανάκτηση φαινολικών την είχε το CC-LAC τόσο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα DESs όσο και με εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 9. [67]

Πίνακας 9: Παράδειγμα εκχυλίσεων φλοιού ροδιού με DESs και ιδιότητές τους

NADES	pH		Density (g/ mL)		Viscosity (Pa s)	TPC (mg GAE/mL)
	25 °C	45 °C	25 °C	45 °C	45 °C	25 °C
CC-GLYC	4,45 ± 0,10	4,19 ± 0,30	1,34 ± 0,09	1,32 ± 0,08	0,0317 ± 0,0009	2,66 ± 0,18
CC-GLUC	4,78 ± 0,08	4,44 ± 0,16	1,55 ± 0,06	1,54 ± 0,05	0,4660 ± 0,0258	2,51 ± 0,20
CC-SUC	5,53 ± 0,20	5,49 ± 0,16	1,65 ± 0,03	1,64 ± 0,03	0,3926 ± 0,0417	0,81 ± 0,04
CC-LAC	1,44 ± 0,04	1,54 ± 0,03	1,43 ± 0,03	1,41 ± 0,03	0,0263 ± 0,0006	4,14 ± 0,17
CC-CIT	<1	<1	1,63 ± 0,03	1,61 ± 0,03	0,2955 ± 0,0037	3,84 ± 0,01
60% Αιθανόλη- 40% Νερό (v/v)	7,12 ± 0,12	6,45 ± 0,43	1,14 ± 0,04	1,11 ± 0,04	–	3,55 ± 0,16

Από τον παραπάνω πίνακα 9 καθώς και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε διαλύτη παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση φαινολικών είχαν οι διαλύτες όπου είχαν όξινο pH. Άρα η εκχυλιστική ικανότητα αυξάνεται καθώς το pH μειώνεται. Επίσης το CC-LAC είναι το λιγότερο ιξώδες από τα υπόλοιπα DESs, συνεπώς πιο εύκολα διαχειρίσιμο κατά την εκχύλιση αλλά και τον διαχωρισμό. Επίσης αύξηση του λακτικού οξέος μειώνει την απόδοση της εκχύλισης ενώ με αύξηση του χρόνου αυξάνεται και η απόδοση. Ως προς την θερμοκρασία το εύρος που μελετήθηκε ήταν 40°C-50°C και δεν παρατηρήθηκε κάποια ουσιαστική εξάρτηση. [67]

Οι Rajhael et al. μελέτησαν και σύγκριναν την χρήση DESs διαλυτών σε κλασική εκχύλιση, σε εκχύλιση με υπερήχους και σε εκχύλιση στο υπέρυθρο (IR). Οι εκχυλίσεις έγιναν στους 50 °C για 90 λεπτά και η υψηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών (152 mg/g DM) ελήφθη με IR στον βαθύ ευτηκτικό διαλύτη μαλλικό οξύ-γλυκόζη-γλυκερόλη καθώς και υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Η υψηλότερη συγκέντρωση ταννινών εντοπίστηκε σε εκχύλιση IR με βαθύ ευτηκτικό διαλύτη το χλωριούχος χολίνη- λακτικό οξύ (≈50 mg/g). Οι πράσινοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: χλωριούχος χολίνη- λακτικό οξύ (1:3), σακχαρόζη-μαλλικό οξύ (1:1), γλυκίνη-γλυκερόλη (1:3), χλωριούχος χολίνη-φρουκτόζη (1,9:1), ταρταρικό οξύ- γλυκόζη (1:1), ουρία-γλυκερόλη (1:1), γλυκόζη-μαλλικό οξύ-γλυκερόλη (1:1:1) γλυκίνη-λακτικό οξύ(1:3). [77]

Τέλος έχει προταθεί από τους Habibi et al. ότι ο συνδυασμός των DESs με μικροκύματα θα αυξήσει την απόδοση της εκχύλισης αφού θα αυξηθεί η διαλυτότητα του ευτηκτικού διαλύτη και θα μειωθεί ο χρόνος εκχύλισης για την πλήρη διάλυση βιοδραστικών συστατικών σε ατμοσφαιρική πίεση. [75]

Η εκχύλιση με πράσινους διαλύτες έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον και στην βιομηχανία. Στην γαλλική κυβέρνηση έχουν ήδη δοθεί πατέντες ευρεσιτεχνίας που αφορούν καλλυντικά, τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα. Οι πατέντες αυτές επικεντρώνονταν σε υδρόφιλα NaDES, που αποτελούνται κυρίως από εξόζες, οργανικά οξέα, πολυόλες ή/και αμινοξέα, με πιθανή προσθήκη νερού. Οι εταιρείες αυτές είναι : Yves Rocher, Gattefossé, Givaudan-Naturex and M&L Laboratories. [66]

1.3.4 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) πλεονεκτεί έναντι των κλασικών μεθόδων όχι μόνο για την αύξηση της απόδοσης αλλά κυρίως λόγω της μείωσης του χρόνου εκχύλισης, την χαμηλή κατανάλωση διαλύτη και την εξοικονόμηση ενέργειας σε συνδυασμό με την υψηλή αυτοματοποίηση. Μάλιστα η εκχύλιση με μικροκύματα μειώνει το χρόνο εκχύλισης πάνω από 60 φορές συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους. [40] Ενώ στην συμβατική εκχύλιση η θερμότητα μεταφέρεται από μια πηγή θερμότητας στη δεξαμενή θέρμανσης και στο διάλυμα, στην εκχύλιση με μικροκύματα η θέρμανση ξεκινά από το δείγμα επειδή το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία μικροκυμάτων. [7] Η επιτάχυνση της διαδικασίας και η αύξηση της απόδοσης οφείλεται στον συνδυασμό των φαινομένων μεταφοράς θερμότητας και μάζας.[40] Ενώ, λοιπόν, πλεονεκτεί η εκχύλιση με μικροκύματα λόγω της μεγάλης απόδοσης, της μειωμένης χρήσης οργανικών διαλυτών και τον μικρότερο χρόνο εκχύλισης, το κόστος εξοπλισμού, ειδικότερα σε βιομηχανικό επίπεδο αλλά και η κατανάλωση ενέργειας είναι υψηλή.

1.3.4.1 Μηχανισμός μικροκυμάτων

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα βασίζεται στη δημιουργία ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων υψηλής ενέργειας που μπορούν να αλλάξουν τη μοριακή περιστροφή και την κινητικότητα των διπόλων του διαλύτη χωρίς αλλαγή του δείγματος. Η ταχεία μεταφορά των βιοδραστικών ενώσεων από τη στερεά φάση της βιομάζας στη φάση του διαλύτη οφείλεται στην τριβή που δημιουργείται από τη συσσώρευση θερμότητας και τη βλάβη στην κυτταρική δομή. Με άλλα λόγια, η ενέργεια που παράγεται από τα μικροκύματα απορροφάται από τα προς εκχύλιση μόρια, με αποτέλεσμα την περιστροφή των πολικών μορίων του διαλύτη και τη μεταφορά ιόντων, που προκαλούν τριβή και έτσι καταστρέφουν την κυτταρική δομή του φυτικού ιστού. Η βλάβη στα κυτταρικά τοιχώματα, λόγω της απότομης αύξησης της θερμοκρασίας και της εσωτερικής πίεσης, εξηγεί και την ταχύτητα της MAE. [66] Το παραπάνω φαινόμενο διευκολύνει την εκχύλιση αφού επιτρέπει στις πολυφαινολικές ενώσεις να διαφύγουν από την βιομάζα στον διαλύτη. [7] Με αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύτη μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση της διαχυτικής ικανότητας των συστατικών-στόχων.[40]

Όσο αναφορά την μελέτη της κινητικής της εκχύλισης, τα τυπικά μοντέλα περιλαμβάνουν την αδιάστατη διάχυση, τον νόμο διάχυσης Fick, τη θεωρία των φιλμ και τα εμπειρικά μοντέλα. [40]

1.3.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση

Η εκχύλιση από μικροκύματα μπορεί να εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές ανάλογα με την φύση των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει η εκάστοτε βιομάζα. Οπότε η βελτιστοποίηση των παραμέτρων λειτουργίας πρέπει να εξετάζεται ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη μήτρα.[40]

Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από τον χρόνο καθώς όσο αυξάνεται ο χρόνος, αυξάνεται και η απόδοση. Βέβαια η μεγάλη έκθεση του φλοιού του ροδιού στα μικροκύματα μειώνει την απόδοση πιθανότατα λόγω της καταστροφής των φαινολικών ενώσεων. Η εκχύλιση αποτελείται από τρία στάδια, στο πρώτο όπου το υπόστρωμα φεύγει από την εξωτερική επιφάνεια του σωματιδίου με σταθερό ρυθμό, το δεύτερο όπου η μεταφορά μάζας γίνεται με συναγωγή και διάχυση και στο τελευταίο στάδιο όπου ο ρυθμός εκχύλισης είναι χαμηλός και η διαλυμένη ουσία πρέπει να υπερνικήσει τις αλληλεπιδράσεις με την μήτρα και να διαχυθεί στον διαλύτη. [40]

Ακόμα ο λόγος υγρού προς στερεό, δηλαδή διαλύτη προς διαλυμένη ουσία, επηρεάζει πολύ την απόδοση της εκχύλισης καθώς αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο λόγος, μιας και αυξάνεται η επιφάνεια επαφής του διαλύτη με το στερεό. Βέβαια αν ο όγκος του διαλύτη είναι πολύ μεγάλος τότε η απορρόφηση από τα μικροκύματα μειώνεται καθώς η περισσότερη ενέργεια απορροφάται από τον διαλύτη. [40]

Τέλος με αύξηση της ισχύος των μικροκυμάτων, αυξάνεται και η απόδοση της εκχύλισης, μιας και περισσότερη ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μεταφέρεται στα μόρια μέσω ιοντικής αγωγιμότητας και περιστροφής των δίπολων. Έτσι το σύστημα, που εκχυλίζεται, θερμαίνεται με αποτέλεσμα η διαλυτότητα και ο συντελεστής διάχυσης των φαινολικών ενώσεων να αυξάνεται και ταυτόχρονα το ιξώδες του διαλύτη να μειώνεται οπότε διευκολύνεται η μεταφορά των φαινολικών από την επιφάνεια του υποστρώματος. Αν και ορισμένοι ερευνητές επιλέγουν χαμηλή ισχύ μικροκυμάτων και μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης, μιας και η υψηλή ισχύ μειώνει την καθαρότητα, ωστόσο αυτή η προσέγγιση μπορεί να προκαλέσει υπερθέρμανση και να μειωθεί έτσι η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε βιοδραστικά συστατικά. [40]

1.3.4.3 Εφαρμογές

Αν και τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με μικροκύματα είναι πολλά, αφού αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης και μειώνει πολύ τον απαιτούμενο χρόνο, η εφαρμογή της σε βιομηχανικό επίπεδο δεν έχει ακόμη εξετασθεί ευρέως αφού το κόστος εξοπλισμού και η κατανάλωση ενέργειας είναι μεγάλες. Σε εργαστηριακό επίπεδο έχουν γίνει πολλές δοκιμές σε διάφορες βιομάζες όπως είναι ο φλοιός μανταρινιού, πορτοκαλιού, λεμονιού, φιστικιού και πατάτας αλλά και σε φασόλι, τομάτα, ιβίσκο και άλλα πολλά. Μερικές από τις περιπτώσεις των εκχυλίσεων υποβοηθούμενων από μικροκύματα σε φλοιό ροδιού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 10, στις βέλτιστες συνθήκες που κατέληξε η κάθε έρευνα.

Πίνακας 10: Παραδείγματα εκχύλισης φλοιού ροδιού υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Διαλύτης	Χρόνος (min)	Ισχύς (W)	TPC (mg GAE/ g dw)	Αναφορές
Νερό	1	600	210,36	[78]
Νερό	10	300	23,6	[79]
50% Αιθανόλη - 50% Νερό (w/w)	4	600	199,4	[40]

Στην τελευταία περίπτωση μάλιστα μετρήθηκε και η ανάκτηση πουνικαλαγίνης, η οποία μετρήθηκε σε 199,4 mg Punicalagin/g dw. [40]

1.3.5 Εναλλακτικοί μέθοδοι εκχύλισης φλοιών ροδιού

Εκτός από τις παραπάνω μεθόδους εκχύλισης, έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία και άλλες τεχνικές εκχύλισης της στερεάς φάσης, όπως με χρήση μεμβρανών και μεσολάβησης επιφανειοδραστικών ενώσεων. Οι μέθοδοι αυτοί μειώνουν την κατανάλωση διαλύτη και δεν χρειάζεται μετά την εκχύλιση να διαχωριστούν οι εκχυλιζόμενες ουσίες από τον διαλύτη αλλά κυρίως είναι πιο αποτελεσματικές και βελτιώνουν την επιλεκτικότητα και την κινητική της εκχύλισης. [80] Άλλες σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης είναι η εκχύλιση με εφαρμογή πίεσης, η ενζυμική εκχύλιση, η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων, η εκχύλιση σημείου νέφωσης (cloud point extraction) και πρόσφατα η εκχύλιση υδατικών διαλυμάτων υποβοηθούμενη από μικροκύματα σε κενό. Τέλος, τεχνολογίες όπως είναι η εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης, τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία και η ωμική θέρμανση μπορούν να συμβάλουν στην βελτιστοποίηση της εκχύλισης βιοδραστικών συστατικών από το φλοιό του ροδιού. [7]

Η υγρή εκχύλιση υπό πίεση (PLE) είναι μια μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιεί υγρούς διαλύτες σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης. Η μέθοδος πλεονεκτεί μιας και οι διαλύτες βρίσκονται σε θερμοκρασίες πάνω από το ατμοσφαιρικό σημείο βρασμού τους και τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας ευνοούνται αφού η διαλυτότητα των διαλυτών είναι αυξημένη, ο ρυθμός διάχυσης αυξάνεται, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση μειώνεται. Ακόμη η υψηλή πίεση είναι η κινούσα δύναμη για τη διείδυση του διαλύτη στους πόρους της βιομάζας. Η πίεση που εφαρμόζεται συνήθως είναι μεταξύ 4 έως 20 Mpa, ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο διαλύτης θα είναι στην υγρή του φάση. Σημαντικοί παράγοντες σε αυτή την εκχύλιση είναι το μέγεθος των σωματιδίων, η θερμοκρασία εκχύλισης και ο χρόνος. [7]

Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης πολυσακχαριτών και ελαίων από φυτικούς ιστούς λόγω του φαινομένου της "σπηλαίωσης". Τα υπερηχητικά κύματα δημιουργούν φυσαλίδες προκαλώντας έτσι κατακερματισμό και αποσταθεροποίηση της βιολογικής μήτρας, ενισχύοντας έτσι τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Ο διαλύτης εισέρχεται πιο εύκολα στην βιομάζα λόγω της καταστροφής του κυτταρικού τοιχώματος από τους υπέρηχους και τελικά γίνεται πιο αποτελεσματική η απελευθέρωση ενώσεων. Η εκχύλιση χρησιμοποιεί τεχνική είτε συνεχούς (CUAE) είτε ασυνεχούς παλμικού υπερήχου (PUAE). Οι υπέρηχοι διαδίδονται με ελάχιστη συχνότητα 16 kHz και προκαλεί την κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραίωσης. Τα θετικά της χρήσης των υπερήχων είναι ότι μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα, αλλά κυρίως ότι μπορούν να εκχυλιστούν θερμικά ασταθείς ενώσεις. [7, 66, 81, 82]

Μερικές εφαρμογές της εκχύλισης με υπερήχους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 11.

Πίνακας 11: Παραδείγματα εκχύλισης ροδιού υποβοηθούμενη από υπερήχους

Διαλύτης	Χρόνος(min)	TPC (mg GAE/ g dw)	Αναφορές
Νερό	6	148	[56]
50% Αιθανόλη -50% Νερό κ.β	30	91,99	[83]
70% Αιθανόλη -30% Νερό κ.β	10	318,71	[84]
Νερό	10	35,6	[79]
59% Αιθανόλη - 41% Νερό κ.β	25	157,3	[85]
Νερό	10	119,82	[40]
Νερό	6,2	42,20 mg TAE/ g dw	[86]

Από τον Πίνακα 11 φαίνεται πως η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι καλύτερη για μίγματα αιθανόλης- νερού, από ότι με καθαρό νερό.

Μια άλλη εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης είναι με την βοήθεια παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) και ηλεκτρικής εκκένωσης υψηλής τάσης (HVED). Και οι δύο μέθοδοι έχουν δείξει αύξηση της απόδοσης τόσο σε σχέση με την συμβατική εκχύλιση αλλά και σε σύγκριση με εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα ή υπερήχους. Η εκχύλιση με τη χρήση PEF βασίζεται στη δημιουργία μεμβράνης ηλεκτροδιάλυσης, η οποία επιταχύνει τις διαδικασίες μεταφοράς μάζας, ενώ με την μέθοδο HVED, οι ηλεκτροϋδραυλικές εκκενώσεις ενεργοποιούν χημικές αντιδράσεις και ενισχύουν τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Οι παραπάνω μέθοδοι δείχνουν να επιλύουν και το πρόβλημα της εκλεκτικότητας μιας και η PEF φαίνεται να εκχυλίζει επιλεκτικά ελλαγικό οξύ ενώ η HVED ενίσχυσε την εκχύλιση του γαλλικού οξέος, σε σύγκριση με συμβατικές μεθόδους. [7]

Τέλος ο φλοιός του ροδιού μπορεί να εκχυλιστεί και με την πράσινη μέθοδο της υπερκρίσιμης εκχύλισης (SFE) με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SC-CO₂), μιας και με αυτή την μέθοδο μπορεί να ληφθούν καθαρά εκχυλίσματα, πολύ χρήσιμα για τρόφιμα και διατροφικά/φαρμακευτικά προϊόντα. Επειδή, δυστυχώς οι φαινολικές ενώσεις δεν είναι διαλυτές στο SC-CO₂, λόγω της πολικής τους φύσης, είναι αναγκαία είτε η χρήση ενός πολικού συν-διαλύτη είτε η εφαρμογή της υπερκρίσιμης εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων (EASCFE). [7]

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Υλικά

Στον παρακάτω πίνακα 12 παρουσιάζονται όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, ο αριθμός CAS, ο προμηθευτής και η καθαρότητα.

Πίνακας 12: Λίστα υλικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων

Χημική Ονομασία	Αριθμός CAS	Προμηθευτής	Καθαρότητα %
Ethanol	64-17-5	Fisher Chemical	≥99,8
Water (HPLC Gradient Grade)	7732-18-5	Fisher Chemical	≥99,9
Choline Chloride	67-48-1	Acros Organics	99
1,2 Butanediol	584-03-2	Sigma-Aldrich	≥98
1,4 Butanediol	110-63-4	Acros Organics	≥99
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (free radical)	1896-66-4	Alfa Aesar	95
Folin Ciocalteau's Reagent		Carlo Erba Reagents	
Na ₂ CO ₃	497-19-8	Fisher Bioreagents	≥99,5
NaOH	1310-73-2	Merck	
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2carboxylic acid)	52188-07-1	Acros Organics	97
Gallic Acid	149-91-7	Acros Organics	98

2.2 Επεξεργασία φλοιού ροδιού

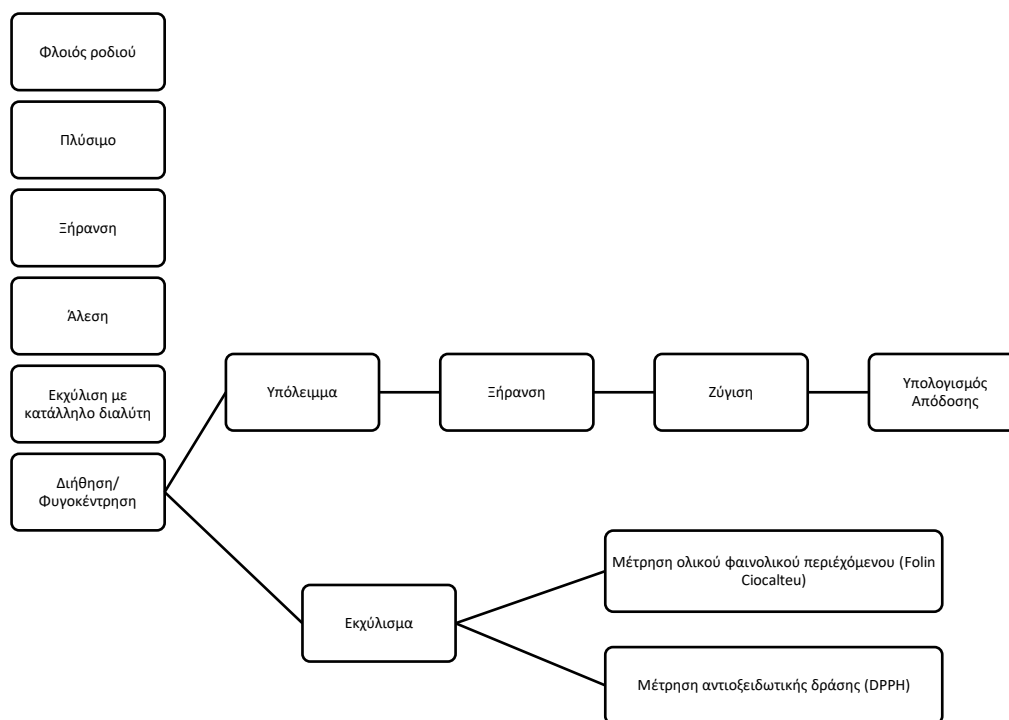
Τα ρόδια τα οποία εξετάστηκαν ανήκουν στην ποικιλία ACCO. Καθαρίστηκαν και ο φλοιός τους πλύθηκε με απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν χυμός ή ακαθαρσία που προέκυψε κατά τον καθαρισμό. Στην συνέχεια, ο φλοιός του ροδιού, οδηγήθηκε για ξήρανση σε φούρνο στους 50 °C για 24 h. Το ποσοστό υγρασίας που απομακρύνθηκε ήταν 24,7%. Στην συνέχεια αλέσθηκε ο φλοιός με μύλο και τέλος η βιομάζα οδηγείται σε πρότυπα κόσκινα για κοσκίνισμα σε τάρακτρο ώστε η κοκκομετρία της βιομάζας να είναι κάτω από 100μm. [40] Η βιομάζα φυλάσσεται σε κλειστό δοχείο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.3 Σύνθεση DES

Παρασκευάστηκαν 2 διαλύτες DES: η χλωριούχος χολίνη/1,2 βουτανοδιόλη σε αναλογία 1:4 κατά mol (DES 1) και η χλωριούχος χολίνη/1,4 βουτανοδιόλη σε αναλογία 1:4 κατά mol (DES 2). Αρχικά η χλωριούχος χολίνη λόγω της υγροσκοπικής της φύσης οδηγήθηκε για ξήρανση υπό κενό στους 50 °C για τουλάχιστον 3h. Σε σφαιρική φιάλη γίνεται απλή ανάμιξη των συστατικών στις κατάλληλες αναλογίες με ταυτόχρονη θέρμανση στους 70 °C και τοποθετείται ψυκτήρας ώστε να μην εξατμιστεί κάποιο από τα συστατικά. Η σύνθεση πραγματοποιείται σε αδρανές περιβάλλον με διοχέτευση αζώτου. Έπειτα από 1h όπου το διάλυμα έχει γίνει διαυγές αφαιρείται ο ψυκτήρας και η ήπια ανάδευση συνεχίζεται για 24h σε αδρανείς συνθήκες. Έπειτα οι διαλύτες οδηγήθηκαν προς ξήρανση πριν την χρήση τους στην εκχύλιση για τουλάχιστον 5h. Έπειτα αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυλάσσονται σε ξηραντήρα.

2.4 Διαδικασία εκχύλισης

Η κύρια ποριά της πειραματικής διαδικασίας περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα 5.



Εικόνα 5: Πορεία πειραματικής διαδικασίας

2.4.1 Κλασική εκχύλιση

Τα πειράματα υγρής εκχύλισης με συμβατική μέθοδο (maceration) διεξήχθησαν όλα σε δοχείο διπλού τοιχώματος, όπου η ανάδευση επιτυγχάνεται με την χρήση μαγνητικής πλάκας. Στο δοχείο αναμιγνύεται βιομάζα και διαλύτης στην επιθυμητή αναλογία κάθε φορά. Η θέρμανση του μίγματος γίνεται με την βοήθεια κυκλοφορητή (Julabo F12), με μέσο θέρμανσης να είναι το νερό και η ακρίβεια μέτρησης θερμοκρασίας είναι ± 0.01 °C. Τέλος τοποθετείται ψυκτήρας, με ψυκτικό μέσο το νερό, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύτη. Το νερό ήταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, δηλαδή περίπου 18-20°C.

Η εκχύλιση με την κλασική μέθοδο με ανάδευση είχε ως χρόνο εκχύλισης τις 24h και ταχύτητα ανάδευσης 300rpm. Οι διαλύτες που εξετάστηκαν είναι: καθαρό νερό, 50% αιθανόλη-νερό, 70% αιθανόλη-νερό και καθαρή αιθανόλη, χλωριούχος χολίνη- 1,2 βουτανοδιόλη και χλωριούχος χολίνη- 1,4 βουτανοδιόλη. Ακόμα εξετάστηκαν 2 αναλογίες διαλύτη/βιομάζα: 10:1 και 20:1 καθώς και 2 θερμοκρασίες οι 50°C και οι 70 °C.

Μετά το πέρας της εκχύλισης και αφού το δοχείο εκχύλισης έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γίνεται διήθηση υπό κενό. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση εκχύλισης με διαλύτη το καθαρό νερό και τα DESs ήταν αδύνατη η διήθηση υπό κενό, γι' αυτό το λόγο έγινε φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό του εκχυλίσματος από το υπόλειμμα.

Το εκχύλισμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία κατάψυξης (-18 °C) έως ότου γίνει ανάλυση, στην περίπτωση των εκχυλισμάτων από συμβατικούς διαλύτες. Τα εκχυλίσματα με διαλύτες τα DESs, φυλάσσονται σε θερμοκρασία ψυγείου (4°C). Το στερεό υπόλειμμα οδηγείται σε φούρνο υπό κενό στους 50 °C για τουλάχιστον 3 ώρες, έως ότου η μάζα του παραμένει σταθερή και έπειτα από ζύγιση υπολογίζεται η απόδοση.

2.4.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Τα πειράματα υγρής εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα διεξήχθησαν σε δοχεία διπλού τοιχώματος όγκου 100mL, όπου η ανάδευση επιτυγχάνεται με χρήση μαγνήτη. Στην περίπτωση των πειραμάτων με διαλύτη το χλωριούχου χολίνη- 1,2 βουτανοδιόλης η ανάδευση με μαγνήτη ήταν αδύνατη γι' αυτό εφαρμόστηκε μηχανική ανάδευση. Η θέρμανση/ψύξη του μείγματος επιτυγχάνεται με την βοήθεια κυκλοφορητή (Julabo F12) με ψυκτικό μέσο το νερό και η ακρίβεια μέτρησης θερμοκρασίας είναι $\pm 0,01$ °C. Η διάταξη συμπληρώνεται με ψυκτήρα ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα εξάτμισης. Στα πειράματα με διαλύτη το χλωριούχου χολίνη-1,2 βουτανοδιόλης, λόγω της μηχανικής ανάδευσης δεν προστέθηκε ψυκτήρας. Βέβαια οι DES διαλύτες δεν εξατμίζονται λόγω της αμελητέας τάσης ατμών τους, οπότε ο ψυκτήρας θα ήταν περιττή προσθήκη.

Έπειτα από το πέρας της εκχύλισης τα μίγματα είτε διηθήθηκαν υπό κενό, στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι 50% αιθανόλη-νερό, είτε φυγοκεντρήθηκαν στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι χλωριούχου χολίνη-1,2 βουτανοδιόλης και τα εκχυλίσματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη ή στο ψυγείο έως ότου γίνει η ανάλυση τους.

Τα πειράματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα έγιναν με διαλύτες 50% αιθανόλη-νερό, από συμβατικό διαλύτη και χλωριούχου χολίνη-1,2 βουτανοδιόλης, από DES. Η επιλογή έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης αλλά και σύμφωνα με την βιβλιογραφία. [40]

2.5 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός για τα πειράματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα έγινε με την βοήθεια του Design Expert 7.0.0 και εφαρμόστηκε Central Composite Design για την αποτελεσματική μελέτη των 4 λειτουργικών παραμέτρων της εκχύλισης με μικροκύματα σε 3 επίπεδα (-1, 0, +1). Για τον συσχετισμό των δεδομένων εφαρμόστηκε η μέθοδος των επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology).

Ο πειραματικός σχεδιασμός των επιφανειών απόκρισης περιλαμβάνει 26 πειράματα για κάθε διαλύτη. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι ο χρόνος εκχύλισης (5min-30min), η ισχύς (300W-700W), η θερμοκρασία (40°C-60 °C) και ο λόγος διαλύτη/βιομάζα (10/1-30/1). Οι

μεταβλητές απόκρισης είναι η αντιοξειδωτική δράση και η συνολική συγκέντρωση φαινολικών.

2.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα του DPPH διαλύοντας 1,6 mg ελεύθερης ρίζας DPPH* σε 50ml αιθανόλης και ανάδευση αυτού για 20min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Λόγω της φωτοευαισθησίας της ρίζας του DPPH*, το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι.

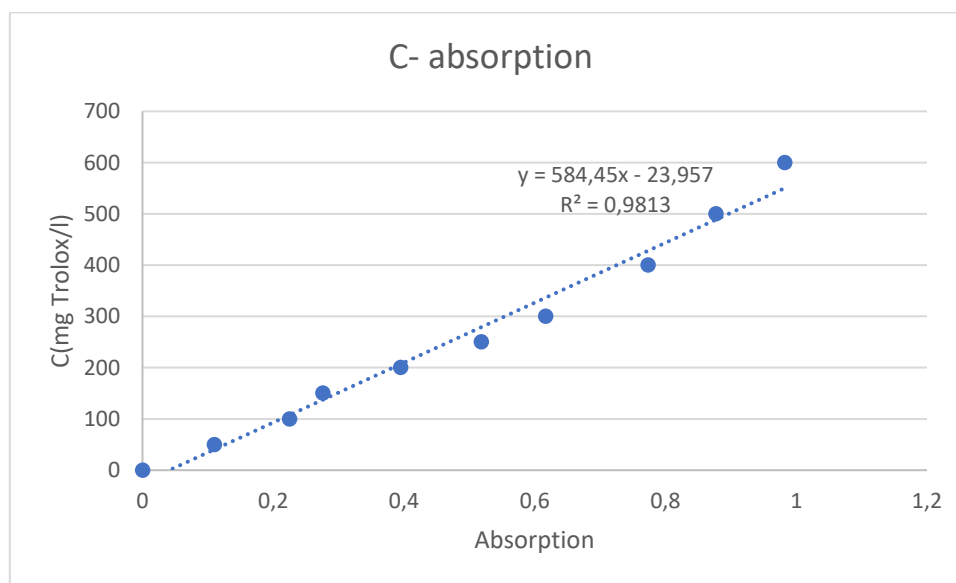
Το φασματοφωτόμετρο (UV-Vis Bel Photonics UV-M51) ρυθμίζεται στα 515nm και γίνεται μηδενισμός με αιθανόλη. Προστίθεται στις κυψελίδες 3,9ml διαλύματος DPPH* και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης. Στην συνέχεια προστίθεται σε αυτό 0,1ml εκχυλίσματος ή αραιωμένου διαλύματος αυτού, γίνεται ανάδευση σε Vortex και έπειτα από 30min γίνεται μέτρηση της απορρόφησης. Λόγω του έντονου χρώματος των εκχυλισμάτων μετρείται και η απορρόφηση αυτού αναμειγνύοντας 3,9 ml αιθανόλης με 0,1ml εκχυλίσματος ή αραιωμένου διαλύματος αυτού.

Η απορρόφηση υπολογίζεται από την εξίσωση [87]:

$$(ABS_{DPPH} - (ABS_{extract} - ABS_{colour}))/ABS_{DPPH}$$

Εξίσωση 1: Υπολογισμός της απορρόφησης της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση, για λόγους σύγκρισης, εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ή TAEC σε mg Trolox/ l), γι' αυτό κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων Trolox με διαλύτη την αιθανόλη σε συγκεντρώσεις από 0 – 600 mg/ l. Η απορρόφηση υπολογίζεται από την σχέση $(ABS_{DPPH} - ABS_{Trolox})/ABS_{DPPH}$. Για το κάθε διάλυμα ακολουθήθηκε ανάλυση με την μέθοδο DPPH που αναφέρεται παραπάνω και κατασκευάστηκε έτσι η καμπύλη αναφοράς που απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη Αναφοράς Trolox

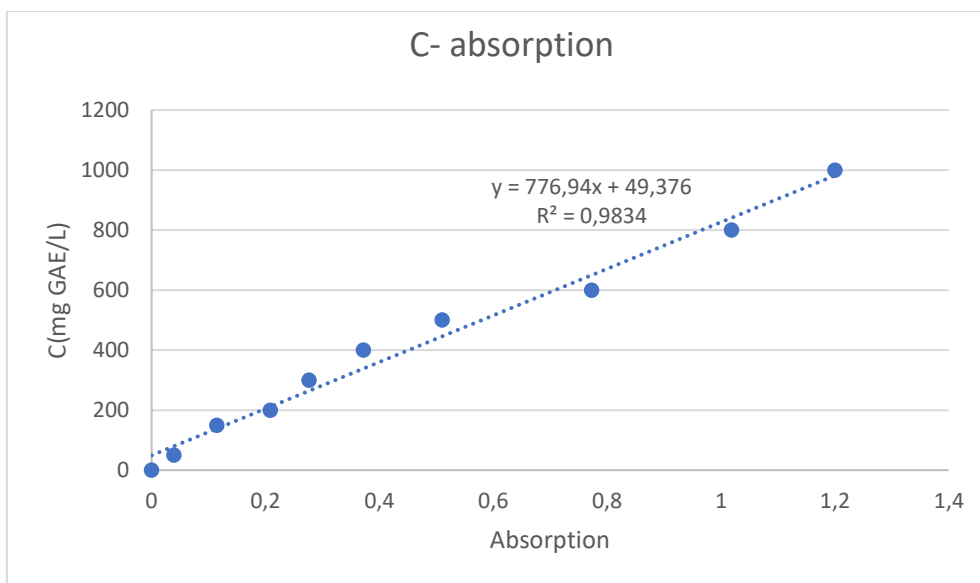
Αντίστοιχα και για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε IC50, ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος αραιώθηκε σε αιθανόλη ή νερό (ανάλογα με τον διαλύτη όπου έγινε η εκχύλιση) σε αναλογία από 50 έως και 1000ppm. Έπειτα ακολουθεί η παραπάνω διαδικασία αντικαθιστώντας το 0,1ml εκχυλίσματος, με 0,1ml του διαλύματος. Έπειτα αφού η αντιοξειδωτική δράση εκφραστεί σε ισοδύναμα Trolox, δημιουργείται καμπύλη συγκέντρωσης εκχυλίσματος- % μείωση της συγκέντρωσης και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο 50% της απορρόφησης της ρίζας.

2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών, αρχικά αναμιγνύονται 7,9 ml απιονισμένου νερού και 0,1 ml αραιωμένου εκχυλίσματος και γίνεται ανάδευση σε vortex. Στην συνέχεια προστίθενται 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu's Reagent και 1,5 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) συγκέντρωσης 1M. Ακολουθεί εκ νέου ανάδευση σε vortex και στην συνέχεια προστίθεται το μίγμα σε υδρόλουτρο στους 40 °C για 30min. Έπειτα γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 765nm αφού έχει προηγηθεί μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου με νερό. Ακόμη γίνεται και μέτρηση τυφλού δείγματος, δηλαδή χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος (8 ml απιονισμένου νερού, 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu's Reagent και 1,5 ml Na_2CO_3) και η τιμή αυτή αφαιρείται από την απορρόφηση κάθε δείγματος με εκχύλισμα.

Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα ήταν αδύνατη η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο αφού το διάλυμα έπαιρνε βαθύ μπλε χρώμα απευθείας. Γι' αυτό το λόγω τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν σε διάφορες αναλογίες. Για να γίνει η αναγωγή της απορρόφησης που θα είχε το αρχικό εκχύλισμα κατασκευάστηκαν καμπύλες απορρόφησης-συγκέντρωσης εκχυλίσματος. Όλες οι καμπύλες είχαν γραμμικό χαρακτήρα και από αυτό έγινε η αναγωγή της απορρόφησης σε καθαρό εκχύλισμα.

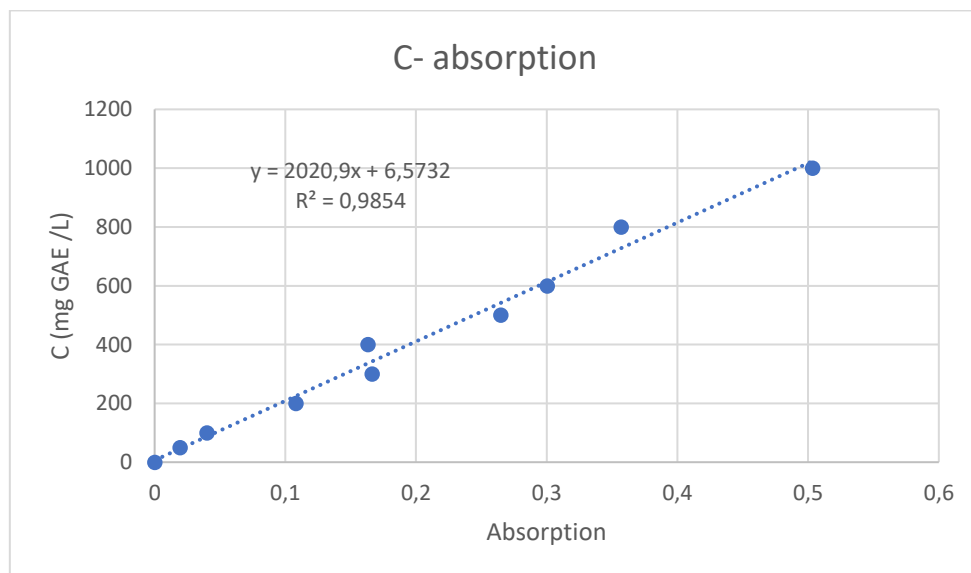
Οι ολικές φαινολικές ενώσεις στα εκχυλίσματα εκφράζεται σε ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος (Gallic Acid). Κατασκευάστηκε για αυτό το λόγο καμπύλη αναφοράς για πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 0 - 1000 mg/l, ακολουθώντας την μέθοδο Folin Ciocalteu. Η καμπύλη αναφοράς για διαλύματα γαλλικού οξέος σε αιθανόλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με την μέθοδο Folin – Ciocalteu

Σε εκχυλίσματα με DES για ρύθμιση του pH προστέθηκαν και 3 ml καυστικού νατρίου (NaOH) 1M, καθώς το μίγμα θολώνει κατά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu's Reagent.

Η καμπύλη αναφοράς για διαλύματα γαλλικού οξέος σε αιθανόλη προσαρμοσμένη για τους DESs διαλύτες φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη Αναφοράς γαλλικού οξέος προσαρμοσμένη για DES

2.8 Μέτρηση πυκνότητας διαλύτη DES

Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του διαλύτη 70% χλωριούχος χολίνη-30% αιθανόλη, χρησιμοποιήθηκε το πυκνόμετρο Density/ Specific Gravity Meter DA-640B της εταιρείας Kyoto

- ΚΕΜ. Το δείγμα εισήλθε μέσω ένεσης σε έναν λεπτό σωλήνα σε σχήμα U μέχρι πλήρωσης και τέθηκε σε ταλάντωση μέσω μίας ηλεκτρικής πηγής. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για εύρος θερμοκρασίας 40-60 °C, με βήμα 10 °C.

2.9 Μέτρηση ιξώδους διαλύτη DES

Για τον προσδιορισμό του ιξώδους του διαλύτη 70% χλωριούχος χολίνη-30% αιθανόλη, χρησιμοποιήθηκε το περιστροφικό ιξωδόμετρο DV1 Viscometer της εταιρείας BROOKFIELD. 6,7 ml του δείγματος τοποθετήθηκαν σε έναν σταθερό μεταλλικό κύλινδρο, στον οποίο κυκλοφορεί νερό ελεγχόμενης θερμοκρασίας, με τη βοήθεια του κυκλοφορητή (Julabo F12). Ένας μικρότερος κύλινδρος βυθίστηκε στο κυλινδρικό δοχείο και τέθηκε σε περιστροφή, με συγκεκριμένη ταχύτητα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τρεις (3) διαφορετικές ταχύτητες περιστροφής για κάθε θερμοκρασία, στο εύρος 40-60 °C, με βήμα 10 °C. Η τιμή του ιξώδους λαμβάνεται μετά το πέρας χρονικού διαστήματος πέντε (5) λεπτών, έτσι ώστε να εξεταστεί πιθανή χρονική εξάρτηση του ιξώδους.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση μετρήσεων

3.1 Εισαγωγή

Για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού διεξάχθηκαν πειράματα κλασικής εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες το νερό, την αιθανόλη καθώς και μίγματα αυτών με κατά βάρος σύσταση 50% αιθανόλη- 50% νερό (50% EthOH-W) και 70% αιθανόλη-30% νερό (70% EthOH-W). Ακόμα έγιναν πειράματα κλασικής εκχύλισης χρησιμοποιώντας Βαθείς Ευτηκτικούς Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs), τον διαλύτη χλωριούχο χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη με αναλογία κατά mol 1:4 (DES 1) και χλωριούχο χολίνη/ 1,4 βουτανοδιόλη με κατά mol αναλογία 1:4 (DES 2). Τέλος στα πειράματα εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE) χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το μίγμα 50% αιθανόλη- 50% νερό, η χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη (DES 1) καθώς και μίγμα του DES1 με αιθανόλη 70-30 % κατά βάρος.

Για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης μελετήθηκε η συμπεριφορά ως προς: (α) την θερμοκρασία, στην κλασική εκχύλιση στους 50 και 70 °C και στην εκχύλιση με μικροκύματα σε εύρος 40-60 °C, (β) τον χρόνο, με εύρος 5-30 min στην MAE, ενώ στην κλασική έμεινε σταθερός 24h, (γ) τον λόγο διαλύτη/βιομάζα, όπου στην κλασική εκχύλιση ήταν 10:1 και 20:1, ενώ στην MAE είχε εύρος από 10:1 έως 30:1 και (δ) την ισχύ της MAE με εύρος 300-700W. Η κοκκομετρία της βιομάζας δεν μελετήθηκε ως παράμετρος και έμεινε σταθερή, κάτω από 100μm, καθώς και η ανάδευση η οποία έμεινε σταθερή με ταχύτητα 300rpm. Τα εκχυλίσματα με τους διαφορετικούς διαλύτες και τρόπους εκχύλισης αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (Antioxidant Capacity ή TEAC) και το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content ή TPC).

Για λόγους αιτιολόγησης των αποτελεσμάτων μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική δράση του ξηρού εκχυλίσματος (IC50), για την κλασική εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες. Ακόμα

μετρήθηκε και το ιξώδες και η πυκνότητα του μίγματος DES1-αιθανόλη, για θερμοκρασία 40-60°C και έγινε σύγκριση με παλιότερες μετρήσεις του καθαρού DES1.

3.2 Κλασική Εκχύλιση (Maceration)

3.2.1 Κλασική Εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες

3.2.1.1 Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες

Τα πειράματα την κλασικής εκχύλισης έγιναν για σταθερό χρόνο εκχύλισης, τις 24 h και η ανάδευση ήταν 300rpm. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν είναι οι εξής: (α) η αναλογία διαλύτη προς βιομάζα, για αναλογίες 10:1 και 20:1, (β) η θερμοκρασία, 50°C και 70 °C και (γ) ο διαλύτης, όπου σαν διαλύτες εξετάστηκαν το καθαρό νερό, η αιθανόλη και μίγματα αυτής με νερό σε αναλογία 50-50% και 70-30%. Η επιλογή των διαλυτών και των τιμών των παραμέτρων τις εκχύλισης επιλέχθηκαν με κριτήριο την βιβλιογραφία. [7, 57]

Στον παρακάτω Πίνακα 13 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την κάθε εκχύλιση. Η απόδοση για την εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες μετρήθηκε αφού το εκχύλισμα διηθήθηκε υπό κενό και υπολογίστηκε από την Εξίσωση 2.

$$\frac{(\text{Αρχικό Βάρος Βιομάζας} - \text{Υπόλειμμα εκχύλισης})}{\text{Αρχικό Βάρος Βιομάζας}} * 100\%$$

Εξίσωση 2: Σχέση υπολογισμού απόδοσης εκχύλισης

Το αρχικό βάρος της βιομάζας για τα πειράματα της κλασικής εκχύλισης είναι 7g.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox και υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς του Διάγραμμα 1. Η Εξίσωση 3 που υπολογίζει το TEAC είναι:

$$TEAC (mg/L) = 584,45 \cdot (ABS_{DPPH} - (ABS - ABS_{Colour})) - 23,957$$

Εξίσωση 3: Εξίσωση υπολογισμού TEAC σε ισοδύναμα Trolox

όπου ABS_{DPPH} η απορρόφηση (absorption) της ρίζας DPPH• , ABS η απορρόφηση του μείγματος DPPH• και εκχυλίσματος και ABS_{Colour} η απορρόφηση του εκχυλίσματος.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent ή GAE), το οποίο υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς του Διάγραμμα 2. Η εξίσωση που υπολογίζει το TPC είναι:

$$TPC (mg/L) = 776,94 \cdot (ABS - ABS_{Blind}) + 49,376$$

Εξίσωση 4: Εξίσωση υπολογισμού του TPC σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

όπου ABS_{Blind} η απορρόφηση (absorption) του τυφλού διαλύματος και ABS η απορρόφηση του διαλύματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο Folin Ciocalteu.

Κατά τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου διαπιστώθηκε ότι η ολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων είναι μεγάλη με αποτέλεσμα το διάλυμα να είναι βαθύ μπλε και να μην μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση του, επειδή το φασματοφωτόμετρο μετρά μέχρι απορρόφηση 4. Γι' αυτό τον λόγο αραιώθηκαν τα εκχυλίσματα με νερό ή αιθανόλη σε 3 αραιώσεις, μετρήθηκε το TPC για καθένα από αυτά και έπειτα ανάχθηκε η συγκέντρωση για καθαρό εκχύλισμα.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες

Solvent	L/S	T(°C)	%Yield	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
Water	10:1	50	24,3%	484,3	12359,8
Water	10:1	70	32,1%	539,6	12087,7
Water	20:1	50	29,8%	527,2	9655,4
Water	20:1	70	38,0%	472,5	7967,8
50%EthOH-W	10:1	50	49,4%	558,6	18948,2
50%EthOH-W	10:1	70	51,4%	547,0	14146,3
50%EthOH-W	20:1	50	64,5%	537,3	9619,1
50%EthOH-W	20:1	70	60,7%	509,2	9129,3
70%EthOH-W	10:1	50	59,2%	550,8	15915,5
70%EthOH-W	10:1	70	63,3%	531,4	12744,0
70%EthOH-W	20:1	50	64,7%	530,3	7929,1
70%EthOH-W	20:1	70	62,1%	508,2	7188,3
EthOH	10:1	50	47,8%	518,9	8956,3
EthOH	10:1	70	43,3%	510,3	8154,7
EthOH	20:1	50	45,5%	506,7	4907,0
EthOH	20:1	70	45,2%	501,4	4318,2

Από τον παραπάνω πίνακα 13 είναι φανερό πώς τόσο η απόδοση αλλά και η αντιοξειδωτική και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για τα εκχυλίσματα ροδιού είναι αρκετά υψηλές. Τα πειράματα με διαλύτη το νερό για συνθήκες 10:1, 50°C και 20:1, 70°C δεν ακολουθούν την τάση που ακολουθούν τα υπόλοιπα πειράματα και υπάρχει μια ανασφάλεια, για να μπορέσει να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα από αυτά.

Από τα αποτελέσματα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η ολική ποσότητα των φαινολικών ενώσεων, αυξάνεται και η αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις του ροδιού, με κυρίαρχη την πουνικαλαγίνη, δρουν ως αντιοξειδωτικά. [88] Εξαίρεση αποτελούν τα πειράματα με διαλύτη το νερό, όπου η αύξηση του TPC δεν συνδέεται με την αύξηση του TEAC. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το νερό, ως διαλύτης, δεν είναι ευνοϊκός στην εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων

με έντονη αντιοξειδωτική δράση, όπως η πουνικαλαγίνη, αλλά να είναι εκλεκτικός ως προς φαινολικές ενώσεις με μικρότερη αντιοξειδωτική δράση.

Ακόμα παρατηρείτε ότι η αντιοξειδωτική δράση και τα συνολικά φαινολικά αυξάνονται για μικρότερη θερμοκρασία και μικρότερη αναλογία διαλύτη/ βιομάζα, δηλαδή για τις συνθήκες 50 °C και αναλογία 10:1. Εδώ να τονιστεί ότι η μεταβολή της αναλογίας διαλύτη/ βιομάζα επιδρά πιο έντονα από ότι η μεταβολή της θερμοκρασία στο TPC. Το TEAC δεν έχει μεγάλες διακυμάνσεις για αυτές τις συνθήκες και διαλύτες που επιλέχθηκαν (μέση αντιοξειδωτική δράση 520mg Trolox/L). Τελικά από τα πειράματα που διεξήχθησαν για κλασική εκχύλιση με συμβατικούς διαλύτες, τις μέγιστες τιμές TEAC και TPC, έχει το εκχύλισμα με διαλύτη 50% αιθανόλη- 50% νερό, θερμοκρασία 50 °C και αναλογία διαλύτη/βιομάζα 10:1. Οι τιμές αυτές είναι 558,6 mg Trolox/L, η αντιοξειδωτική δράση και 18948,2 mg GAE/L.

Η σύγκριση με την βιβλιογραφία είναι δύσκολη μιας και απαιτείται να διεξαχθούν τα πειράματα στις ίδιες συνθήκες και για τους ίδιους διαλύτες. Επίσης η έκφραση που επιλέχθηκε να εκφραστούν το TEAC και TPC, δηλαδή ανά λίτρο εκχυλίσματος, δεν είναι το σύνηθες για την βιβλιογραφία, συνήθως εκφράζονται ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος, όμως για λόγους σύγκρισης των πειραμάτων αυτών με τα πειράματα με διαλύτη τα DESs, που η απομάκρυνση του διαλύτη είναι δύσκολη, έπρεπε να μετρηθούν ανά λίτρο διαλύματος.

Το TPC για τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, 50% αιθανόλη- 50% νερό, 50 °C και αναλογία 10:1, εκφρασμένο ανά γραμμάριο ξηρού δείγματος είναι 402,2 mg GAE/g. Η τιμή αυτή είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή της βιβλιογραφίας, όπου το εύρος για διάφορους διαλύτες είναι από 119-299 mg GAE/g. [6, 7, 57] Βέβαια στην βιβλιογραφία ο χρόνος εκχύλισης είναι μέχρι 6h, συνεπώς αυτός μπορεί να είναι και ο λόγος που το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο είναι αρκετά μεγαλύτερο, αφού τα πειράματα διεξήχθησαν για χρόνο 24h.

Ακόμη σύμφωνα με τον Πίνακα 1, η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για εκχύλισμα με διαλύτη 80% μεθανόλη -20% νερό (v/v) είναι 11856,3 mg GAE/L. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας οι τιμές του TPC για μίγματα αιθανόλης -νερού (50%-50% και 70%-30% κ.β) και για καθαρό νερό, σε συνθήκες 10:1 αναλογία διαλύτη/ βιομάζα και θερμοκρασίες 50 και 70 °C είναι μεγαλύτερες από αυτές της βιβλιογραφίας. Μάλιστα για την βέλτιστη συνθήκη, δηλαδή 50% αιθανόλη- 50% νερό, 50 °C και αναλογία 10:1, το TPC είναι 37% μεγαλύτερο από ότι της βιβλιογραφίας

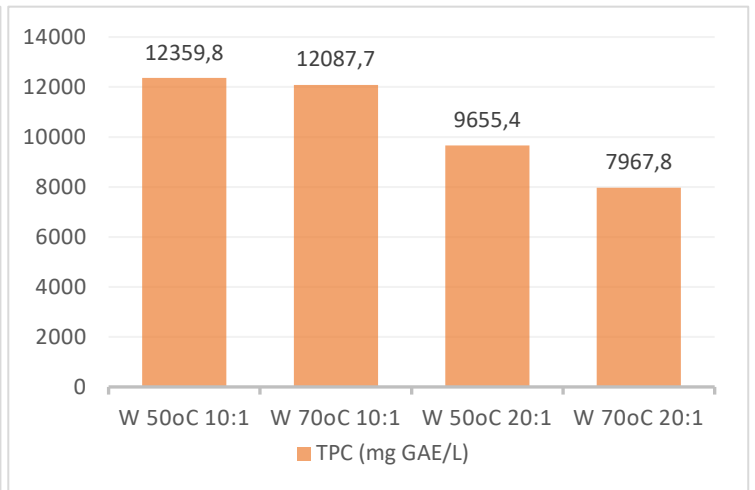
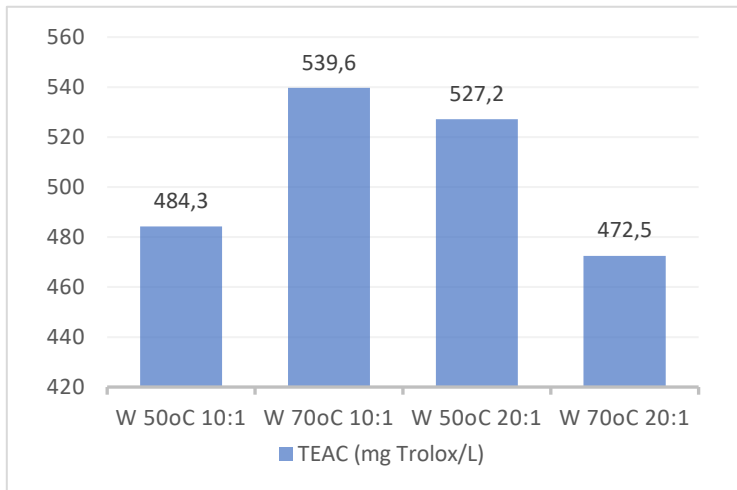
Ο Venkatamanamma et al. επίσης κατέληξε στο ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση από φλοιό ροδιού είναι: διαλύτης αιθανόλη- νερό σε αναλογία 1:1 κατά βάρος, αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 10:1 και χρόνο εκχύλισης 24h. [89]

Η απόδοση της εκχύλισης δεν συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ανάλογα το διαλύτη και τις συνθήκες μπορεί να εκχυλίζονται επιλεκτικά φαινολικές ενώσεις, οπότε η απόδοση να μην είναι τόσο μεγάλη αλλά η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων να είναι. Αντίστοιχα σε άλλες συνθήκες μπορεί να ευνοείται η εκχύλιση άλλων ενώσεων, όπως πρωτεϊνών ή διαλυμένων πολυσακχαρίτων και γι' αυτό μπορεί η απόδοση να είναι υψηλή ενώ η ολική συγκέντρωση των φαινολικών όχι τόσο. [5] Ακόμα οι εκχυλιζόμενες ουσίες μπορεί να δρουν παρεμποδίστηκα ως προς την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων. Στην βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί η ίδια συμπεριφορά, από τους Hayat et al., (2009) για εκχύλιση από φλοιό μανταρινιού, όπου η βέλτιστη αναλογία ήταν 16:1 και από τους Maran et al. (2013), για εκχύλιση πηκτίνης από φλοιούς πορτοκαλιού, όπου η βέλτιστη αναλογία ήταν 19,9:1. [90, 91]

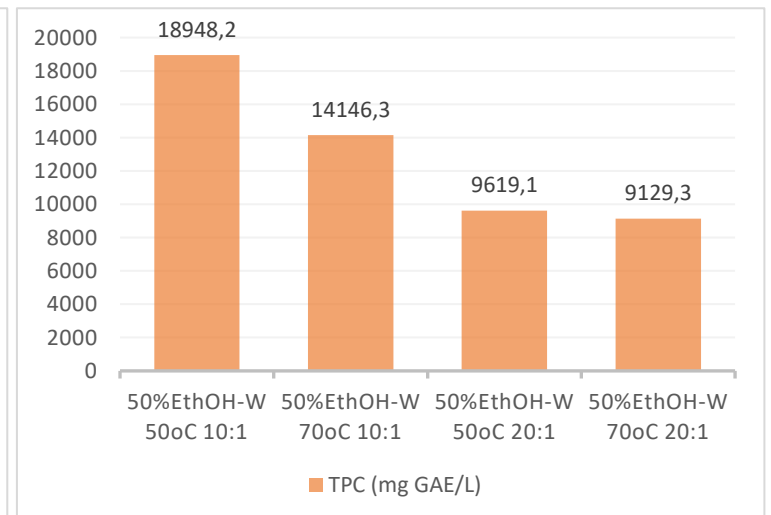
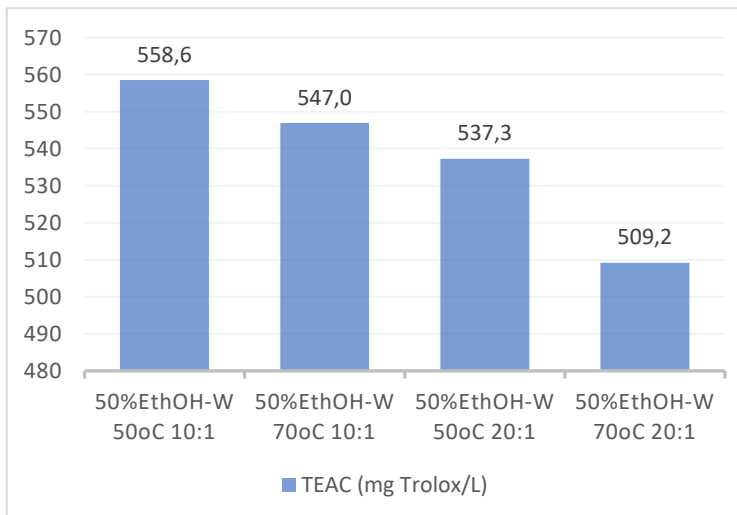
Παρατηρείται, ακόμη, ότι ανά διαλύτη η απόδοση έχει μικρές αποκλίσεις ανεξάρτητα από τις συνθήκες εκχύλισης.

3.2.1.2 Επίδραση θερμοκρασίας στην κλασική εκχύλιση

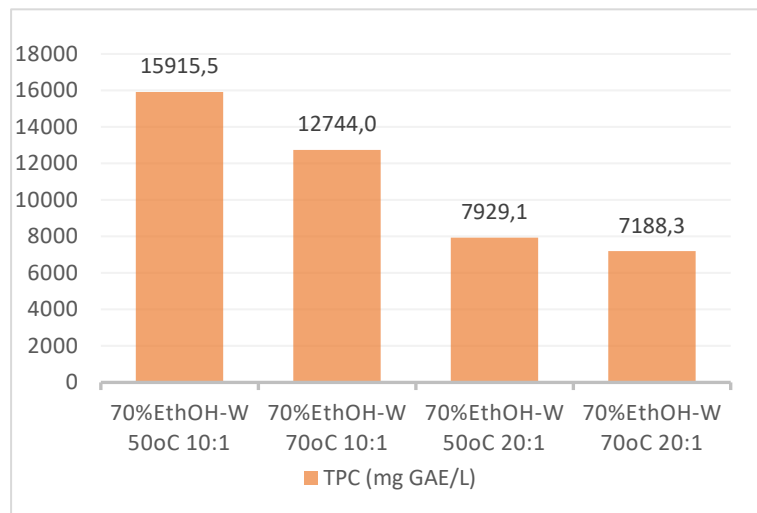
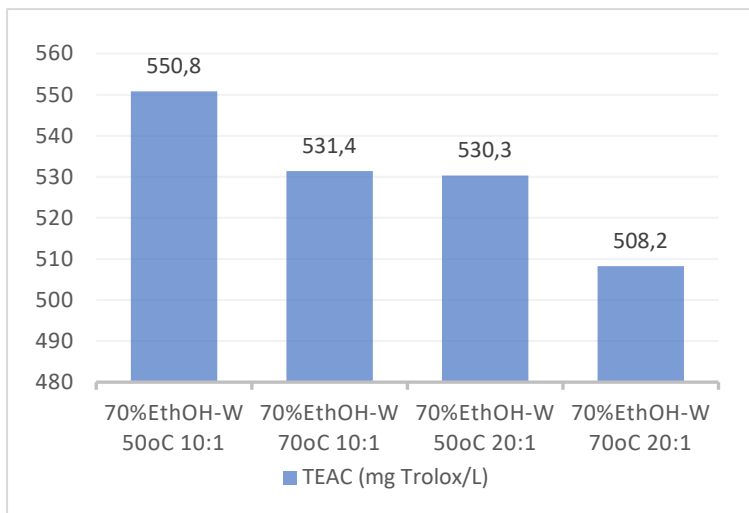
Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων των συμβατικών διαλυτών από τη θερμοκρασία απεικονίζονται στα Διαγράμματα 4 έως 7 αντίστοιχα.



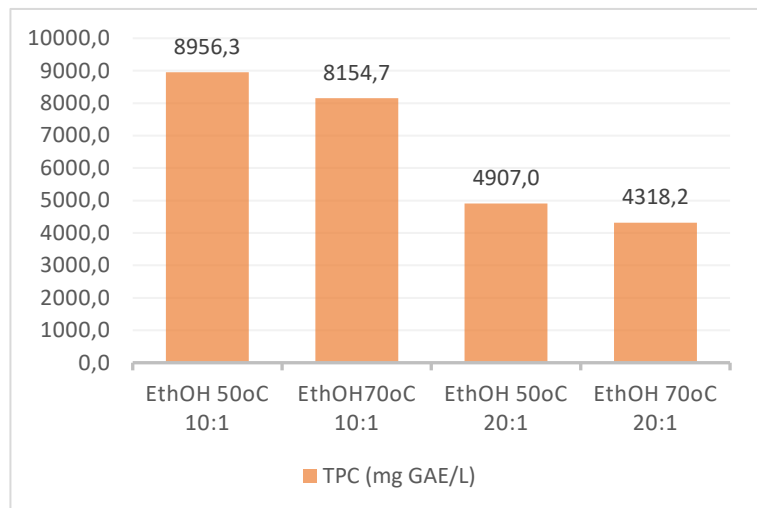
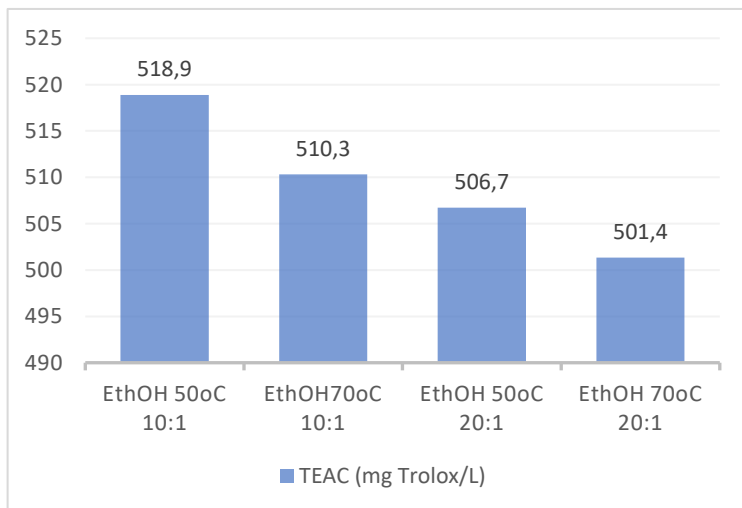
Διάγραμμα 4: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του νερού με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία.



Διάγραμμα 5: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 50% αιθανόλη-50% νερό με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία



Διάγραμμα 7: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 70% αιθανόλη-30% νερό με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία



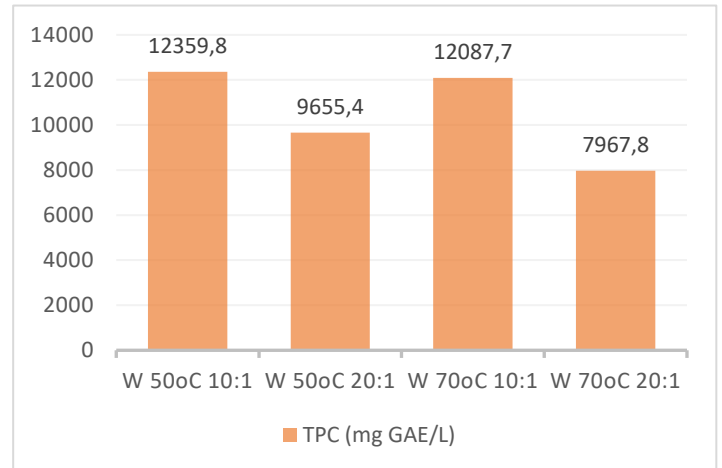
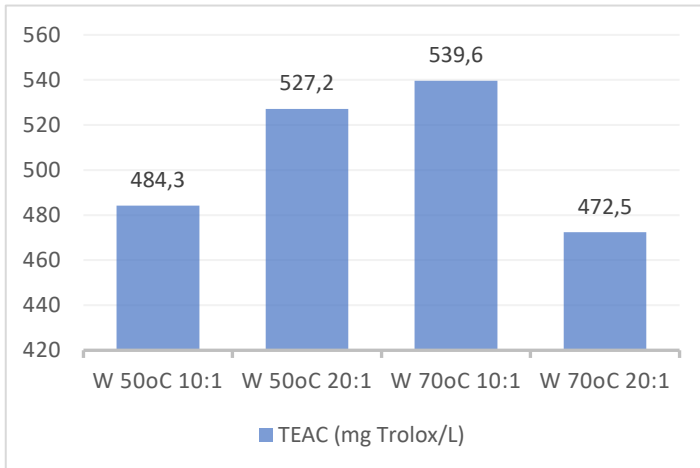
Διάγραμμα 6: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλη με κλασική εκχύλιση, από τη θερμοκρασία

Από τα παραπάνω Διαγράμματα 4 έως 7, παρατηρείτε ότι με αύξηση της θερμοκρασίας τόσο η αντιοξειδωτική όσο και η ολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων μειώνεται. Στην περίπτωση της αντιοξειδωτικής δράσης η μείωση της με την αύξηση της θερμοκρασίας, είναι μικρή, της τάξης κάτω του 10%. Εξάιρεση αποτελεί τα πειράματα με διαλύτη το νερό με αναλογία 10:1, όπου η αντιοξειδωτική δράση αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 50°C στους 70 °C. Η μείωση του συνολικού φαινολικού φορτίου με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι μεγαλύτερη με εύρος από 5% έως 25%.

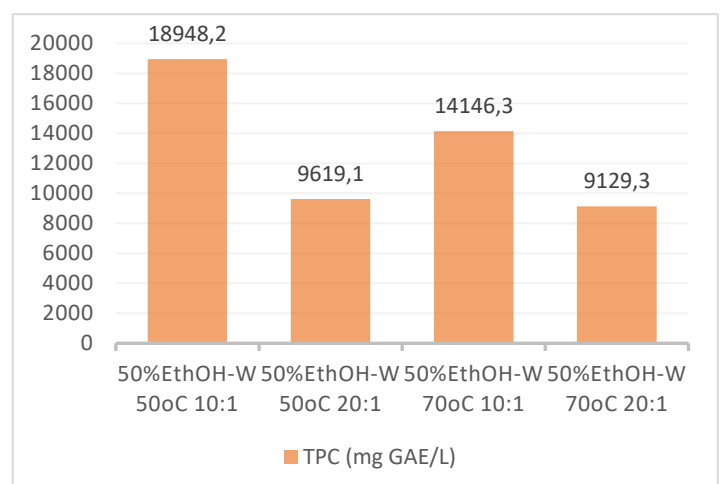
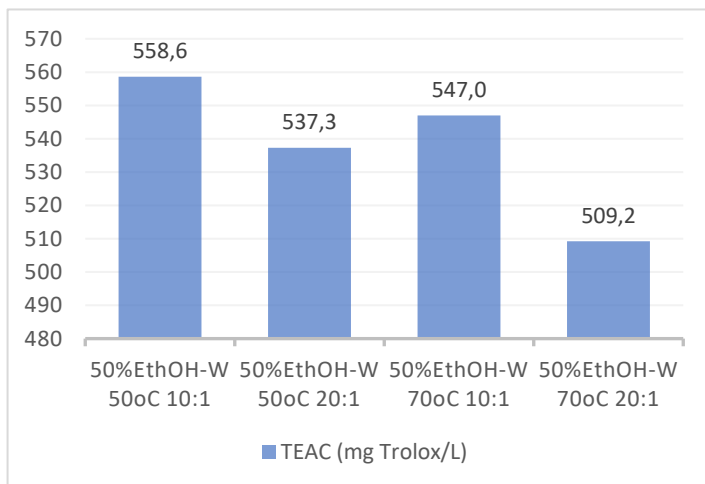
Η σχέση της θερμοκρασίας με το TEAC και την TPC οφείλεται στο γεγονός ότι οι βιοδραστικές ουσίες, όπως είναι τα φαινολικά, είναι θερμοευαίσθητες και επομένως καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτός είναι και ο λόγος που επιλέχθηκε η θερμοκρασία να μην ξεπερνάει τους 70 °C, όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία. [53, 54]

3.2.1.3 Επίδραση αναλογίας διαλύτη/βιομάζα στην κλασική εκχύλιση

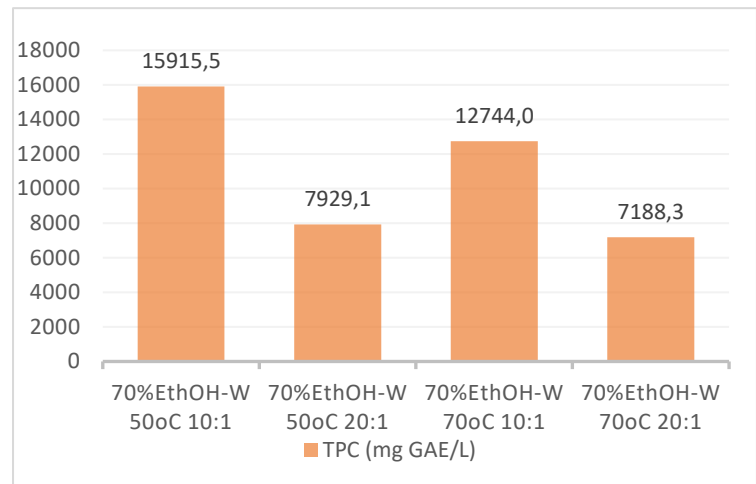
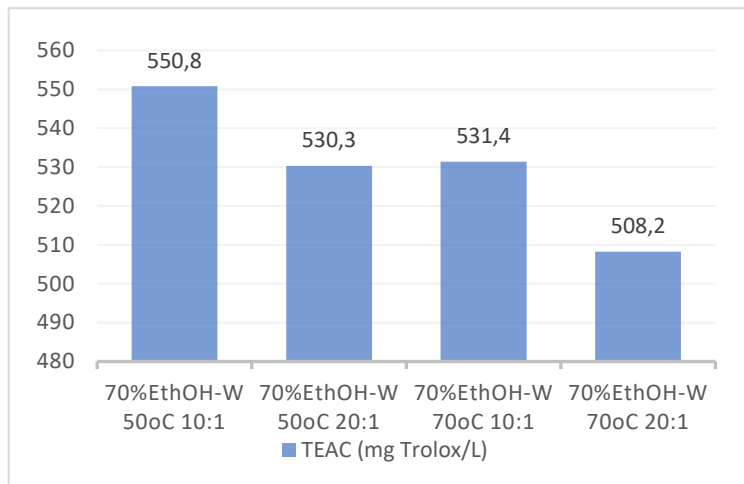
Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων των συμβατικών διαλυτών από την αναλογία διαλύτη /βιομάζα απεικονίζονται στα Διαγράμματα 8 έως 11 αντίστοιχα, διατηρώντας τον χρόνο σταθερό.



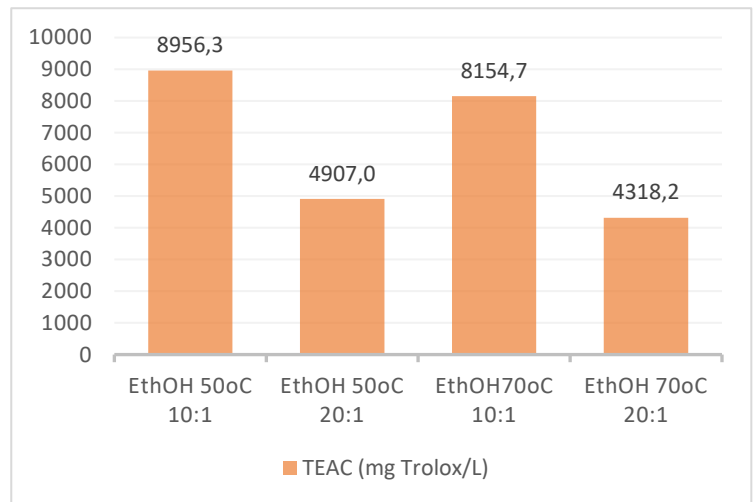
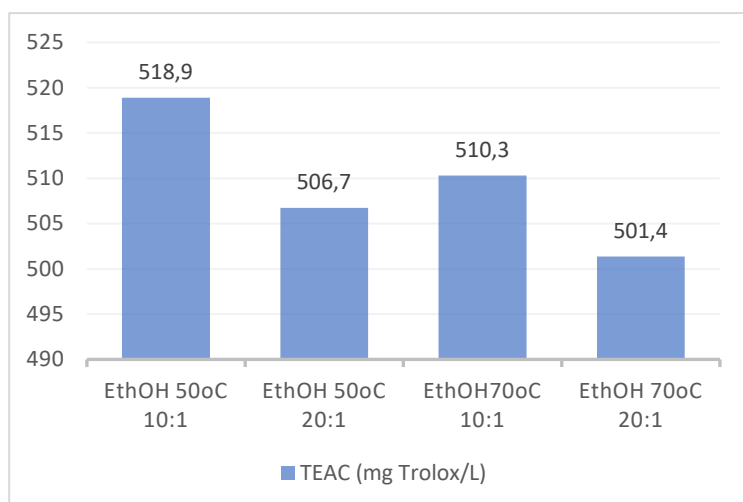
Διάγραμμα 8: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα



Διάγραμμα 9: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 50% αιθανόλη-50% νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα



Διάγραμμα 10: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων του μίγματος 70% αιθανόλη-30% νερό με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα



Διάγραμμα 11: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της αιθανόλης με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα

Από τα παραπάνω Διάγραμμα 8 - Διάγραμμα 11, είναι φανερό ότι με την αύξηση του διαλύτη τόσο το TEAC όσο και το TPC μειώνεται. Εξάιρεση αποτελούν πάλι τα πειράματα με διαλύτη το νερό στους 50 °C, όπου η αντιοξειδωτική δράση έχει μια αύξηση της τάξης του 10% από αναλογία 10:1 σε 20:1. Ακόμη παρατηρείται ότι η αύξηση του διαλύτη δεν επηρεάζει τόσο την αντιοξειδωτική δράση, αφού η μείωση είναι μεταξύ 2% έως 12%. Αντίθετα επηρεάζει πολύ την μείωση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, που φτάνει και σε μείωση 50% στο TPC (εύρος 22%-50%). Οπότε είναι φανερό πως η παράμετρος L/s είναι σημαντική για την απόδοση και την ποιότητα του συστήματος.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο λόγος L/s, σύμφωνα με τις αρχές μεταφοράς μάζας. Με την αύξηση του λόγου L/s, αυξάνεται και η διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ του υγρού διαλύτη και της στερεής

βιομάζας, που είναι η κινητήριος δύναμη για την μεταφορά μάζας. Ακόμη η μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη βοηθά στον διαποτισμό της βιομάζας, συμβάλλοντας στην ρήξη του φυτικού υλικού και στην ευκολότερη απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων εντός του διαλύτη. [92]

Βέβαια υπάρχει μια μέγιστη τιμή λόγου L/s και μετά από αυτή δεν μπορεί να εκχυλιστεί άλλη ποσότητα και απλά το εκχύλισμα αραιώνεται λόγω της επιπλέον ποσότητας διαλύτη. Για να τεκμηριωθεί αυτή η άποψη τα εκχυλίσματα οδηγήθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα για απομάκρυνση του διαλύτη και έπειτα σε φούρνο υπό κενό στους 50 °C για απομάκρυνση τυχόν υγρασίας. Στην συνέχεια το ξηρό εκχύλισμα διαλύεται σε διαλύτη, είτε αιθανόλη είτε νερό, και μετράτε η αντιοξειδωτική δράση του σε IC50 και η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για συγκέντρωση εκχυλίσματος 500ppm. Τα αποτελέσματα για το ξηρό εκχύλισμα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 14.

Πίνακας 14: Αντιοξειδωτική δράση IC50 και ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για συγκέντρωση δείγματος 500 mg_{extract}/L_{solvent}

L/S	T(°C)	Solvent	IC50 (mg Trolox/L)	TPC(mgGA/L)
10:1	50	Water	529,4	192,6
10:1	70	Water	298,6	190,6
20:1	50	Water	329,4	187,5
20:1	70	Water	571,8	184,1
10:1	50	50%EthOH-W	254,1	201,1
10:1	70	50%EthOH-W	322,5	193,1
20:1	50	50%EthOH-W	380,8	191,9
20:1	70	50%EthOH-W	430,3	190,6
10:1	50	70%EthOH-W	271,2	194,7
10:1	70	70%EthOH-W	275,1	191,6
20:1	50	70%EthOH-W	325,6	185,3
20:1	70	70%EthOH-W	367,3	180,0
10:1	50	EthOH	246,3	194,5
10:1	70	EthOH	294,2	180,3
20:1	50	EthOH	298,1	180,1
20:1	70	EthOH	307,7	172,9

Η έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης σε IC50 εκφράζει την συγκέντρωση εκείνη του εκχυλίσματος που εξουδετερώνει το 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH, με την μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.6. Δηλαδή, με αυτή την έκφραση, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έχουν τα εκχυλίσματα με μικρότερο IC50. Αυτό έρχεται και σε συμφωνία με τα όσα παρουσιάζονται στον πίνακα 13, καθώς όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και ο λόγος L/s το IC50 αυξάνεται, δηλαδή η αντιοξειδωτική δράση μειώνεται.

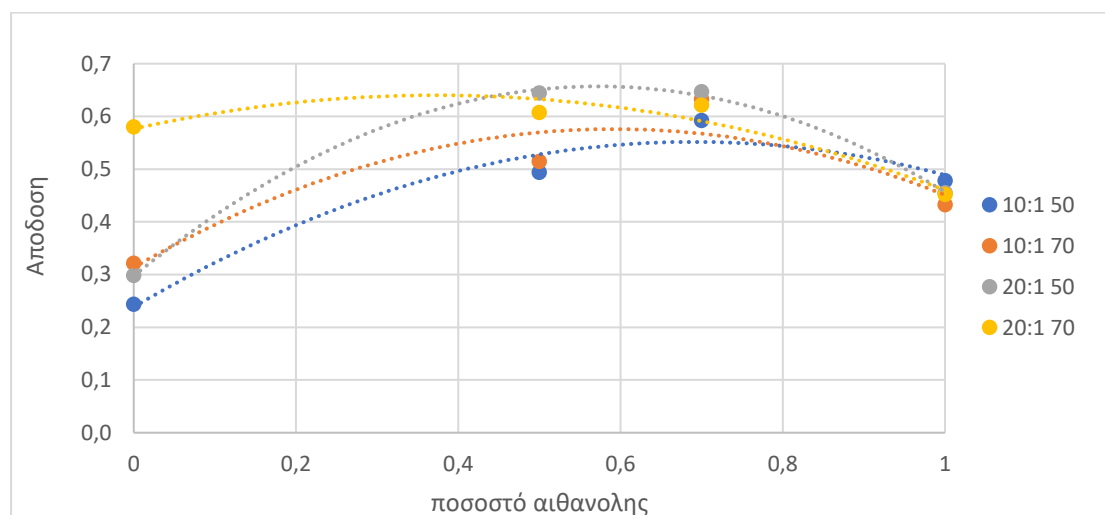
Σχετικά με την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων στην περίπτωση της μέτρησης του στο εκχύλισμα, η TPC με την αύξηση της αναλογία από 10:1 σε 20:1 σχεδόν υποδιπλασιάζονταν. Από την ανάλυση του ξηρού εκχυλίσματος είναι φανερό ότι η συγκέντρωση των φαινολικών είναι σχεδόν ίδια ακόμα και όταν αυξήθηκε η αναλογία. Μάλιστα η μείωση του TPC δεν ξεπερνά το 7% στην περίπτωση του ξηρού εκχυλίσματος. Αυτό

σημαίνει ότι η μέγιστη εκχύλιση φαινολικών είναι για αναλογία μικρότερη του 20:1, οπότε προσθέτοντας περισσότερο διαλύτη απλώς αραιώνεται το εκχύλισμα και γι' αυτό η συγκέντρωση των φαινολικών στο εκχύλισμα με αναλογία 20:1 είναι μικρότερη από ότι στο 10:1. Μάλιστα αν εκφραστεί η συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων ανά γραμμάριο βιομάζας, στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι 50% EthOH-W, στους 50 °C, σε αναλογία 10:1 το TPC είναι 2 mg GAE/g_{dw} και σε αναλογία 20:1 είναι 2,3 mg GAE/g_{dw}, γεγονός που επιβεβαιώνει την θεώρηση του ότι η απόδοση της εκχύλισης φαινολικών ενώσεων αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας διαλύτη/ βιομάζα, αλλά μειώνεται με μικρότερο ρυθμό, οπότε τελικά το εκχύλισμα έχει μικρότερη συγκέντρωση αφού ο διαλύτης είναι περισσότερος.

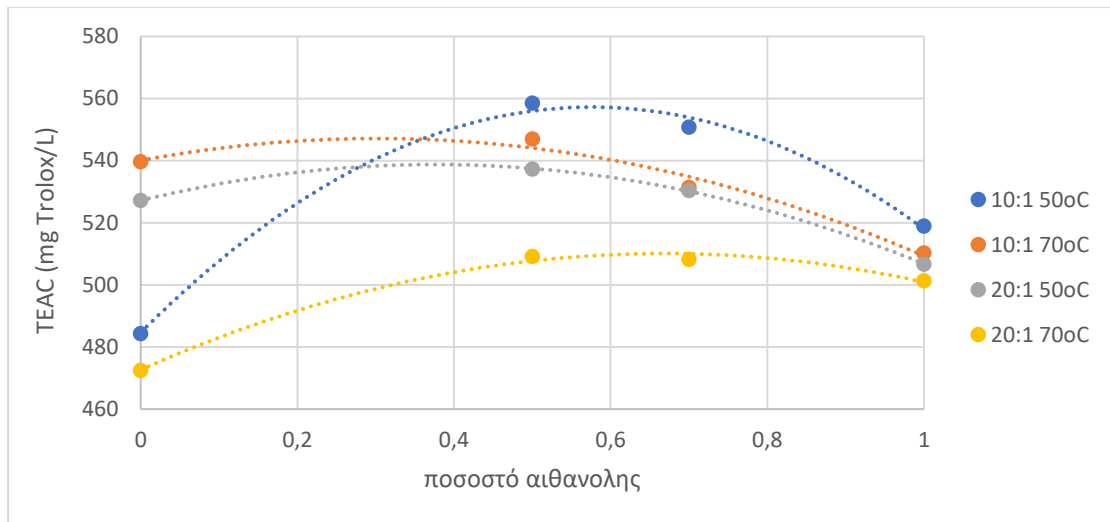
Να σημειωθεί ότι οι αναλογίες αυτές επιλέχθηκαν τόσο με γνώμονα την βιβλιογραφία αλλά και λαμβάνοντας υπόψη την τελική αξιοποίηση των φλοιών του ροδιού, από την βιομηχανία της χυμοποίησης ροδιού μιας και σε βιομηχανικό επίπεδο η αναλογία διαλύτη/ βιομάζα δεν ξεπερνά σχεδόν ποτέ το 20:1. [7]

3.2.1.4 Επίδραση του διαλύτη στην κλασική εκχύλιση

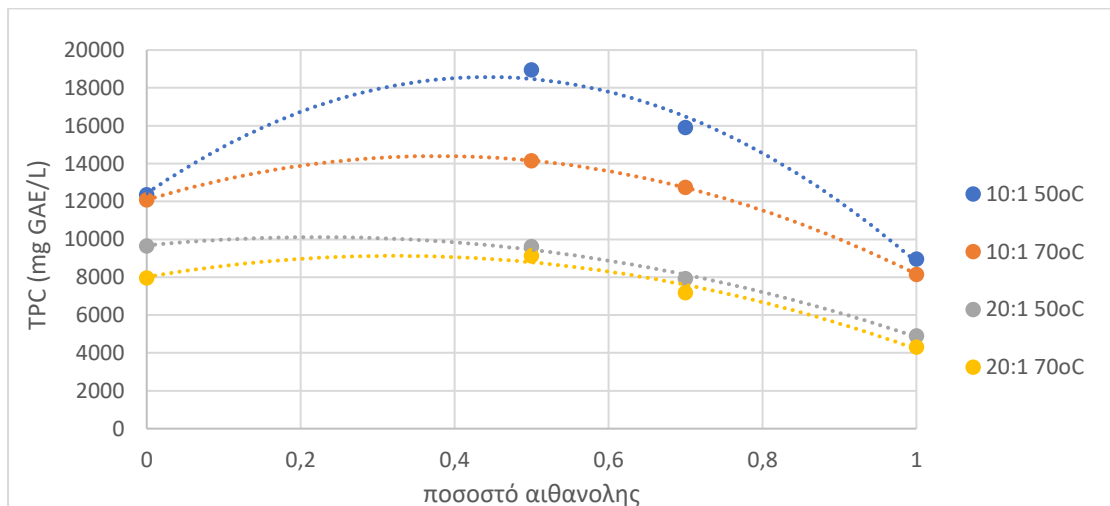
Τέλος εξετάζεται η εξάρτηση της απόδοσης, της αντιοξειδωτικής δράσης και του φαινολικού περιεχομένου από την περιεκτικότητα του διαλύτη σε αιθανόλη. Το 0 αντιστοιχεί σε καθαρό νερό και το 1 σε καθαρή αιθανόλη. Παρακάτω φαίνεται η σχέση που έχει η απόδοση, το TEAC και το TPC ανάλογα με το ποσοστό αιθανόλης στο διαλύτη αντίστοιχα στα Διαγράμματα 12-14.



Διάγραμμα 12: Εξάρτηση απόδοσης εκχύλισης από ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη



Διάγραμμα 13: Εξάρτηση αντιοξειδωτικής δράσης από το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη



Διάγραμμα 14: Εξάρτηση ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων από το ποσοστό αιθανόλης στον διαλύτη

Από τα παραπάνω Διαγράμματα 12-14 είναι φανερό πως οι εκχυλίσεις είναι πιο αποδοτικές για τα διαλύματα αιθανόλης – νερού και όχι για τα καθαρά συστατικά. Σύμφωνα με την συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων οι διαλύτες μπαίνουν στην εξής σειρά από το πιο αποδοτικό στο λιγότερο αποδοτικό: 50%EthOH-W>70%EthOH-W> W> EthOH.

Η παραπάνω σειρά ανάλογα με την αποδοτικότητα των διαλυτών έρχεται σύμφωνη και με την βιβλιογραφία. [40, 89] Η αιθανόλη και το νερό ως διαλύτες έχουν υψηλή απόδοση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στα τρόφιμα και στην φαρμακευτική σύμφωνα και με την βιβλιογραφία. Ενώ, αντίθετα, διαλύτες που είναι αποδοτικοί, όπως για παράδειγμα η μεθανόλη, δεν είναι food grade solvent. [89]

3.2.2 Κλασική Εκχύλιση με Βαθείς Ευτηκτικούς Διαλύτες (DESs)

3.2.2.1 Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με DESs

Τα πειράματα την κλασικής εκχύλισης έγιναν για σταθερό χρόνο εκχύλισης, τις 24 h και η ανάδευση ήταν 300rpm. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν είναι οι εξής: (α) η αναλογία διαλύτη προς βιομάζα, για αναλογίες 10:1 και 20:1, (β) η θερμοκρασία, 50°C και 70°C και (γ) οι πράσινοι διαλύτες $\text{ChCl}-1,2$ βουτανοδιόλη και $\text{ChCl}-1,4$ βουτανοδιόλη. Η επιλογή των διαλυτών έγινε μιας και σε εφαρμογές σε άλλες βιομάζες έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα. [68, 93]

Για την μέτρηση της απόδοσης, η διήθηση, του υπολείμματος της εκχύλισης, υπό κενό θα πρέπει να γίνει με ταυτόχρονη έκπλυση με νερό ή αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθεί ο DES. Στην συνέχεια το στερεό απαλλαγμένο από τον διαλύτη DES οδηγείται σε ξήρανση υπό κενό στους 50°C και αφού γίνει ζύγιση υπολογίζεται η απόδοση σύμφωνα με την Εξίσωση 2. Η μέτρηση της απόδοσης της εκχύλισης με τα DESs, κρίθηκε ότι είναι μη αξιόπιστη, καθώς όλες οι τιμές ήταν κοντά στο 45%-50%. Αυτό οφείλεται στο ότι αντιμετωπίστηκε δυσκολία στην έκπλυση του DES με νερό ή αιθανόλη από την βιομάζα.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται σε ισοδύναμα Trolox και υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς του Διάγραμμα 1. Η Εξίσωση 3 χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ισοδύναμων Trolox.

Το ολικό φαινολικό φορτίο εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent ή GAE), το οποίο υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς του Διάγραμμα 3, αφού έχει γίνει προσαρμογή του πρωτοκόλλου για τα εκχυλίσματα με DES. Η Εξίσωση 5, που υπολογίζει το TPC για τα εκχυλίσματα με DES είναι:

$$TPC (mg/L) = 2020,9 \cdot (ABS - ABS_{Blind}) + 6,5732$$

Εξίσωση 5: Εξίσωση υπολογισμού του TPC σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος

Κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης και του ολικού φαινολικού περιεχομένου διαπιστώθηκε ότι η ολική ποσότητα των αντιοξειδωτικών και των φαινολικών ενώσεων αντίστοιχα είναι μεγάλη με αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται πλήρως, συνεπώς η απορρόφηση του χρώματος να είναι ίση ή και μεγαλύτερη από την απορρόφηση του εκχυλίσματος με το DPPH ή είναι βαθύ μπλε και να μην μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση του, επειδή το φασματοφωτόμετρο μετρά μέχρι απορρόφηση 4. Γι' αυτό τον λόγο αραιώθηκαν τα εκχυλίσματα με αιθανόλη σε 3 αναλογίες, μετρήθηκε το TPC για καθένα από αυτά και έπειτα ανάχθηκε η συγκέντρωση για καθαρό εκχύλισμα.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα κλασικής εκχύλισης με DESs

Solvent	L/S	T(°C)	%Yield	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
DES 1	10:1	50	51,6%	952,0	29704,7
DES 1	10:1	70	43,6%	687,5	24351,9
DES 1	20:1	50	51,8%	823,8	15906,7
DES 1	20:1	70	45,2%	568,9	12540,8
DES 2	10:1	50	43,7%	825,6	16778,0
DES 2	10:1	70	36,6%	543,0	15517,1
DES 2	20:1	50	53,0%	613,2	13807,5
DES 2	20:1	70	42,7%	560,9	13082,9

Από τον παραπάνω πίνακα 15 είναι φανερό πώς τόσο το TEAC όσο και το TPC έχουν ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα για τους διαλύτες DESs που επιλέχθηκαν, γεγονός που ενθαρρύνει την περαιτέρω έρευνα της εκχύλισης από φλοιό ροδιού με πράσινους διαλύτες. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση και συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, προκύπτει για το εκχύλισμα με διαλύτη ChCl-1,2 βουτανοδιόλη, θερμοκρασία 50 °C και αναλογία διαλύτη προς βιομάζα 10:1. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση είναι 952 mg Trolox/L και συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι 29704,7 mg GAE/L.

Τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης με τα DESs έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με την βιβλιογραφία. Από τον πίνακα 9, το TPC, για τα διάφορα DESs μετρήθηκε από 810 mg GAE/L- 4140 mg GAE/L, τιμές πολύ χαμηλότερες από αυτές της παρούσας εργασίας. Βέβαια στην βιβλιογραφία η εκχύλιση γινόταν υποβοηθούμενη από υπερήχους, στους 45 °C, για 1h και για αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 30:1 κατά βάρος.

Ο διαλύτης ChCl-1,2 βουτανοδιόλη (DES1) δίνει καλύτερα αποτελέσματα τόσο σε αντιοξειδωτική ικανότητα όσο και στην συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τον ChCl-1,4 βουτανοδιόλη (DES2). Εξάιρεση αποτελεί το TPC για θερμοκρασία 70 °C και αναλογία 20:1, όπου το TPC για το DES2 είναι μεγαλύτερο κατά 4% από ότι το DES1. Η απόκλιση είναι πολύ μικρή για να θεωρηθεί αξιοσημείωτη, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση για αυτές τις συνθήκες είναι σχεδόν ίδιες (1% απόκλιση). Η αλλαγή του διαλύτη επηρεάζει περισσότερο τα πειράματα με αναλογία 10:1, καθώς η μείωση του TEAC από DES1 σε DES2 είναι περίπου 15% ενώ του TPC σχεδόν 35%. Αντίθετα, για αναλογία 20:1, το TEAC από DES1 σε DES2 μειώνεται περίπου 20% και το σχεδόν 13%. Η υπεροχή αυτή του DES 1, εν μέρη οφείλεται στο μικρότερο ιξώδες, όπως φαίνεται στον πίνακα 16 μιας και διαλύτης με μικρότερο ιξώδες και πυκνότητα μπορεί να εισχωρήσει καλύτερα στην βιομάζα. Ακόμα με χαμηλότερα ιξώδη η ανάμιξη είναι καλύτερη, συνεπώς τα φαινόμενα μεταφοράς είναι αποτελεσματικότερα και η απόδοση της εκχύλισης καλύτερη.

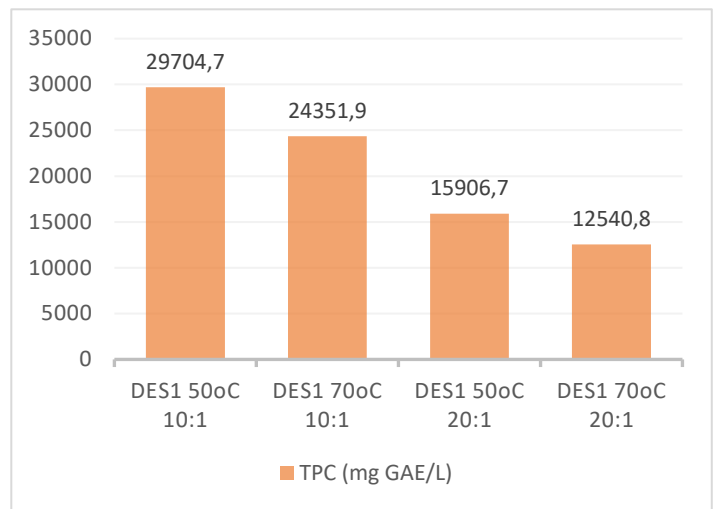
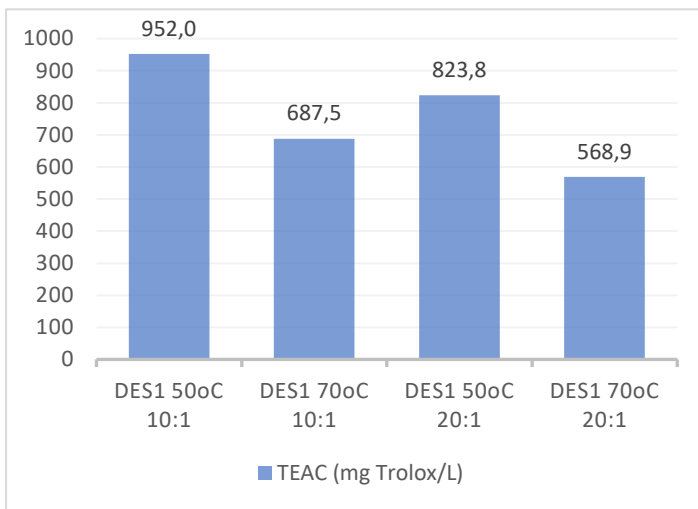
Πίνακας 16: Ιξώδη και πυκνότητες των $\text{ChCl-1,2butanediol}$ και $\text{ChCl-1,4butanediol}$ [64, 94]

T (°C)	$\text{ChCl-1,2butanediol}$		$\text{ChCl-1,4butanediol}$	
	Viscosity (cP)	d (g/cm ³)	Viscosity (cP)	d (g/cm ³)
40	33,21	1,0235	36,577	1,03546
50	21,69	1,0175	25,219	1,02989
60	14,89	1,0104	17,991	1,02443

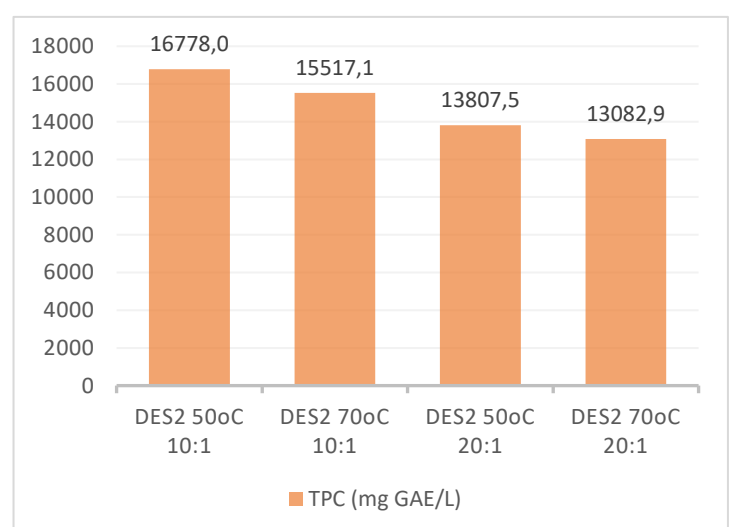
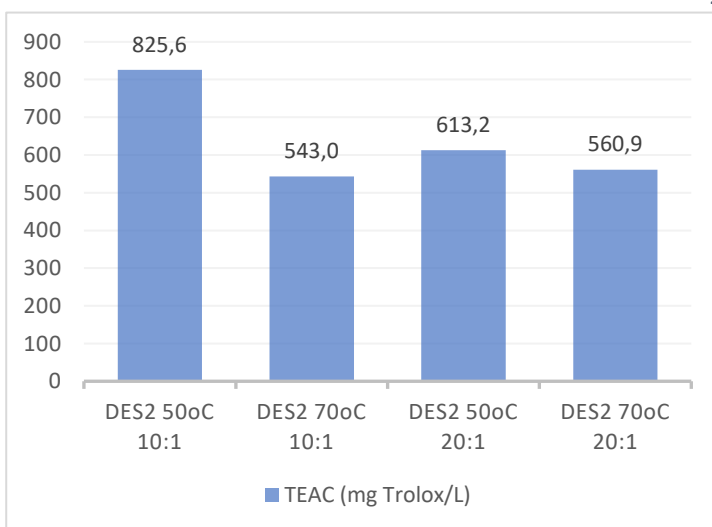
Ο Βu, Zhao et al. 2023 σε εκχύλιση αντιοξειδωτικών και ανθοκυανινών από *Perilla frutescens* (L.) Britt, με την μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους, κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο διαλύτης με την βέλτιστη απόδοση εκχύλισης ήταν η χλωριούχος χολίνη-1,2 βουτανοδιόλη. [93]

3.2.2.2 Επίδραση θερμοκρασίας στην κλασική εκχύλιση με DESs

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών από τη θερμοκρασία απεικονίζονται στα Διαγράμματα 15 και 16 διατηρώντας τον χρόνο σταθερό και την αναλογία βιομάζας/ διαλύτη ανά δύο σταθερή.



Διάγραμμα 15: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 1 με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία

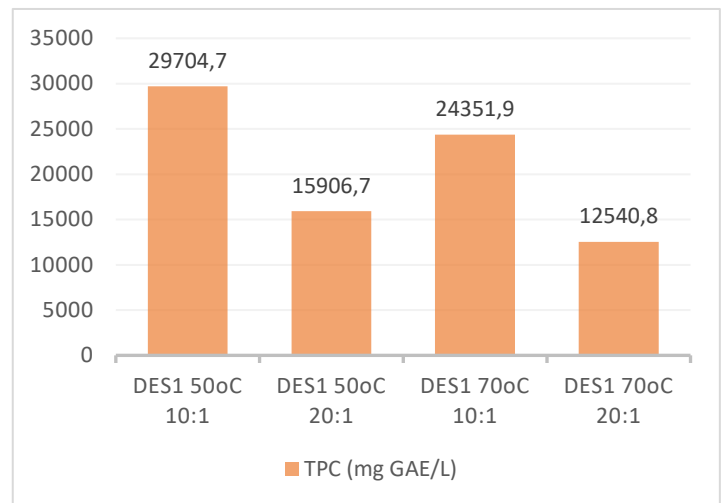
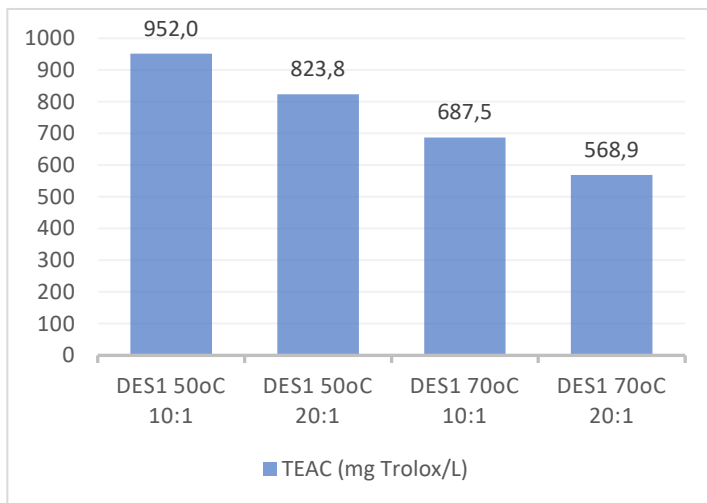


Διάγραμμα 16: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 2 με κλασική εκχύλιση από τη θερμοκρασία.

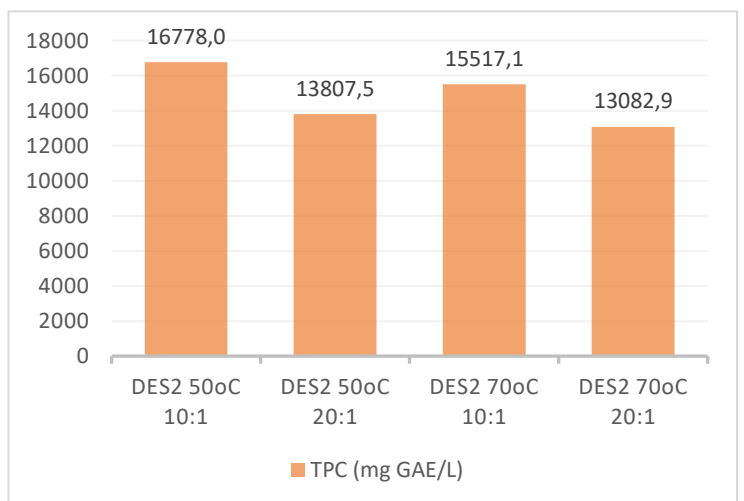
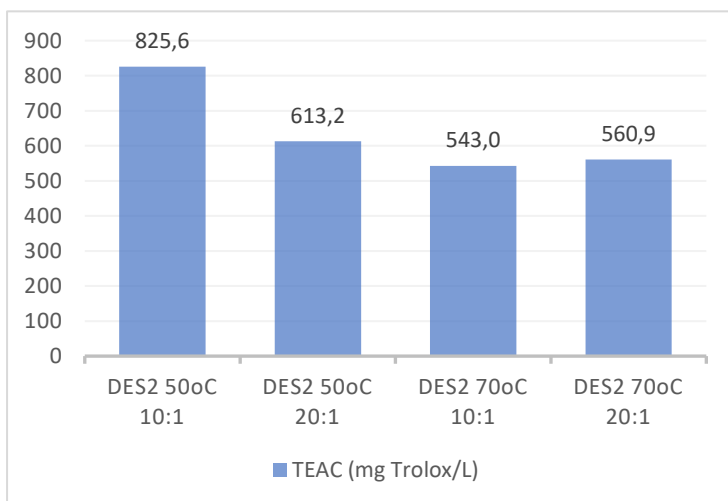
Από τα παραπάνω Διαγράμματα 15 και 16 είναι φανερό ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας τόσο TEAC όσο και το TPC μειώνονται. Αυτό, πιθανώς, οφείλεται στο ότι τα βιοδραστικά συστατικά είναι θερμοευαίσθητα. [53] Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι μεγαλύτερη στην αντιοξειδωτική δράση, της τάξεως του 30%, ενώ η μείωση της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών από 50 °C σε 70°C είναι μικρότερη, από 5% έως 20%.

3.2.2.3 Επίδραση λόγου διαλύτη/βιομάζας στην κλασική εκχύλιση με DESs

Η εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών από το λόγο διαλύτη/βιομάζα απεικονίζονται στα Διαγράμματα 17 και 18.



Διάγραμμα 17: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 1 με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.



Διάγραμμα 18: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων με DES 2 με κλασική εκχύλιση από την αναλογία διαλύτη/βιομάζα.

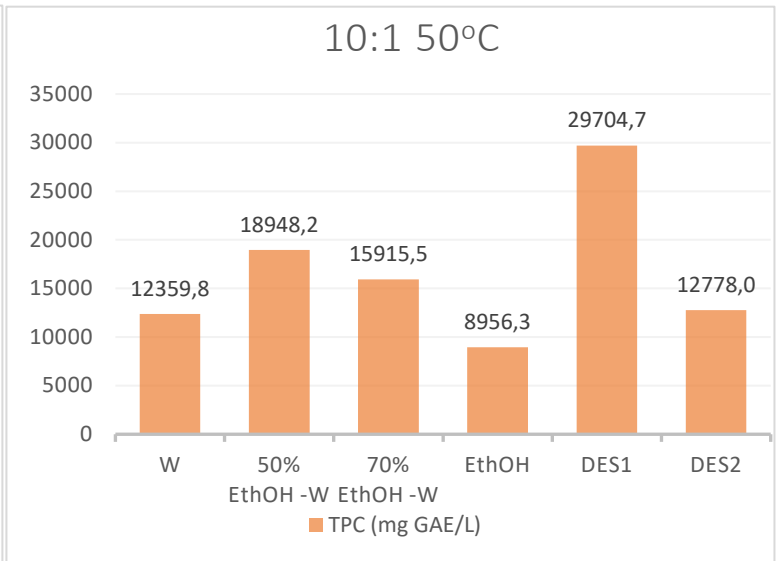
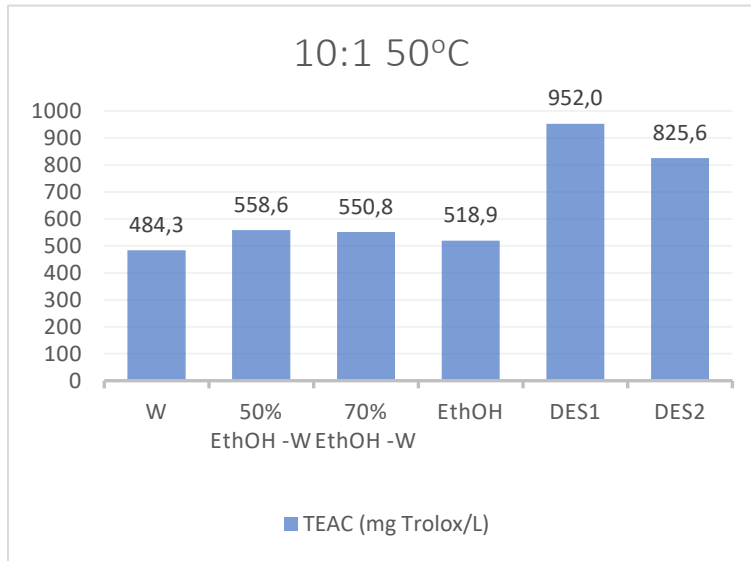
Με την αύξηση του λόγου διαλύτη/βιομάζα τόσο TEAC όσο και το TPC μειώνονται. Εξάιρεση αποτελεί η αντιοξειδωτική δράση για τον διαλύτη DES2 στους 70 °C, όπου με την αύξηση του λόγου, αυξάνεται και το TEAC κατά 3%. Η αύξηση είναι πολύ μικρή για να θεωρηθεί άξια διερεύνησης. Η επίδραση της αναλογίας διαλύτη/βιομάζα είναι μεγαλύτερη στην ολική συγκέντρωση φαινολικών από 10:1 σε 20:1, που κυμαίνεται από 16% έως και σχεδόν 50%. Μεγαλύτερη μείωση TPC, με αύξηση του λόγου, είχαν τα εκχυλίσματα με διαλύτη το DES 1 (46%-49%), ενώ με διαλύτη τον DES 2 η μείωση είναι πολύ μικρότερη (16%-18%). Αντίθετα η μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης, με την αύξηση του λόγου διαλύτη προς βιομάζα, είναι της τάξεως του 20% (17%-26%). Η μείωση του TPC, με την αύξηση του λόγου διαλύτη/βιομάζα, έρχεται αντίθετη με την βιβλιογραφία. [92] Μπορεί να δικαιολογηθεί όπως και με τους συμβατικούς διαλύτες στην Παράγραφο 3.2.1.3, δηλαδή ότι η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών επιτυγχάνεται σε μια αναλογία μικρότερη από 20:1 και το εκχύλισμα παραλαμβάνεται αραιωμένο. Εδώ δεν μπορούσε να γίνει η ίδια ανάλυση με τους συμβατικούς διαλύτες, αφού η απομάκρυνση των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών είναι αδύνατη με εξάτμιση, λόγω της αμελητέας τάσης ατμών.

3.2.3 Σύγκριση συμβατικών διαλυτών και DESs στην κλασική εκχύλιση

Πίνακας 17: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων κλασικής εκχύλισης

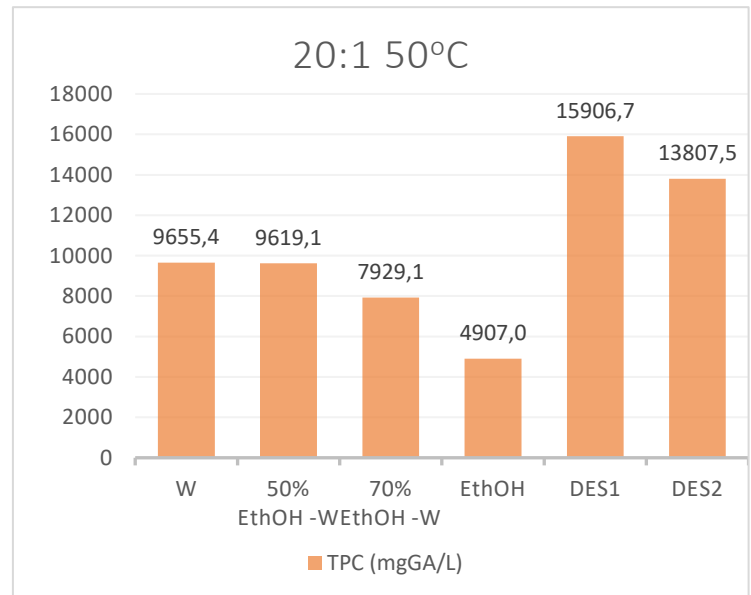
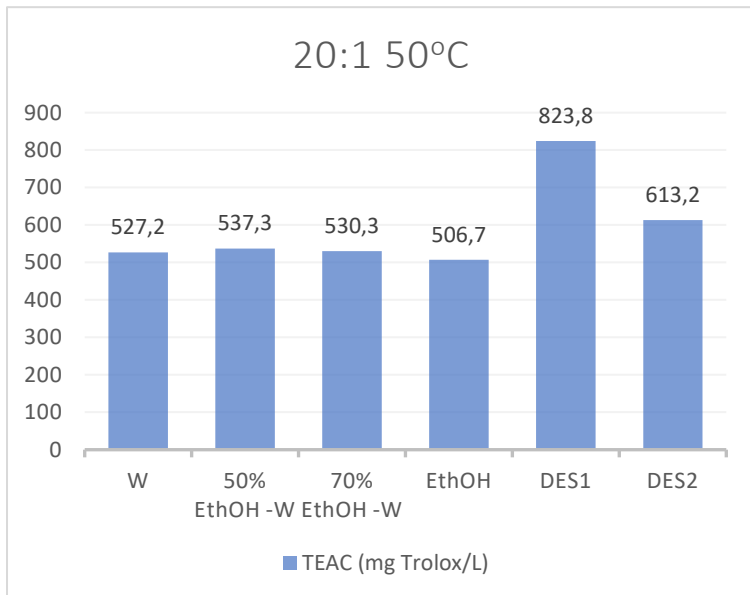
		TEAC (mg Trolox/L)				TPC(mgGA/L)				
		L/s	10:1	10:1	20:1	20:1	10:1	10:1	20:1	20:1
		T(οC)	50	70	50	70	50	70	50	70
Solvent	W	484,3	539,6	527,2	472,5	12359,8	12087,7	9655,4	7967,8	
	50%EthOH-W	558,6	547,0	537,3	509,2	18948,2	14146,3	9619,1	9129,3	
	70%EthOH-W	550,8	531,4	530,3	508,2	15915,5	12744,0	7929,1	7188,3	
	EthOH	518,9	510,3	506,7	501,4	8956,3	8154,7	4907,0	4318,2	
	DES1	952,0	687,5	823,8	568,9	29704,7	24351,9	15906,7	12540,8	
	DES2	825,6	543,0	613,2	560,9	12778,0	15517,1	13807,5	13082,9	

Παρακάτω φαίνονται και τα αντίστοιχα ραβδοδιαγράμματα για σύγκριση των διαλυτών ως προς την αντιοξειδωτική δράση και το TPC στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και λόγου διαλύτη/βιομάζα.



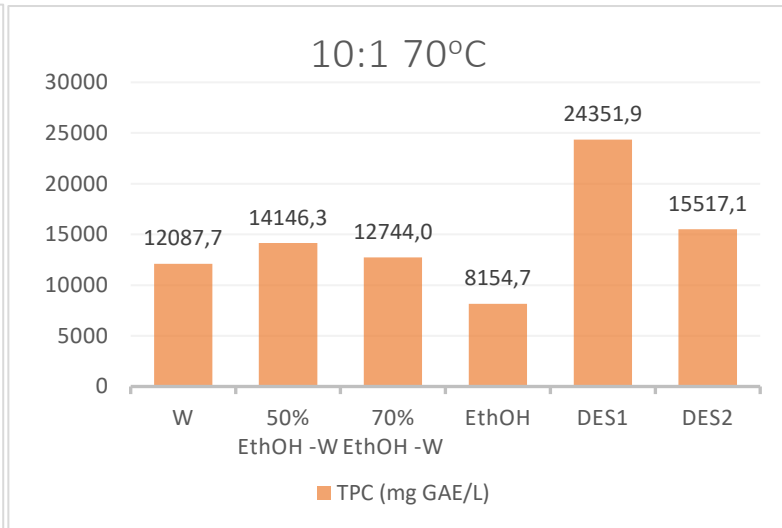
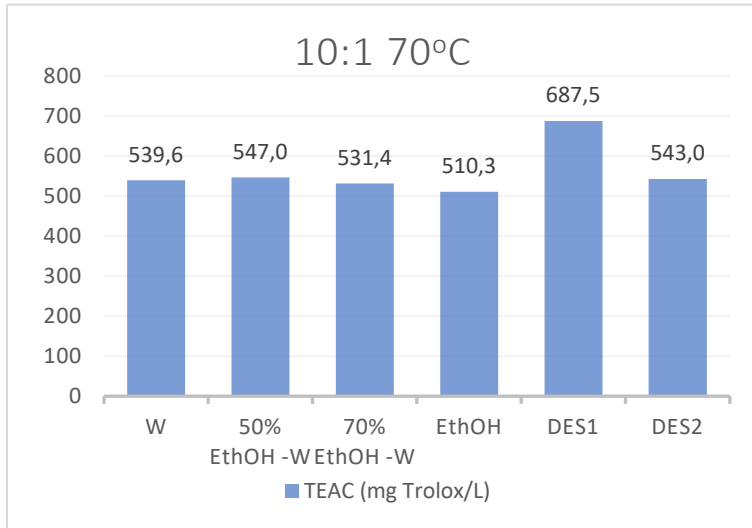
Διάγραμμα 19: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 10:1 και 50°C.

Για τις συνθήκες 50°C και αναλογία 10:1, η σειρά μειούμενης αντιοξειδωτικής δράσης ως προς τον διαλύτη είναι : DES 1> DES 2> 50%EthOH-W> 70%EthOH-W> EthOH > W και η σειρά μειούμενης ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων είναι: DES 1> 50%EthOH-W> 70%EthOH-W> DES 2> W> EthOH.



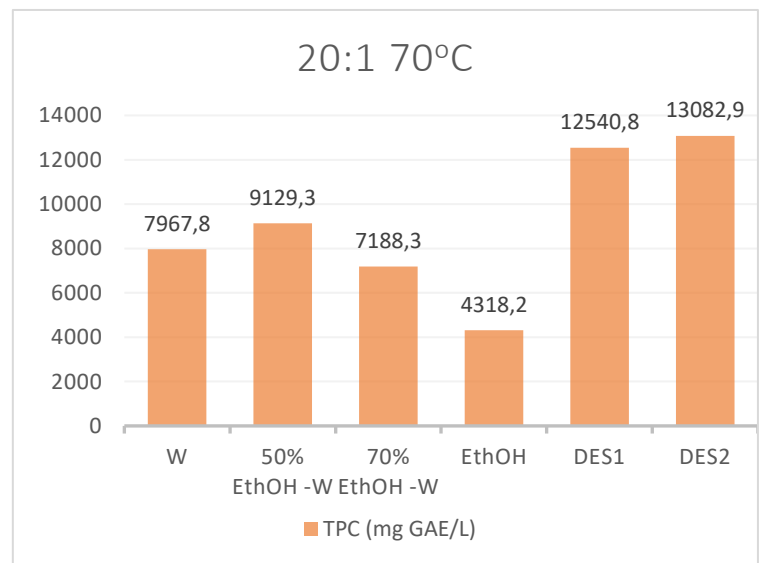
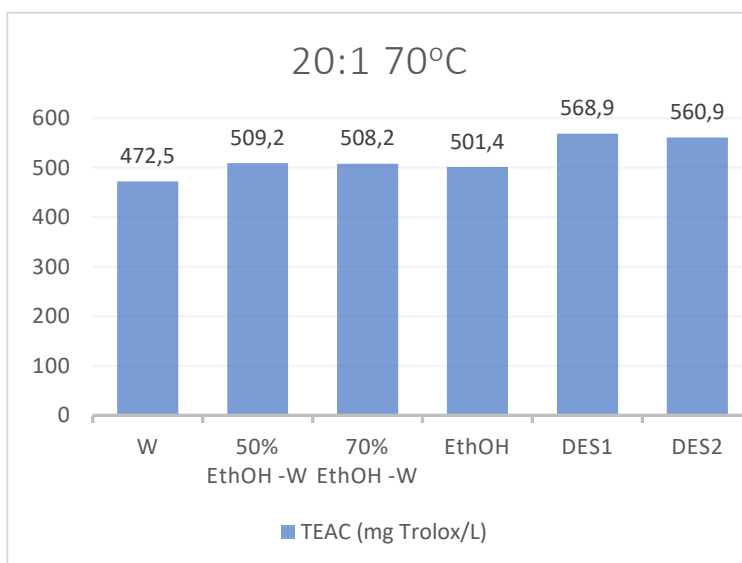
Διάγραμμα 20: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 20:1 και 50°C.

Για τις συνθήκες 50°C και αναλογία 20:1, η σειρά μειούμενης αντιοξειδωτικής δράσης ως προς τον διαλύτη είναι : DES 1> DES 2> 50%EthOH-W> 70%EthOH-W> W > EthOH και η σειρά μειούμενης ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων είναι: DES 1> DES 2> W> 50%EthOH-W> 70%EthOH-W> EthOH.



Διάγραμμα 21: Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 10:1 και 70°C

Για τις συνθήκες 70°C και αναλογία 10:1, η σειρά μειούμενης αντιοξειδωτικής δράσης ως προς τον διαλύτη είναι : DES 1> 50%EthOH-W > DES 2> W> 70%EthOH-W > EthOH και η σειρά μειούμενης ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων είναι: DES 1> DES 2> 50%EthOH-W> 70%EthOH-W> W> EthOH.



Διάγραμμα 22 : Εξάρτηση της αντιοξειδωτικής δράσης (TEAC) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης από το διαλύτη στις συνθήκες 20:1 και 70°C.

Για τις συνθήκες 70°C και αναλογία 20:1, η σειρά μειούμενης αντιοξειδωτικής δράσης ως προς τον διαλύτη είναι : DES 1 > DES 2 > 50%EthOH-W > 70%EthOH-W > EthOH > W και η σειρά μειούμενης ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων είναι: DES 2 > DES 1 > 50%EthOH-W > W > 70%EthOH-W > EthOH.

Συγκρίνοντας τους κλασικούς διαλύτες και τους DESs στη συμβατική εκχύλιση, βγαίνει το συμπέρασμα ότι τόσο η αντιοξειδωτική δράση όσο και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ουσιών, στις ίδιες συνθήκες, είναι είτε ίδια είτε μεγαλύτερη και στους 2 DESs σε σύγκριση με τους κλασικούς διαλύτες. Εξαίρεση είναι στις συνθήκες 20:1, στους 50°C, όπου το μίγμα 50% EthOH-W έχει μεγαλύτερο TEAC από τον DES 2 και στις συνθήκες 10:1, στους 50°C που το TPC των μιγμάτων 50% και 70%EthOH-W είναι μεγαλύτερο από τον DES 2. Μάλιστα σε όλες τις περιπτώσεις ο DES 1 έδωσε εκχύλισμα με υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Μόνη εξαίρεση, το TPC στις συνθήκες 20:1 και 70°C όπου ο DES 2 είναι καλύτερος από DES 1, με διαφορά μόνο 3%.

Οι βέλτιστες συνθήκες για την κλασική εκχύλιση, με οποιοδήποτε διαλύτη είναι σε θερμοκρασία 50°C και αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 10:1. Εξαίρεση είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος με διαλύτη το νερό όπου έχει μέγιστο στους 70°C και αναλογία 10:1 και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος με διαλύτη τον DES 2 όπου γίνεται μέγιστο στις συνθήκες 70°C και αναλογία 10:1.

Συμπερασματικά, από τους συμβατικούς διαλύτες σε όλες τις συνθήκες και για αντιοξειδωτική και για ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων καλύτερο είναι το μίγμα 50%EthOH-W. Αντίστοιχα καλύτερος βαθύς ευτηκτικός διαλύτης είναι ο DES 1 σε όλες τις συνθήκες και για αντιοξειδωτική και για ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Όμως ο διαλύτης DES 1 έχει και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και μεγαλύτερο φαινολικό φορτίο για όλες τις συνθήκες. Το TEAC είναι μεγαλύτερο για το DES 1 κατά 10%-40% και το TPC κατά 27%-42%. Ειδικότερα για τις συνθήκες: θερμοκρασία 50°C και αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 10:1, όπου είναι οι βέλτιστες, το TEAC και το TPC για το εκχύλισμα με διαλύτη DES 1 είναι 40% μεγαλύτερο από το εκχύλισμα με διαλύτη 50%EthOH-W.

3.3 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

3.3.1 Αποτελέσματα εκχύλισης με μικροκύματα

Για την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης, επιλέχθηκαν οι διαλύτες 50%EthOH-W και DES 1, όπου ήταν οι πιο αποδοτικοί, όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3. Τα πειράματα της εκχύλισης με μικροκύματα έγιναν με σταθερή ανάδευση, είτε με μαγνήτη, στην περίπτωση του διαλύτη 50%EthOH-W, είτε μηχανικά, για τον διαλύτη DES 1, με ταχύτητα 300rpm. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν είναι οι εξής: (α) η αναλογία διαλύτη προς βιομάζα, για αναλογίες από 10:1 έως 30:1, (β) η θερμοκρασία, από 40°C έως 60°C και (γ) ο χρόνος εκχύλισης από 5min έως 30 min. Τα όρια τα οποία εξετάστηκαν, επιλέχθηκαν και με γνώμονα την βιβλιογραφία αλλά και με κριτήριο ότι σκοπός της εκχύλισης με μικροκύματα είναι η μείωση του χρόνου εκχύλισης αλλά και η μείωση της θερμοκρασίας, ώστε να μην καταστρέφονται τα βιοδραστικά συστατικά. [40] Για τον πειραματικό σχεδιασμό εφαρμόστηκε η μέθοδος των επιφανειών απόκρισης και τα πειράματα που διεξήχθησαν είναι 26 (Πίνακας 18) για κάθε διαλύτη.

Ο διαλύτης πρέπει να έχει υψηλή διηλεκτρική σταθερά ώστε να μπορεί να μετατραπεί την απορροφούμενη ενέργεια μικροκυμάτων σε θερμότητα μέσα στη στερεή βιομάζα και υψηλή σταθερά διηλεκτρικής απώλειας, ώστε να μπορεί να αποθηκεύει την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η σταθερά διηλεκτρικής απώλειας εκφράζει την πολικότητα του μορίου σε να ηλεκτρικό πεδίο και την ικανότητα αποθήκευσης ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ενός υλικού. [95] Στην επιλογή του διαλύτη, θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη το ιξώδες και η πολικότητα του. Έχει αποδειχθεί ότι ένα μίγμα διαλυτών είναι πιο αποτελεσματικό μέσο για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων σε σχέση με έναν καθαρό διαλύτη. Η αιθανόλη είναι πολύ σημαντικός διαλύτης αφού συμβάλει στη διάρρηξη των δεσμών υδρογόνου και των υδρόφοβων δεσμών που υπάρχουν μεταξύ φαινολικών-πρωτεϊνών και φαινολικών-κυτταρίνης και το νερό είναι πιο πολικός διαλύτης. [78] Γι' αυτό επιλέχθηκε ο διαλύτης με ίση κατά βάρος αναλογία αιθανόλης- νερού, ώστε να συνδυάζονται τα θετικά και των δύο διαλυτών και η εκχύλιση να είναι βέλτιστη. [40, 95] Στην επιλογή του DES διαλύτη πάλι την μεγαλύτερη διηλεκτρική σταθερά την έχει ο διαλύτης DES 1, οπότε σύμφωνα με την βιβλιογραφία θα είναι πιο αποδοτικός από τον DES 2. Επίσης, ο DES 1 έχει και μικρότερο ιξώδες και πυκνότητα όπως φαίνεται στον πίνακα 16. [96]

Στον πίνακα 18 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για τα πειράματα με διαλύτη το 50% EthOH-W και το DES1. Για τα πειράματα με διαλύτη 50% EthOH-W μετρήθηκε και η απόδοση, ενώ για τον DES1 κρίθηκε ότι δεν θα ήταν χρήσιμο, αφού η έκπλυση του διαλύτη είναι δύσκολη και οδηγεί σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα.

Για την έκφραση του TEAC, σε ισοδύναμα Trolox χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 3. Για τον υπολογισμό του ολικού φαινολικού φορτίου, που εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent ή GAE), χρησιμοποιείτε η Εξίσωση 4 για τον συμβατικό διαλύτη και η Εξίσωση 5 για τον DES.

Πίνακας 18 :Αποτελέσματα εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα με διαλύτη 50% EthOH-W και ChCl-1,2butanediol

Παράμετροι				50% EthOH-W			ChCl-1,2butanediol	
t (min)	P (W)	T (°C)	L/s	Yield	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
5	300	40	10	70,1%	615,9	13390,4	783,3	12136,6
5	300	40	30	72,7%	518,8	4960,2	543,3	4467,5
5	300	60	10	59,8%	616,2	10849,5	781,0	18983,3
5	300	60	30	80,5%	536,8	5089,1	657,5	4388,7
5	500	50	20	66,8%	531,6	7489,6	533,4	10565,8
5	700	40	10	67,0%	635,4	15066,6	749,3	10360,2
5	700	40	30	82,3%	636,5	5677,8	565,1	6519,8
5	700	60	10	64,0%	766,9	11823,8	618,9	13175,8
5	700	60	30	87,8%	633,5	4358,3	530,6	4932,1
15	300	50	20	79,4%	614,6	7680,3	729,5	8872,6
15	500	40	20	80,2%	800,4	8027,3	529,8	10434,6
15	500	50	10	75,1%	711,6	15411,5	723,8	18684,6
15	500	50	20	68,6%	601,9	8856,8	627,8	12069,1
15	500	50	20	68,5%	586,6	8773,2	596,1	12136,6

15	500	50	30	85,7%	600,9	5277,1	542,6	6138,5
15	500	60	20	78,3%	538,0	7003,6	584,4	10786,8
15	700	50	20	68,3%	638,7	7264,7	602,1	6068,9
30	300	40	10	59,8%	651,2	10733,4	641,9	14671,7
30	300	40	30	73,3%	613,3	5962,6	555,8	6433,7
30	300	60	10	63,6%	682,4	10754,3	787,0	20851,8
30	300	60	30	75,5%	659,3	5712,5	574,5	6138,5
30	500	50	20	70,1%	551,5	7439,1	537,0	8562,8
30	700	40	10	60,9%	755,0	13987,8	627,9	14558,2
30	700	40	30	72,9%	516,6	6003,6	555,7	5461,4
30	700	60	10	67,3%	689,6	15718,6	736,7	14089,5
30	700	60	30	73,0%	663,9	4925,7	556,4	6175,2

Από τον παραπάνω πίνακα 18, για την εκχύλιση με διαλύτη το 50% EthOH-W, η αντιοξειδωτική δράση κυμαίνεται από 516,6 έως 800,4 mg Trolox/L και η ολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων είναι από 4358,3 έως 15718,6 mg GAE/L. Για τα πειράματα με διαλύτη το DES 1 το εύρος της αντιοξειδωτικής δράσης είναι 529,8 έως 787,0 mg Trolox/L και της ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων είναι 4388,7 έως 20851,8 mg GAE/L.

Από τον πίνακα 18, για εκχύλιση με διαλύτη 50%EthOH-W η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση είναι 800,4 mg Trolox/L για τις συνθήκες 15min, 500W, 40°C και 10:1. Η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι 15718,6 mg GAE/L για τις συνθήκες 30 min, 700 W, 60 °C και 10:1. Ταυτόχρονα η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μεγιστοποιούνται για τις συνθήκες 15min, 500W, 50°C και 10:1, με TEAC 711,6 mg Trolox/L και TPC 15411,6 mg GAE/L. Και για την εκχύλιση με διαλύτη το ChCl-1,2butanediol μεγιστοποιείται ταυτόχρονα και η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, για τις συνθήκες 30min, 300W, 60°C και 10:1, με TEAC 787mg Trolox/L και TPC 20851,8 mg GAE/L.

3.3.2 Επίδραση παραμέτρων εκχύλισης στην απόδοση της εκχύλισης

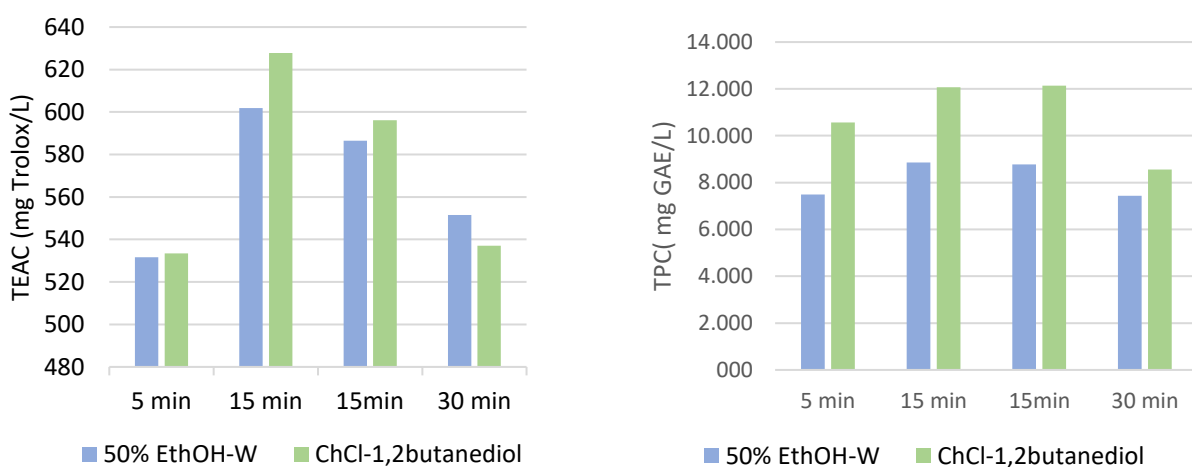
3.3.2.1 Επίδραση διαλύτη (συμβατικού και DES διαλύτη) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Στην εκχύλιση με μικροκύματα συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ των διαλυτών 50% EthOH-W και ChCl-1,2butanediol, ο διαλύτης DES 1 δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην αντιοξειδωτική δράση και στην συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων για τις περισσότερες συνθήκες που μελετήθηκαν. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα διαγράμματα 23 έως 26.

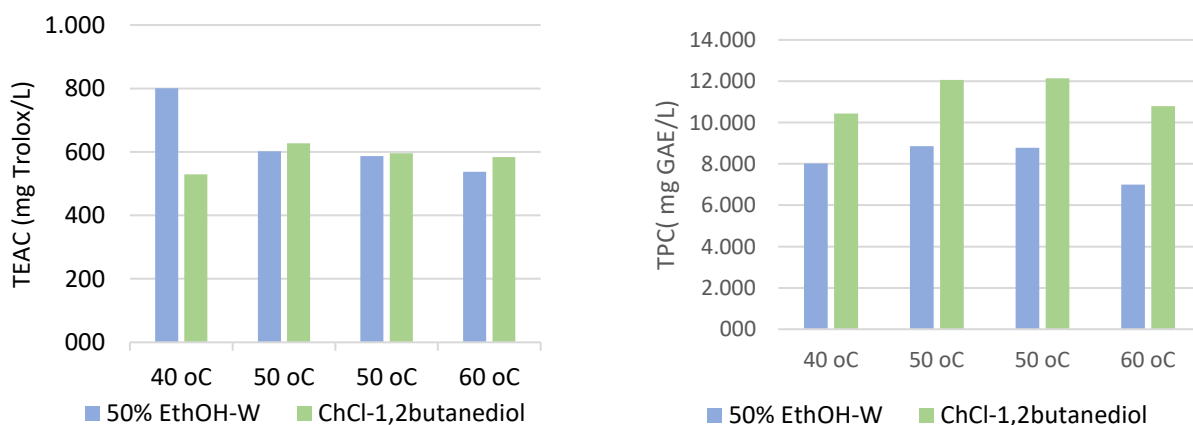
Από τον πίνακα 18, για εκχύλιση με διαλύτη 50%EthOH-W η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση είναι 800,4 mg Trolox/L για τις συνθήκες 15min, 500W, 40°C και 10:1. Η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι 15718,6 mg GAE/L για τις συνθήκες 30 min, 700 W, 60 °C και 10:1. Ταυτόχρονα η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων μεγιστοποιούνται για τις συνθήκες 15min, 500W, 50°C και 10:1, με TEAC 711,6 mg Trolox/L και TPC 15411,6 mg GAE/L.

Αντίστοιχα από τον πίνακα 18 για την εκχύλιση με διαλύτη το ChCl-1,2butanediol μεγιστοποιείται ταυτόχρονα και η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι για τις συνθήκες 30min, 300W, 60°C και 10:1, με TEAC 787mg Trolox/L και TPC 20851,8 mg GAE/L.

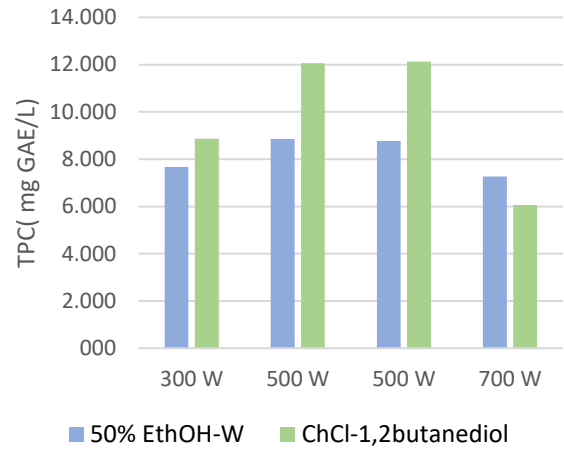
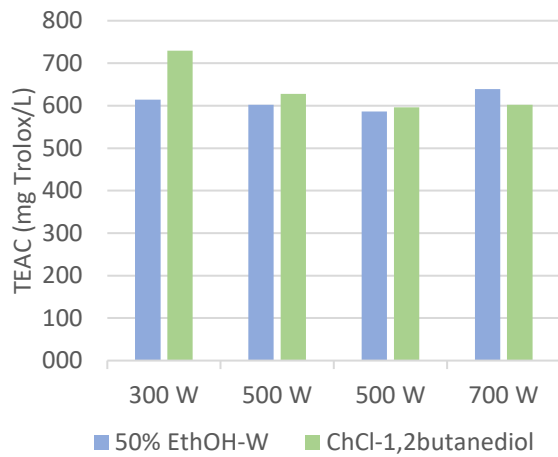
Συγκρίνοντας τις δύο μέγιστες τιμές, η αντιοξειδωτική δράση είναι 10% μεγαλύτερη στο εκχύλισμα με DES 1 από ότι με διαλύτη 50%EthOH-W και η ολική ποσότητα φαινολικών ενώσεων είναι 35% μεγαλύτερη στο εκχύλισμα με DES 1. Και στις δυο περιπτώσεις η αναλογία διαλύτη/βιομάζα είναι 10:1, που ικανοποιεί την επιθυμία για μικρότερη κατανάλωση διαλύτη στις εκχυλίσεις. [97] Βέβαια στην εκχύλιση με 50%EthOH-W ο χρόνος και η θερμοκρασία είναι μικρότερος αλλά η ισχύς μεγαλύτερη από ότι στον DES 1, οπότε δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το ποια περίπτωση είναι ενεργειακά πιο ωφέλιμη.



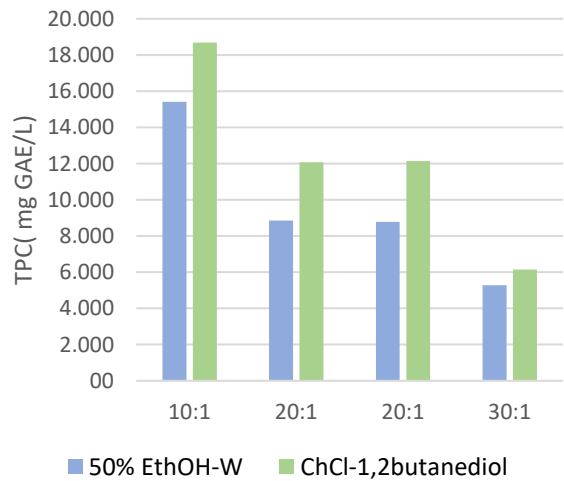
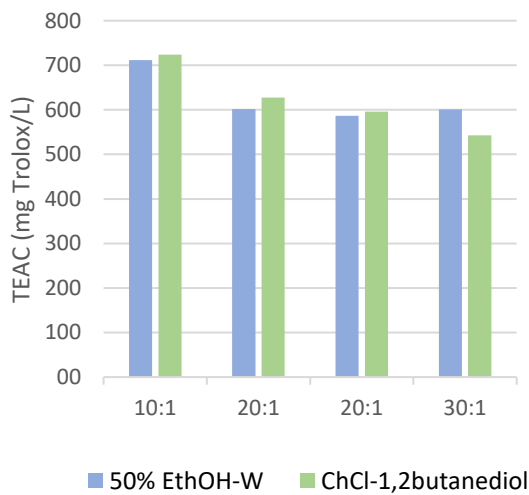
Διάγραμμα 23: Επίδραση του χρόνου στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 50ο C, 500W, 20:1



Διάγραμμα 24: Επίδραση της θερμοκρασίας στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 500W, 20:1

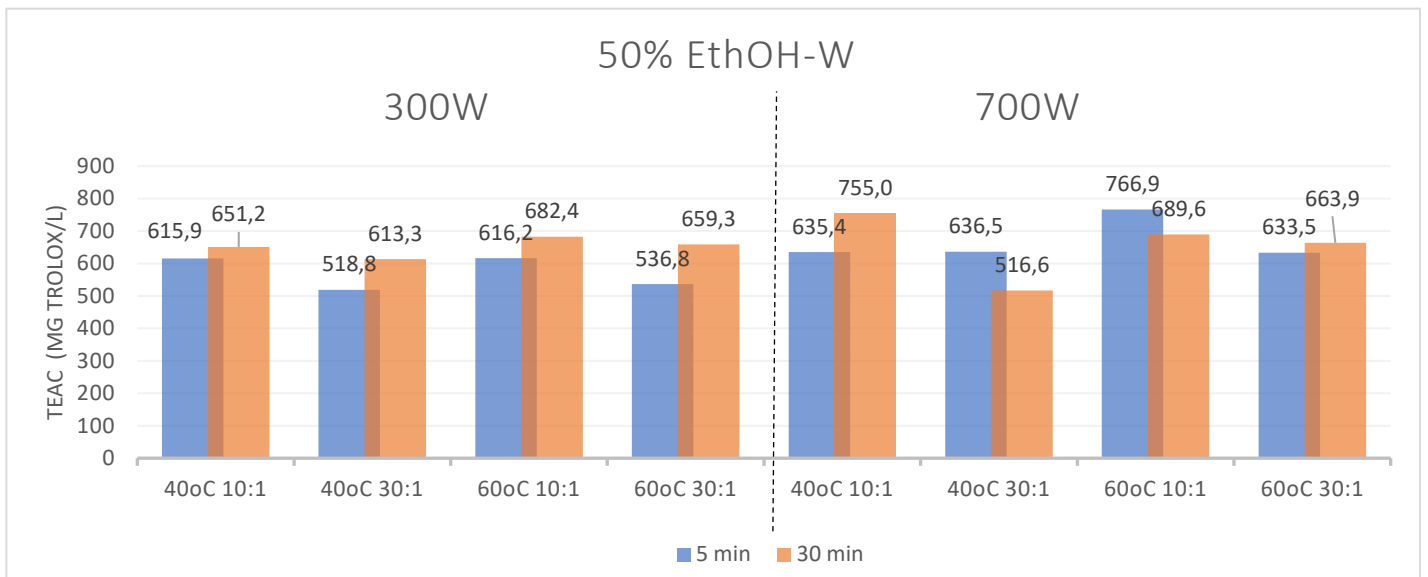


Διάγραμμα 25: Επίδραση της ισχύος στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 50οC, 20:1

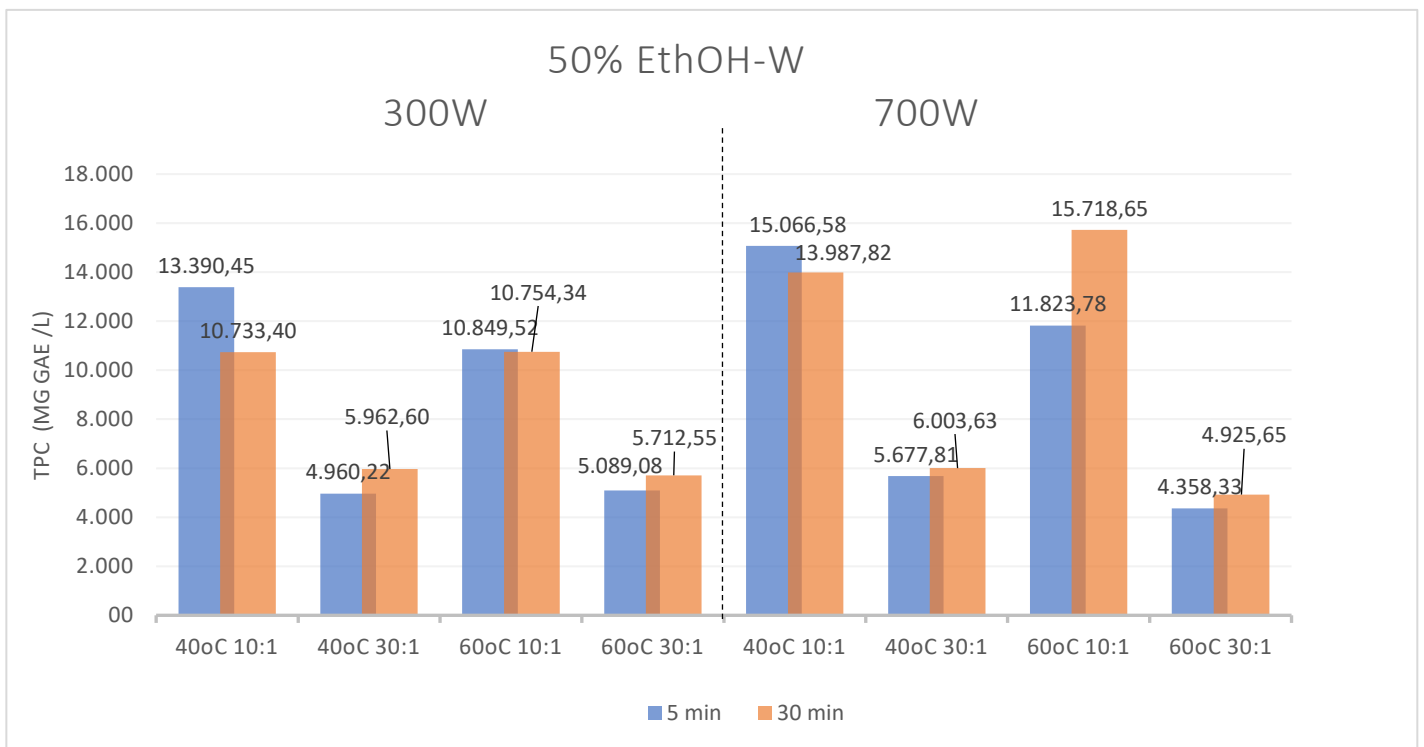


Διάγραμμα 26: Επίδραση της αναλογίας διαλύτη/βιομάζα στην (α) αντιοξειδωτική δράση και (β) στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν 15min, 500W, 50οC

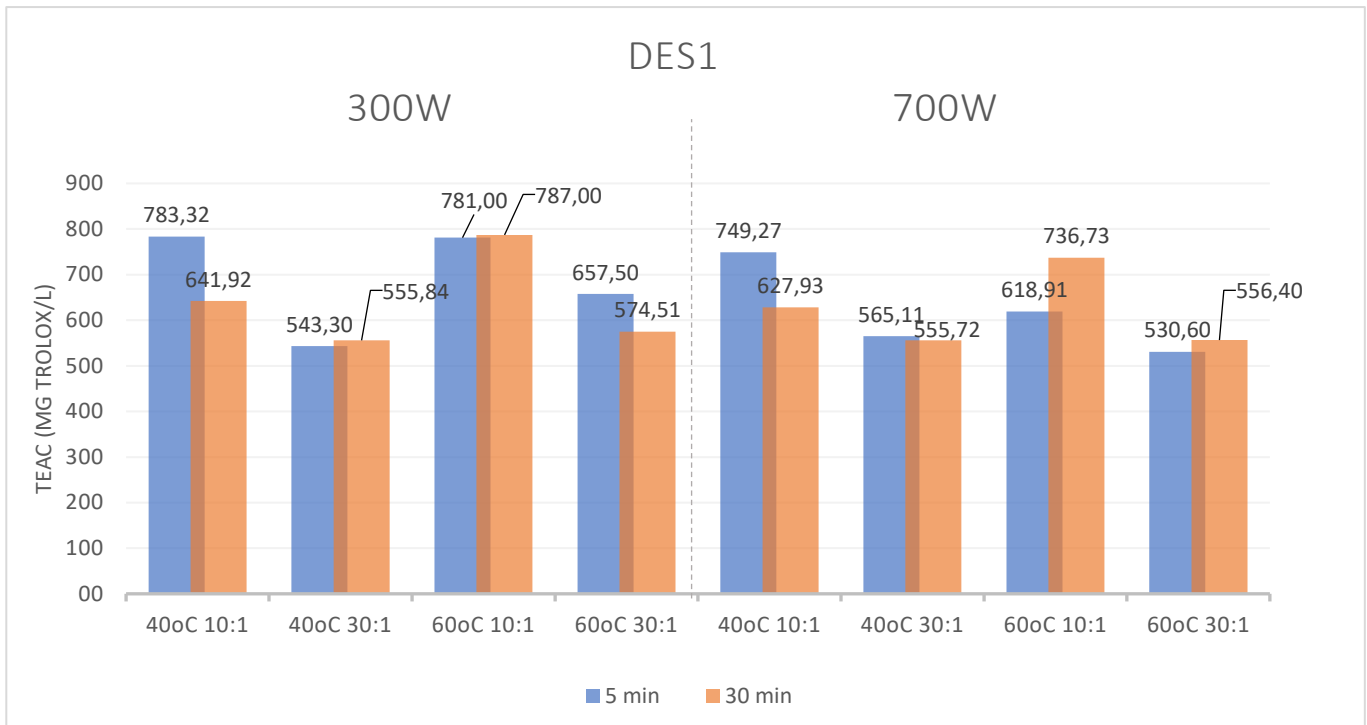
3.3.2.2 Επίδραση του χρόνου (συμβατικού και DES διαλύτη) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα



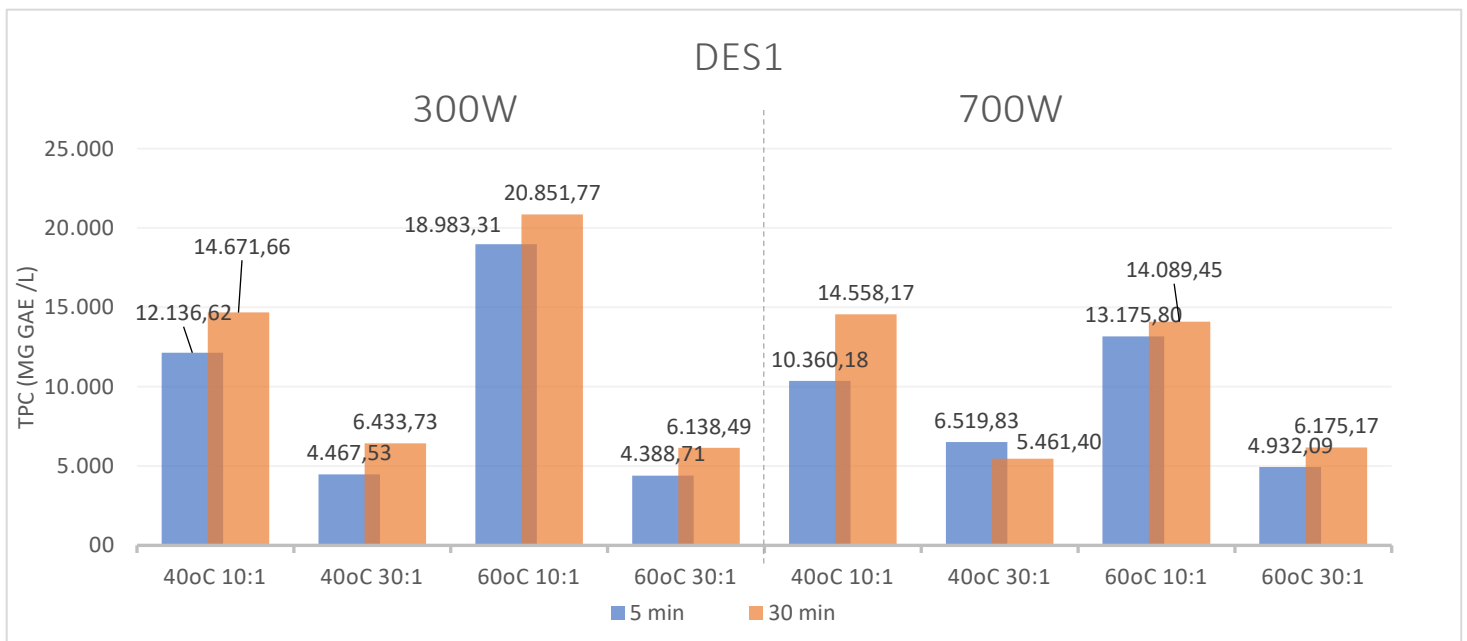
Διάγραμμα 27: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην αντιοξειδωτική δράση για διαλύτη 50% EthOH-W



Διάγραμμα 28 :Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για διαλύτη 50% EthOH-W



Διάγραμμα 29: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα στην αντιοξειδωτική δράση για διαλύτη DES 1



Διάγραμμα 30: Η ταυτόχρονη επίδραση του χρόνου, της ισχύος, της θερμοκρασίας και του λόγου διαλύτη/βιομάζα ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για διαλύτη DES 1

Στο Διάγραμμα 23 απεικονίζεται η επίδραση της αύξησης του χρόνου από τα 5 σε 15 και τελικά 30 min, στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα για συνθήκες 50o C, 500W

και 20:1. Η αντιοξειδωτική δράση ενώ αυξάνεται σημαντικά από τον χρόνο εκχύλισης 5 σε 15 min, μετά όταν ο χρόνος εκχύλισης αυξήθηκε στα 30 min η αντιοξειδωτική δράση μειώθηκε. Το ίδιο ισχύει και για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, όπου με αύξηση του χρόνου από τα 5 στα 15 min αυξάνεται και το TPC, ενώ στα 30 min μειώνεται. Οι μεταβολές του TPC και του TEAC με τον χρόνο ισχύει και για το 50% EthOH-W και για DES 1. Ενώ όλες οι μεταβολές κυμαίνονται μεταξύ 10% και 20%, το TPC για DES 1 στα 30 min μειώνεται κατά 40% σε σχέση με εκείνο στα 15 min, πράγμα που δηλώνει ότι η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης μπορεί να μειώσει αισθητά την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων.

Γενικά, η αύξηση του χρόνου εκχύλισης αυξάνει το TPC και το TEAC των εκχυλισμάτων, μιας και θα πρέπει το σύστημα να απορροφήσει την ενέργεια των μικροκυμάτων, να προάγει την συσσώρευση θερμότητας στον διαλύτη και τελικά να διαλυθούν οι φαινολικές ενώσεις στον διαλύτη. Όμως, η εκτεταμένη διάρκεια εκχύλισης και έκθεσης σε ακτινοβολία μικροκυμάτων μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση ορισμένων θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και σε άλλες μελέτες σχετικά με την υποβάθμιση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων φλοιών ροδιού μετά από παρατεταμένη ΜΑΕ. [40]

3.3.2.3 Επίδραση της ισχύος (συμβατικού και DES διαλύτη) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Στο Διάγραμμα 25 απεικονίζεται η επίδραση της αύξησης της ισχύος των μικροκυμάτων, από 300 σε 500 και τελικά σε 700 W, στην εκχύλιση με μικροκύματα στις συνθήκες 15 λεπτά, 50 °C και αναλογία διαλύτη/βιομάζα 20:1. Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με διαλύτη 50% EthOH-W, επηρεάζεται λίγο από την αύξηση της ισχύος. Αντίθετα στα εκχυλίσματα με διαλύτη το DES 1 η αύξηση της ισχύος επιφέρει μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος, με μεγαλύτερη μείωση να είναι αυτή από 300 σε 500 W. Αντίθετα η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων αυξάνεται για αύξηση της ισχύος από 300 σε 500 W ενώ με την περαιτέρω αύξηση στα 700 W, η φαινολική συγκέντρωση μειώνεται. Αυτό ισχύει και για τα εκχυλίσματα με 50% EthOH-W και με DES 1, με τα τελευταία, να μειώνεται το φαινολικό περιεχόμενο σχεδόν στο μισό. Από τα Διαγράμματα 28 και 30 φαίνεται πως με την αύξηση της ισχύος από 300 W στα 700 W, για διάφορες τιμές θερμοκρασίας, χρόνου εκχύλισης και αναλογίας, το TPC μειώνεται.

Η αρχική αύξηση του TPC για μεταβολή από τα 300 στα 500 W, οφείλεται στο ότι η ακτινοβολία των μικροκυμάτων αυξάνει απότομα την πίεση ενδοκυτταρικά και διευκολύνεται η καταστροφή των κυττάρων του φλοιού. Έτσι επιτυγχάνεται η απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων στο διαλύτη. [88] Η μετέπειτα μείωση του TPC μπορεί να οφείλεται στην υποβάθμιση και τη θερμική αποικοδόμηση των βιοδραστικών συστατικών του εκχυλίσματος, λόγω της εκτεταμένης έκθεσης σε υψηλή ισχύ μικροκυμάτων. [40] Επίσης η αύξηση της ισχύος μπορεί να μειώσει την καθαρότητα του εκχυλίσματος, αφού την καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος μπορούν να διαλυθούν περισσότερες ενώσεις, πέρα από αυτές που είναι επιθυμητές, το οποίο μπορεί να εξηγήσει και την μείωση του TEAC. [40]

3.3.2.4 Επίδραση της θερμοκρασίας (συμβατικού και DES διαλύτη) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Στο Διάγραμμα 24 απεικονίζεται η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας, από 40 σε 50 και τελικά σε 60 °C, στην εκχύλιση με μικροκύματα για τις συνθήκες 15min, 500W και αναλογία 20:1. Η αντιοξειδωτική δράση για τα εκχυλίσματα 50% EthOH-W, μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην θερμοεθαισθησία των βιοδραστικών συστατικών. Αντίθετα για τα εκχυλίσματα με DES 1, η αρχική αύξηση από 40 σε 50 °C, έφερε αύξηση στο TEAC, ενώ η περαιτέρω αύξηση στους 60 °C, μείωσε την αντιοξειδωτική δράση. Η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και για τα εκχυλίσματα με διαλύτη 50% EthOH-W και DES 1 αυξήθηκε με την αύξηση από 40 σε 50 °C, ενώ η περαιτέρω αύξηση στους 60 °C μειώνει το TPC.

Η μείωση τόσο της αντιοξειδωτικής δράσης όσο και του συνολικού φαινολικού περιεχομένου οφείλεται στην θερμοεθαισθησία των βιοδραστικών συστατικών. [53] Η αρχική αύξηση του TPC και για τους δύο διαλύτες και του TEAC του DES 1, μπορεί να οφείλεται στο ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες οι συντελεστές διαλυτότητας και διάχυσης των προς εκχύλιση φαινολικών ενώσεων αυξάνονται και το ιξώδες του διαλύτη μειώνεται, όπως φαίνεται στον πίνακα 16, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διέλευση του από την βιομάζα και συνεπώς να ευνοείται η εκχύλιση με μικροκύματα. [2, 4]

Εδώ πρέπει να σημειωθεί, ότι η θερμοκρασία εξαρτάται από την ισχύ των μικροκυμάτων καθώς όσο αυτή αυξάνεται, αυξάνεται και η θερμοκρασία. Η συσκευή των μικροκυμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τα παραπάνω πειράματα, ρυθμίζει την ισχύ των μικροκυμάτων, αν η θερμοκρασία ξεπεράσει την επιθυμητή, δηλαδή η ισχύς μπορεί να μην είναι σταθερή καθόλη την διάρκεια της εκχύλισης. Στις εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν η θερμοκρασία ελεγχόταν με εξωτερική ψύξη, ώστε το εκχύλισμα να διατηρεί την θερμοκρασία και την ισχύ του σταθερή.

3.3.2.5 Επίδραση του λόγου διαλύτη/βιομάζα (συμβατικού και DES διαλύτη) στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζεται η επίδραση της αύξησης του λόγου διαλύτη/βιομάζα από 10:1 σε 20:1 και τελικά σε 30:1, στην αντιοξειδωτική δράση και στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, για τις συνθήκες 15min, 500W και 50°C. Είναι φανερό ότι με την αύξηση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα τόσο το TEAC όσο και το TPC μειώνονται και για τους δύο διαλύτες, 50% EthOH-W και DES 1. Μάλιστα η μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου είναι πιο έντονη από ότι η μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης. Από τα Διαγράμματα 28 και 30 φαίνεται ότι με την αύξηση του λόγου από 10:1 σε 30:1 μειώνει αισθητά το TPC, σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική δράση που μειώνεται αλλά σε μικρότερο βαθμό, όπως φαίνεται και από τα Διαγράμματα 27 και 29. Η μείωση αυτή είναι εμφανής για κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας, ισχύος και χρόνου και για τους δύο διαλύτες 50% EthOH-W και DES 1.

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.2.1.3, συνήθως στην βιβλιογραφία, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα, αφού συμβάλει στην καλύτερη ανάμιξη και στην ταχύτερη και εντονότερη διάχυση. Η μείωση που παρατηρείτε στην παρούσα εργασία οφείλετε και στην κλασική και στην εκχύλιση με μικροκύματα

πιθανώς στο ότι η βέλτιστη εκχύλιση επιτυγχάνεται σε κάποιο σημείο κάτω από την αναλογία 20:1 και συνεπώς η προσθήκη διαλύτη ουσιαστικά αραιώνει το εκχύλισμα. Ακόμη η μείωση του TEAC και του TPC μπορεί να οφείλεται στο ότι η αύξηση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα, μειώνει την εκλεκτικότητα και οδηγεί στην εκχύλιση ανεπιθύμητων ενώσεων. [98] Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, η μεγάλη συγκέντρωση διαλύτη μπορεί να παρεμποδίζει την προσρόφηση των μικροκυμάτων από την βιομάζα, δηλαδή η ενέργεια από τα μικροκύματα να είναι ανεπαρκής για την ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος και γι' αυτό η αύξηση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα να μειώνει την απόδοση της εκχύλισης. [40]

3.3.2.6 Συνδυαστικό αποτέλεσμα παραμέτρων

Για τα εκχυλίσματα με διαλύτη 50% EthOH-W, μπορεί να εξεταστεί το συνεργιστικό αποτέλεσμα των παραμέτρων (χρόνος, ισχύς μικροκυμάτων, θερμοκρασία και αναλογία διαλύτη/ βιομάζα) από τα διαγράμματα 27 και 28. Από αυτά μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αύξηση της ισχύος, της θερμοκρασίας και του χρόνου με ταυτόχρονη μείωση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα μπορούν να αυξήσουν τόσο την αντιοξειδωτική όσο και την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Όμως από τα Διαγράμματα 24-26 συμπεραίνεται ότι οι ενδιάμεσες τιμές ισχύος, θερμοκρασίας και χρόνου, έχουν καλύτερα αποτελέσματα. Το Διάγραμμα 26 συμφωνεί με το ότι ο λόγος διαλύτη/ βιομάζα πρέπει να είναι μικρός για την βέλτιστη απόδοση της εκχύλισης.

Για τα εκχυλίσματα με διαλύτη DES 1 το συνεργιστικό αποτέλεσμα των παραμέτρων από τα Διαγράμματα 23, 24, 25 και 26 δείχνει ότι για την βέλτιστη τιμή αντιοξειδωτικής δράσης και ολικού φαινολικού περιεχομένου η ισχύς και ο λόγος διαλύτη/ βιομάζα πρέπει να είναι μικροί ενώ ο χρόνος και η θερμοκρασία να είναι υψηλοί. Το ίδιο συμπέρασμα επιβεβαιώνεται από τα Διάγραμμα 29 και Διάγραμμα 30.

3.3.3 Μοντελοποίηση αντιοξειδωτικής δράσης και ολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων για εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα με διαλύτη 50% αιθανόλη- νερό

Για να μπορέσει να εξαχθεί ένα συμπέρασμα για την εξάρτηση των παραμέτρων της εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός. Από τον πειραματικό σχεδιασμό για την εκχύλιση με διαλύτη το 50% EthOH-W και με την ανάλυση ANOVA αναπτύσσεται ένα μοντέλο που μπορεί να περιγράψει την αντιοξειδωτική δράση και την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων συναρτήσει των παραμέτρων: χρόνος (t), ισχύς (P), θερμοκρασία (T) και λόγος διαλύτη/βιομάζα (L/s). Ως μεταβλητή απόκρισης, η απόδοση, δεν έδωσε καλή συσχέτιση με το μοντέλο και γι' αυτό δεν παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία. Από την στατιστική αυτή ανάλυση εξάγονται οι παρακάτω εξισώσεις.

Οι εξισώσεις που μπορούν να περιγράψουν το μοντέλο είναι:

$$TEAC = 1010,92 + 187,14 * t + 0,13 * P - 35,69 * T - 4,39 * L/s - 3,51 * t * T - 5,39 * t^2 + 0,52 * T^2 + 0,10 * t^2 * T$$

Εξίσωση 6: Εξίσωση πρόβλεψης αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος από εκχύλιση με μικροκύματα, για διαλύτη 50% EthOH-W

$$TPC = 18060,22 + 8,54 * t + 9,96 * P - 42,08 * T - 756,02 * L/s - 0,36 * P * L/s + 13,75 * (L/s)^2$$

Εξίσωση 7: Εξίσωση πρόβλεψης συνολικής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων εκχυλίσματος από εκχύλιση με μικροκύματα, για διαλύτη 50% EthOH-W

Τα αποτελέσματα από το DESIGN-EXPERT 7.0.0 αναφορικά με την ανάλυση ANOVA παρουσιάζονται στον πίνακα 19. Στατιστικά θα πρέπει οι τιμές των F-values να είναι υψηλές και των p-values να είναι μικρότερα του 0,005, έτσι ώστε η παράμετρος να θεωρείται στατιστικά σημαντική για το μοντέλο. Ειδικότερα αν το p-value < 0,0001, αυτό υποδεικνύει την υψηλή σημαντικότητα της παραμέτρου. Για την αντιοξειδωτική δράση το μοντέλο είναι σημαντικό αφού p-value=0,0007<0,005 και πιο σημαντικές παράμετροι είναι η ισχύς (P), η θερμοκρασία (T), ο λόγος διαλύτη/ βιομάζα (L/s) και το τετράγωνο του χρόνου επί την θερμοκρασία (t²T). Για την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων το μοντέλο είναι ισχυρά στατιστικά σημαντικό αφού p-value<0,0001 και οι πιο σημαντικές παράμετροι είναι ο λόγος διαλύτη/ βιομάζα (L/s), η παράμετρος αλληλεπίδρασης ισχύος και λόγου L/s και το τετράγωνο του λόγου L/s. Να σημειωθεί ότι οι υπόλοιποι παράμετροι που δεν είναι στατιστικά τόσο σημαντικοί υπάρχουν λόγω ιεραρχίας.

Πίνακας 19: Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και μετρήσεις της ακρίβειας πρόβλεψης του μοντέλου

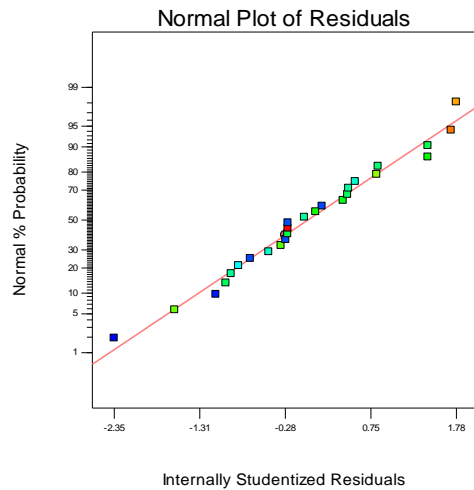
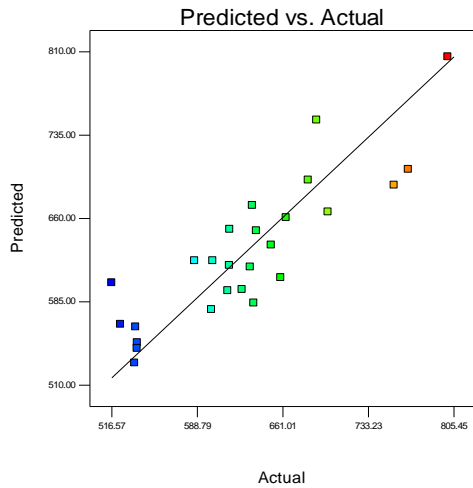
Source	TPC		TEAC	
	F Value	p-value	F Value	p-value
Model	40,4	< 0,0001	6,4	0,0007
t	0,2	0,6864	2,2	0,1608
P	4,2	0,0533	6,4	0,0217
T	2,6	0,1239	16,6	0,0008
L/s	219,8	< 0,0001	16,9	0,0007
t*T			0,3	0,5717
P*L/s	6,8	0,0168		
t ²			3,2	0,093
T ²			4,4	0,0518
L/s ²	8,4	0,009		
t ² T			20,1	0,0003
Std. Dev.	1109,03		45,30	
Mean	8778,37		629,39	
C.V. %	12,63		7,20	
R-Squared	0,93		0,75	
Adj R-Squared	0,90		0,62	

Pred R-Squared	0,86	0,42
Adeq Precision	17,83	10,34

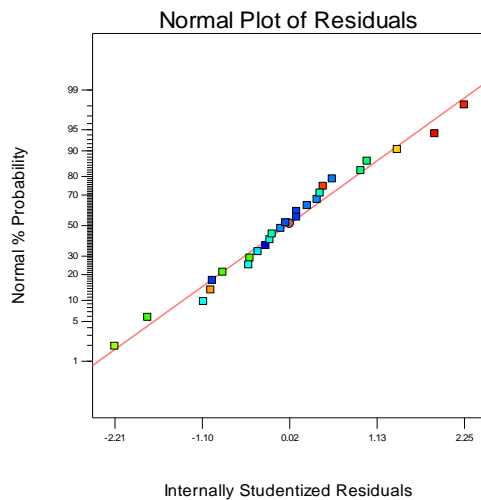
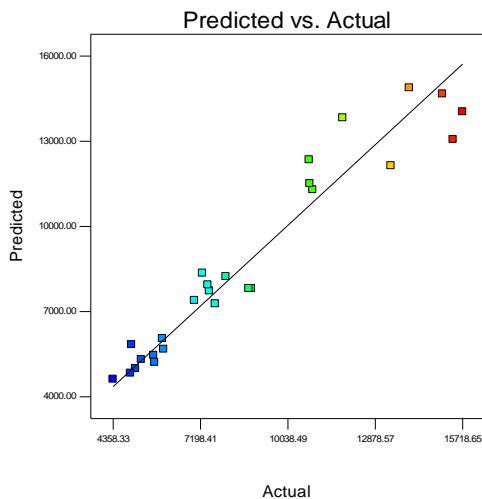
Μερικά από τα μέτρα ακρίβειας του μοντέλου που περιγράφει την ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων φαίνονται στον πίνακα 19. Μπορεί να εξαχθεί λοιπόν το συμπέρασμα ότι το μοντέλο πρόβλεψης είναι αξιόπιστο αφού το R^2 είναι μεγαλύτερο του 0,9 καθώς και οι τιμές $R^2_{Adjusted}$ και $R^2_{Predicted}$, είναι σε λογική συμφωνία, δηλαδή η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0,2 και οι τιμές είναι μεγαλύτερες του 0,85. Τέλος, η τιμή Adeq Precision που είναι μεγαλύτερη από 4, δείχνει πως το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη στο χώρο σχεδιασμού, δηλαδή στα ανώτερα και κατώτερα όρια των παραμέτρων. Όσον αφορά την πρόβλεψη της αντιοξειδωτικής δράσης το R^2 είναι 0,75, πράγμα που σημαίνει ότι το μοντέλο δεν είναι τόσο αξιόπιστο. Όμως τα $R^2_{Adjusted}$ και $R^2_{Predicted}$, είναι σε λογική συμφωνία, δηλαδή η διαφορά τους είναι μικρότερη από 0,2 και η τιμή Adeq Precision που είναι μεγαλύτερη από 4, δείχνει πως το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη στο χώρο σχεδιασμού. Ακόμη το μέσο σφάλμα μεταξύ πειραματικής τιμής και προβλεπόμενης από το μοντέλο για το TEAC είναι 7,5%, ενώ για το TPC είναι 4,7%. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (%C.V.), εκφράζει το σφάλμα ως ποσοστό του μέσου όρου και υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση/ μέσο όρο. Για το TPC είναι 12,6%, ενώ για το TEAC είναι 7,2%.

Η συσχέτιση του μοντέλου στα πειραματικά σημεία και η ακρίβεια του μοντέλου είναι ικανοποιητική όπως φαίνεται και στα Διάγραμμα 31 και 32.

Τα διαφορετικά χρώματα στα σημεία εκφράζουν το πόσο μεγάλη ή μικρή είναι η αντιοξειδωτική δράση ή το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Η αύξηση της τιμής κάθε απόκρισης εκφράζεται με τη μετάβαση του χρώματος από το σκούρο μπλε στο πράσινο, το κίτρινο και, τέλος, το κόκκινο.



Διάγραμμα 32 Σχέση πειραματικών τιμών TEAC και τιμών από την πρόβλεψη του μοντέλου και η κανονική κατανομή των τιμών

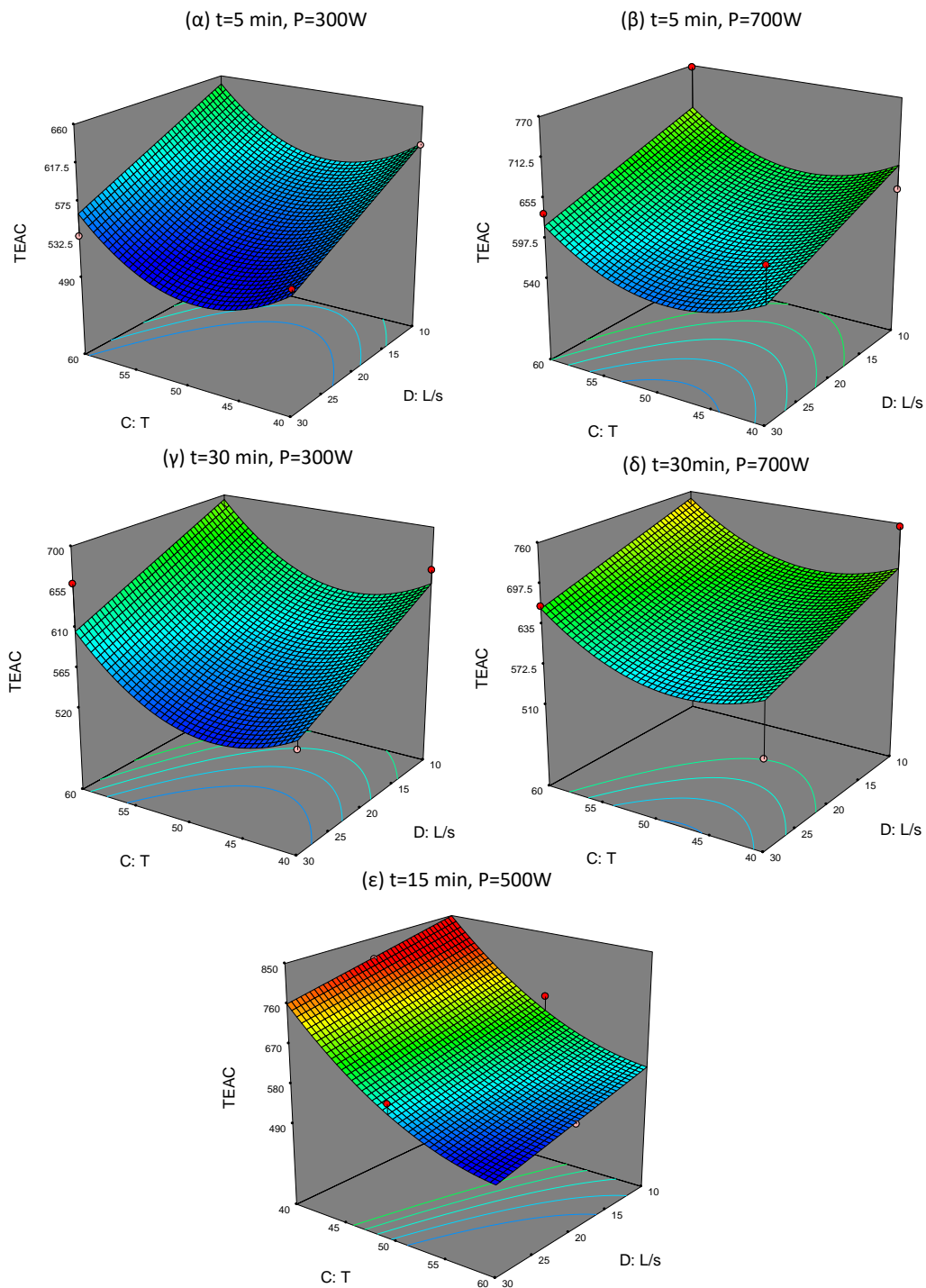


Διάγραμμα 31: Σχέση πειραματικών τιμών TPC και τιμών από την πρόβλεψη του μοντέλου και η κανονική κατανομή των τιμών

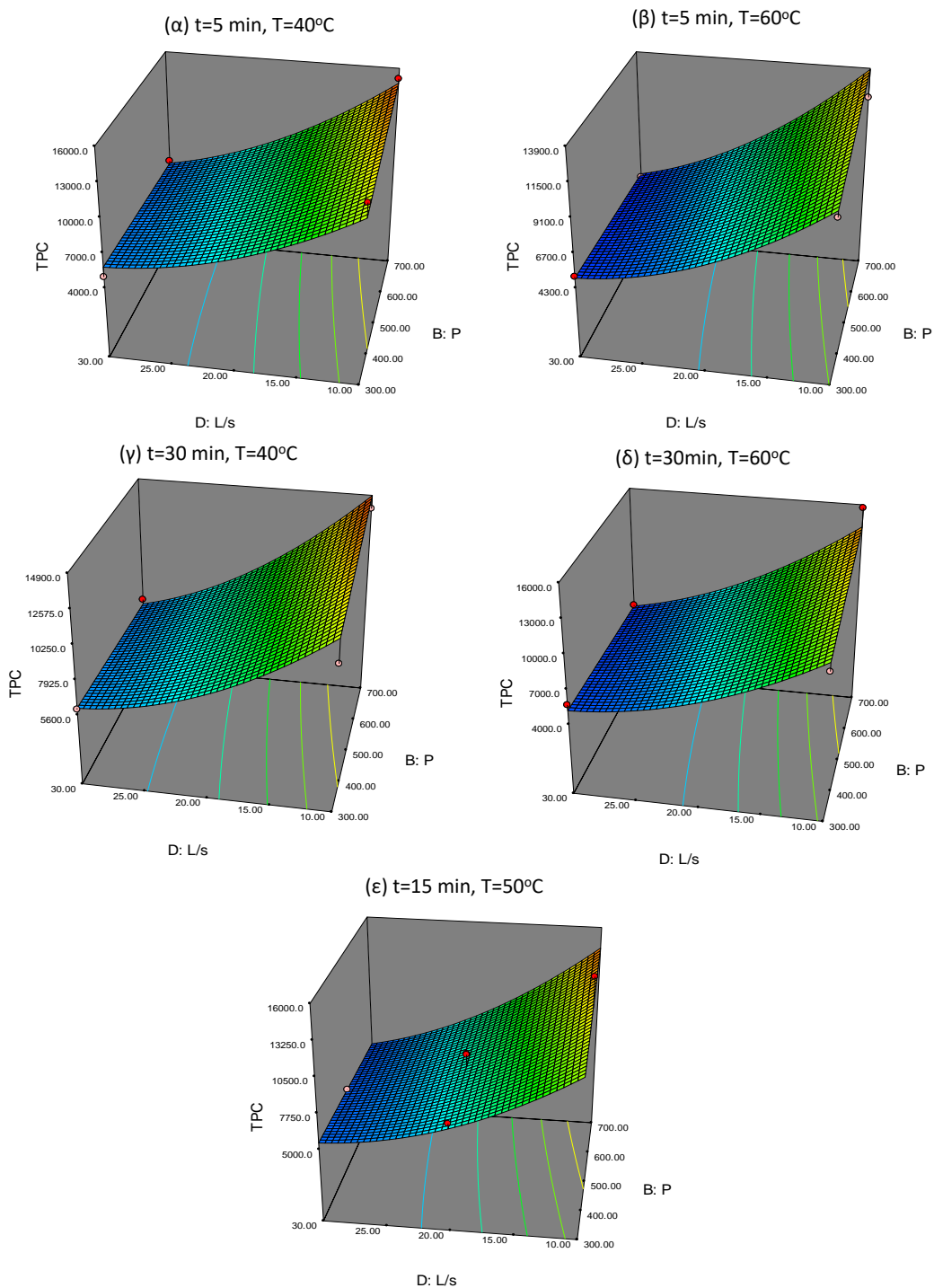
3.3.3.1 Μελέτη επίδρασης των παραμέτρων στην αντιοξειδωτική δράση και στα ολικά φαινορικά στα εκχυλίσματα από διαλύτη 50% αιθανόλη- νερό

Η αξιολόγηση της συμπεριφοράς των παραμέτρων του προβλεπόμενου μοντέλου, γίνεται μέσω των 3D απεικονίσεων των σημαντικών, για κάθε απόκριση, παραμέτρων της εκχύλισης. Στο Διάγραμμα 33, απεικονίζεται η απόκριση της αντιοξειδωτικής δράσης, για τις σημαντικές παραμέτρους, σύμφωνα με τον πίνακα 19, που είναι η θερμοκρασία και η αναλογία διαλύτη/ βιομάζα, για τα χαμηλά, κεντρικά και υψηλά επίπεδα της διάρκειας εκχύλισης και της ισχύος των μικροκυμάτων. Στο Διάγραμμα 34, απεικονίζεται η απόκριση της ολικής συγκέντρωσης

φαινολικών ενώσεων, που οι σημαντικές παράμετροι σύμφωνα με τον πίνακα 19, είναι η ισχύς και η αναλογία διαλύτη/ βιομάζα, για τα χαμηλά, κεντρικά και υψηλά επίπεδα της διάρκειας εκχύλισης και της θερμοκρασίας.



Διάγραμμα 33: 3D απεικόνιση της εξάρτησης του TEAC από της θερμοκρασίας και τον λόγο διαλύτη/βιομάζα



Διάγραμμα 34: 3D απεικόνιση της εξάρτησης του TEAC από της θερμοκρασίας και τον λόγο διαλύτη/βιομάζα

Η αύξηση της τιμής κάθε απόκρισης εκφράζεται με τη μετάβαση του χρώματος από το σκούρο μπλε στο πράσινο, το κίτρινο και, τέλος, το κόκκινο.

Από το Διάγραμμα 33, η αντιοξειδωτική δράση για κάθε συνδυασμό χρόνου και ισχύος, μεγιστοποιείται για μείωση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα και αύξηση της θερμοκρασίας. Η

μέγιστη αντιοξειδωτική δράση είναι για την συνθήκη 15 min, 500W, Διάγραμμα 33(e), και για τις ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας και λόγου διαλύτη/ βιομάζα.

Από το Διάγραμμα 34, η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων για κάθε συνδυασμό χρόνου και θερμοκρασίας, μεγιστοποιείται για μείωση του λόγου διαλύτη/ βιομάζα και αύξηση της ισχύος. Η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι για την συνθήκη 30 min, 40°C, Διάγραμμα 34(γ), και για την ελάχιστη τιμή λόγου διαλύτη/ βιομάζα και μέγιστης τιμής ισχύος.

3.3.3.2 Βελτιστοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα με διαλύτη το μίγμα 50% αιθανόλη- νερό

Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο που περιγράφεται από τις Εξίσωση 6 και Εξίσωση 7, η βέλτιστη συνθήκη σύμφωνα με το μοντέλο είναι για: 25,86 min, 699,07 W, 40°C, 10:1, με εκτιμώμενο TEAC 800,4 mg Trolox/L και TPC 14835,8 mg GAE/L. Σε σύγκριση με τις συνθήκες 30 min, 700W, 40°C, 10:1 (755,0 mg Trolox/L και TPC 13987,8 mg GAE/L) το σφάλμα τόσο στην αντιοξειδωτική όσο και στα συνολικά φαινολικά είναι 6%.

3.3.4 Σύγκριση με κλασική εκχύλιση

Συγκριτικά με την κλασική εκχύλιση με διαλύτη, το μίγμα 50%EthOH-W, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα δίνει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση αλλά μικρότερη ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων σε συνθήκες 50°C και 10:1. Σε συνθήκες 50°C και 20:1 η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα δίνει υψηλότερη ή οριακά ίση αντιοξειδωτική δράση αλλά μικρότερη ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Αυτό μπορεί να οφείλετε στην μεγάλη έκθεση του εκχυλίσματος στην κλασική εκχύλιση σε θερμοκρασία 50 °C και ενώ εκχυλίζονται περισσότερα ολικά φαινολικά στην συμβατική εκχύλιση αυτά είτε δεν έχουν αντιοξειδωτική δράση είτε λόγω της θέρμανσης χάνουν την ιδιότητα τους. Στον παρακάτω πίνακα 20 φαίνονται και οι διαφορές μεταξύ κλασικής και εκχύλισης με μικροκύματα για διαλύτη 50%EthOH-W και συνθήκες εκχύλισης 50°C και 10:1 ή 20:1.

Πίνακας 20 :Σύγκριση εκχυλισμάτων με διαλύτη 50% EthOH-W σε κλασική εκχύλιση με ανάδευση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Μέθοδος εκχύλισης	t (min)	P (W)	T (°C)	L/s	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
Κλασική	24h	-	50	10	558,6	18948,2
Με μικροκύματα	15	500	50	10	711,6	15411,5
Κλασική	24h	-	50	20	537,3	9619,1
Με μικροκύματα	5	500	50	20	531,6	7489,6
Με μικροκύματα	15	300	50	20	614,6	7680,3
Με μικροκύματα	15	500	50	20	601,9	8856,8

Με μικροκύματα	15	500	50	20	586,6	8773,2
Με μικροκύματα	15	700	50	20	638,7	7264,7
Με μικροκύματα	30	500	50	20	551,5	7439,1

Σε σύγκριση με την κλασική εκχύλιση, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα δίνει χαμηλότερες τιμές TEAC και TPC όταν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι ο ChCl-1,2butanediol. Ειδικότερα για λόγους σύγκρισης τα πειράματα που έγιναν για 50°C και 10:1 ή 20:1 έχουν μικρότερες τιμές από το πείραμα που έγινε με συμβατική εκχύλιση. Αυτό φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 21.

Πίνακας 21: Σύγκριση εκχυλισμάτων με διαλύτη DES 1 σε κλασική εκχύλιση με ανάδευση και υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Μέθοδος εκχύλισης	t (min)	P (W)	T (°C)	L/s	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
Συμβατική	24h	-	50	10	952,0	29704,7
Με μικροκύματα	15	500	50	10	723,8	18684,6
Συμβατική	24h	-	50	20	823,8	15906,7
Με μικροκύματα	5	500	50	20	533,4	10565,8
Με μικροκύματα	15	300	50	20	729,5	8872,6
Με μικροκύματα	15	500	50	20	627,8	12069,1
Με μικροκύματα	15	500	50	20	596,1	12136,6
Με μικροκύματα	15	700	50	20	602,1	6068,9
Με μικροκύματα	30	500	50	20	537,0	8562,8

3.3.5 Επίδραση ανάμειξης αιθανόλης με ChCl-1,2 βουτανοδιόλη στην αντιοξειδωτική δράση και στην ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων

3.3.5.1 Μεταβολή ιξώδους και πυκνότητας του ChCl-1,2 βουτανοδιόλη

Το ιξώδες και η πυκνότητα για το καθαρό ChCl-1,2 βουτανοδιόλη αλλά και με την ανάμειξη με αιθανόλη με αναλογία κατά βάρος, 70% DES1 -30% EthOH, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 21. Μετρήθηκαν το ιξώδες και η πυκνότητα μόνο στο εύρος 40°C -60 °C, που είναι το εύρος εξέτασης της εκχύλισης με μικροκύματα. [64]

Πίνακας 22: Ιξώδες και πυκνότητα καθαρής χλωριούχου χολίνης 1,2 βουτανοδιόλη και με μίξη με 30% κατά βάρος αιθανόλη

T (°C)	ChCl-1,2butanediol		70% ChCl-1,2butanediol - 30%EthOH	
	Ιξώδες (cP)	Πυκνότητα (g/cm ³)	Ιξώδες (cP)	Πυκνότητα (g/cm ³)
40	33,21	1,0235	7,26	0,9431
50	21,69	1,0175	6,39	0,9361
60	14,89	1,0104	5,19	0,9249

Από τον πίνακα 22, είναι φανερό πως με την μίξη του ChCl-1,2 βουτανοδιόλη, το ιξώδες και η πυκνότητα μειώνονται. Ειδικότερα το ιξώδες μειώνεται κατά 3,4 φορές σε θερμοκρασία 50 °C.

3.3.5.2 Επίδραση του TEAC και TPC στα εκχυλίσματα με διαλύτη ChCl-1,2 βουτανοδιόλη με την προσθήκη αιθανόλης

Πίνακας 23: Σύγκριση πειραμάτων με διαλύτες DES 1 και 50% EthOH-W καθώς και ανάμιξη DES 1 με αιθανόλη τόσο για συμβατική όσο και εκχύλιση με μικροκύματα

Μέθοδος εκχύλισης	Διαλύτης	t (min)	P (W)	T (°C)	L/s	TEAC (mg Trolox/L)	TPC (mg GAE/L)
Συμβατική	DES	24h	-	50	10	952,0	29704,7
Συμβατική	50% EthOH-W	24h	-	50	10	558,6	18948,2
Με μικροκύματα	DES	15	500	50	10	723,8	18684,6
Με μικροκύματα	50% EthOH-W	15	500	50	10	711,6	15411,5
Με μικροκύματα	70% DES- 30% EthOH	15	500	50	10	710,2	18506,2
Συμβατική	DES	24h	-	50	20	823,8	15906,7
Συμβατική	50% EthOH-W	24h	-	50	20	537,3	9619,1
Με μικροκύματα	DES	15	500	50	20	627,8	12069,1
Με μικροκύματα	DES	15	500	50	20	596,1	12136,6
Με μικροκύματα	50% EthOH-W	15	500	50	20	601,9	8856,8
Με μικροκύματα	50% EthOH-W	15	500	50	20	586,6	8773,2
Με μικροκύματα	70% DES- 30% EthOH	15	500	50	20	726,6	14753,2

Από τον πίνακα 23 για τα πειράματα με αναλογία 10:1 και μίγμα DES-EthOH παρατηρείτε ότι η προσθήκη αιθανόλης δεν αύξησε ούτε την αντιοξειδωτική δράση, ούτε τα ολικά φαινολικά που είναι πολύ κοντά με αυτά του καθαρού DES. Αντίθετα στην αναλογία 20:1, η χρήση του μίγματος DES-EthOH ευνόησε την εκχύλιση τόσο στην αντιοξειδωτική δράση (20,7% αύξηση) όσο και τα ολικά φαινολικά (21,3% αύξηση) είναι αυξημένα σε σχέση με την εκχύλιση με καθαρό DES. Η αύξηση αυτή οφείλετε κυρίως στην μείωση του ιξώδους του διαλύτη, όπως φαίνεται στον πίνακα 23, που όπως έχει αναφερθεί αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, αφού διευκολύνει την ανάμιξη και τα φαινόμενα μεταφοράς καθώς και την ευκολότερη διάχυση του στο εσωτερικό της στερεής βιομάζας.

Συνολικά συγκρίνοντας όλα τα αποτελέσματα που έγιναν για τις συνθήκες 15min, 50°C και αναλογία 10:1 και 20:1, παρατηρείτε ότι η συμβατική εκχύλιση με καθαρό DES δίνει καλύτερα αποτελέσματα από ότι με τα μικροκύματα.

4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού με κλασική υγρή εκχύλιση και εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction ή MAE). Εξετάστηκαν οι λειτουργικοί παράμετροι των διεργασιών ως προς την επίδραση τους στην απόδοση της εκχύλισης. Συγκεκριμένα για κάθε διαλύτη και μέθοδο εκχύλισης μελετήθηκε η συμπεριφορά ως προς: (α) την θερμοκρασία, στην κλασική εκχύλιση για 50 και 70 °C και στην εκχύλιση με μικροκύματα σε εύρος 40-60 °C, (β) τον χρόνο, με εύρος 5-30 min στην MAE, ενώ στην κλασική έμεινε σταθερός 24h, (γ) τον λόγο διαλύτη/βιομάζα, όπου στην κλασική εκχύλιση ήταν 10:1 και 20:1, ενώ στην MAE είχε εύρος από 10:1 έως 30:1 και (δ) την ισχύ της MAE με εύρος 300-700W. Η κοκκομετρία της βιομάζας δεν μελετήθηκε ως παράμετρος και έμεινε σταθερή κάτω από 100μm καθώς και η ανάδευση έμεινε σταθερή με ταχύτητα 300rpm. Τα εκχυλίσματα με τους διαφορετικούς διαλύτες και τρόπους εκχύλισης αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (Antioxidant Capacity ή TEAC) και το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις (Total Phenolic Content ή TPC).

Στην περίπτωση την κλασικής υγρής εκχύλισης μελετήθηκαν οι συμβατικοί διαλύτες νερό, αιθανόλη καθώς και μίγματα αυτών με κατά βάρος σύσταση 50% αιθανόλη- 50% νερό (50% EthOH-W) και 70% αιθανόλη- 30% νερό (70% EthOH-W), καθώς και οι Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs). Οι DES διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην κλασική υγρή εκχύλιση είναι ο διαλύτης χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη με κατά mol αναλογία 1:4 (DES 1) και χλωριούχος χολίνη/ 1,4 βουτανοδιόλη με κατά mol αναλογία 1:4 (DES 2). Τέλος, συνδυάστηκε η μέθοδος της εκχύλισης υποβοηθούμενης με μικροκύματα με τους πράσινους διαλύτες για να διαπιστωθεί αν ο συνδυασμός δυο πράσινων μεθόδων δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Στα πειράματα MAE χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το μίγμα 50% αιθανόλη- 50% νερό, χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη (DES 1) καθώς και μίγμα DES1 με αιθανόλη 30% κατά βάρος, για να εξεταστεί η επίδραση της αραιώσης του DES στην απόδοση της εκχύλισης. Για λόγους εξήγησης των επιδράσεων των λειτουργικών παραμέτρων και των αποτελεσμάτων μετρήθηκε ακόμη και η αντιοξειδωτική δράση (IC50) και η συνολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στα ξηρά εκχυλίσματα των εκχυλισμάτων της κλασικής εκχύλισης με συμβατικούς διαλύτες καθώς και το ιξώδες και η πυκνότητα του διαλύτη 70% χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη- 30% αιθανόλη.

Από τα αποτελέσματα της κλασικής εκχύλισης εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση την συνολικής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων συνεπάγεται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Από τους συμβατικούς διαλύτες, βέλτιστα αποτελέσματα είχε το εκχύλισμα με διαλύτη 50% αιθανόλη-νερό, στους 50°C και αναλογία διαλύτη/βιομάζα 10:1, με 558,6 mg Trolox/L η αντιοξειδωτική δράση και 18948,2 mg GAE/L η συνολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Στις συνθήκες που μελετήθηκαν, οι συμβατικοί διαλύτες κατατάσσονται σε σειρά μειούμενης αντιοξειδωτικής δράση και ολικού φαινολικού περιεχομένου ως εξής: 50%EthOH-W>70%EthOH-W> W> EthOH. Από τους DESs πιο αποδοτικός είναι ο DES 1 για τις συνθήκες 50°C και 10:1 με αντιοξειδωτική δράση 952 mg Trolox/L και συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων είναι 29704,7 mg GAE/L. Τέλος μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως οι πράσινοι διαλύτες (DESs), ειδικότερα ο DES 1 είναι πιο αποτελεσματικοί στην κλασική εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών αφού τόσο το TEAC και το TPC είναι μεγαλύτερα ή ίσα με αυτά των συμβατικών διαλυτών στις αντίστοιχες συνθήκες.

Γενικότερα τόσο οι συμβατικοί διαλύτες όσο και οι DESs έχουν καλύτερες τιμές TEAC και TPC για εκχυλίσεις στις συνθήκες 50°C και 10:1. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, η αντιοξειδωτική δράση και η συνολική συγκέντρωση μειώνονται. Το ίδιο ισχύει και για την αύξηση της αναλογίας διαλύτη/βιομάζα.

Στην εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα οι βέλτιστες τιμές για την εκχύλιση με 50% αιθανόλη-νερό είναι 711,6 mg Trolox/L η αντιοξειδωτική δράση και 15411,6 mg GAE/L η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, για τις συνθήκες εκχύλισης 15min, 500W, 50°C και 10:1. Αντίστοιχα για το DES 1 οι βέλτιστες τιμές TEAC και TPC είναι 787 mg Trolox/L και 20851,8 mg GAE/L, αντίστοιχα. Είναι φανερό πως στην MAE, ο διαλύτης DES είναι πιο αποτελεσματικός.

Αντίστοιχα με την κλασική εκχύλιση, και στην εκχύλιση με μικροκύματα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται για θερμοκρασία 50°C και αναλογία διαλύτη/ βιομάζα 10:1. Από την ανάλυση για το εύρος συνθηκών που διεξήχθησαν τα πειράματα εκχύλισης με μικροκύματα, μπορούν να βγουν μερικά συμπεράσματα ως προς την επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων. Με την αρχική αύξηση του χρόνου εκχύλισης τόσο στα εκχυλίσματα με διαλύτη 50% EthOH-W όσο και με τον DES1, η αντιοξειδωτική δράση και η ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων αυξάνονται ενώ με την περαιτέρω αύξηση, μειώνονται. Με την αύξηση της ισχύος των μικροκυμάτων, το TEAC μένει σταθερό ή είχε μικρή μείωση, ενώ το TPC με την αρχική αύξηση αυξάνεται και με την περαιτέρω αύξηση μειώνεται και για τους δύο διαλύτες. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, το TEAC στην περίπτωση του διαλύτη 50% EthOH-W μειώνεται, ενώ η αντιοξειδωτική δράση του DES1, με την αρχική αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και στην συνέχεια μειώνεται. Το TPC και για τους δύο διαλύτες, με την αρχική αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται, ενώ με την περαιτέρω αύξηση άρχισε να μειώνεται. Τέλος, με την αύξηση του λόγου διαλύτη/βιομάζα, τόσο το TEAC όσο και το TPC και για τους δυο διαλύτες μειώνονται.

Οι λειτουργικές παράμετροι της εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα, δρουν και συνεργιστικά μεταξύ τους. Για πιο ασφαλή συμπεράσματα, έγινε πειραματικός σχεδιασμός της εκχύλισης και τα αποτελέσματα του TEAC και TPC, ελέγχθηκαν στατιστικά, ώστε να εξάγουν μια εμπειρική σχέση που να εξάγει ασφαλή συσχέτιση μεταξύ των TEAC και TPC, με τις λειτουργικές παραμέτρους.

Τέλος, στην εκχύλιση με μικροκύματα, έγιναν πειράματα με διαλύτη 70% DES 1 – 30% EthOH. Τα πειράματα έγιναν στις συνθήκες 15min, 500W, 50°C, 10:1 και 20:1. Στην περίπτωση των πειραμάτων με αναλογία 10:1, η ανάμιξη του DES 1 με αιθανόλη δεν επέφερε κάποια σημαντική αλλαγή ούτε στο TEAC ούτε στο TPC. Αντίθετα στην αναλογία 20:1, τα αποτελέσματα της εκχύλισης με διαλύτη το DES 1 με ανάμιξη με αιθανόλη, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα και TEAC και TPC, σε σύγκριση με τα πειράματα σε εκχύλιση με μικροκύματα στις ίδιες συνθήκες.

Συνοψίζοντας, για εκχύλιση με συμβατικό διαλύτη, το μίγμα 50% αιθανόλη- νερό και για συνθήκες 50°C και 10:1 δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Για αυτόν τον διαλύτη καλύτερα αποτελέσματα τα δίνει η μέθοδος εκχύλισης υποβοηθούμενης από μικροκύματα. Για εκχύλιση με DESs καλύτερος διαλύτης είναι η χλωριούχος χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη με αναλογία 1:4 κατά mol. Η κλασική εκχύλιση με DES δίνει καλύτερα αποτελέσματα από την εκχύλιση με μικροκύματα, με αύξηση τόσο σε αντιοξειδωτική δράση όσο και σε ολική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων που ανέρχεται στο 40%. Η ανάμιξη αιθανόλης με DES 1, δεν επηρέασε πολύ την απόδοση της εκχύλισης και σε κάθε περίπτωση η εκχύλιση με DES 1 ήταν πιο αποδοτική. Τελικά τα βέλτιστα αποτελέσματα λήφθηκαν για κλασική υγρή εκχύλιση

με διαλύτη την χλωριούχο χολίνη/ 1,2 βουτανοδιόλη με γραμμομοριακή αναλογία 1:4, στις συνθήκες 50°C και 10:1.

5 Προτάσεις για το μέλλον

Η μελέτη της ανάκτησης βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια μιας και η παραγωγή ροδιού και η βιομηχανία της χυμοποίησης του, έχει αναπτυχθεί πολύ την τελευταία δεκαετία. Η ταυτόχρονη τάση της εποχής για στροφή από το γραμμικό μοντέλο παραγωγής στο κυκλικό, θέτει στην βιομηχανία την ανάγκη για αναζήτηση βιώσιμων εναλλακτικών αξιοποίησης των αποβλήτων, στην προκειμένη περίπτωση του φλοιού του ροδιού, που αποτελεί σχεδόν το 50 % του καρπού. Ακόμη η ανησυχία για την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών και η διαπίστωση ότι η απορρόφηση των φυσικών αντιοξειδωτικών από τον άνθρωπο είναι καλύτερη, οδήγησε στην εντατικοποίηση της έρευνας για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από τον φλοιό του ροδιού.

Τα πιο στενά πλαίσια που έχουν ορισθεί για τους διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά καθώς και η ανάγκη για οικονομικότερη και ενεργειακά βιώσιμες μεθόδους εκχύλισης οδήγησαν στην μελέτη των πράσινων διαλυτών και καινοτόμων μεθόδων εκχύλισης όπως είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε πως τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν για εκχύλιση από διαλύτη την χλωριούχο χολίνη-1,2 βουτανοδιόλη (DES 1) και με μέθοδο εκχύλισης την κλασική υγρή εκχύλιση στους 50°C, αναλογία διαλύτη/βιομάζα 10:1 και χρόνο εκχύλισης τις 24h. Προτείνεται η έρευνα για χαμηλότερες θερμοκρασίες εκχύλισης, μιας και η τάση ήταν ότι με αύξηση της θερμοκρασίας, η αντιοξειδωτική δράση και τα συνολικά φαινορικά μειώνονταν. Επίσης η μείωση της θερμοκρασίας, καθιστά την μέθοδο οικονομικότερη και πιο φιλική προς το περιβάλλον αφού δεν δαπανάτε ενέργεια για την θέρμανση. Ακόμη θα μπορούσε να εξετασθεί και ως παράμετρος ο ρυθμός ανάδευσης, για να διαπιστωθεί σε τι ποσοστό επηρεάζει την εκχύλιση καθώς και η κοκκομετρία της βιομάζας. Τέλος στην κλασική εκχύλιση με DES 1 αξίζει να μελετηθεί και η επίδραση του χρόνου, μιας και με μείωση του χρόνου, μπορεί να λαμβάνονται ίδια ή και καλύτερα αποτελέσματα με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας.

Αν και η εκχύλιση με διαλύτη το DES 1 μελετήθηκε και με μια καινοτόμα μέθοδο, την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα, τα αποτελέσματα από αυτή δεν ήταν όσο καλά όσο αυτά της κλασικής εκχύλισης. Γι' αυτό προτείνεται η μελέτη της εκχύλισης με άλλες παραμέτρους χρόνου, θερμοκρασίας, ισχύος μικροκυμάτων και αναλογίας διαλύτη/ βιομάζας, μιας και μπορεί να ληφθούν τελικά καλύτερα αποτελέσματα. Ακόμη, μιας και ο διαλύτης, έδωσε καλά αποτελέσματα στην κλασική εκχύλιση, μπορεί να μελετηθεί στο μέλλον και ο συνδυασμός του με άλλες μεθόδους εκχύλισης, όπως είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους.

Τέλος ο διαλύτης DES 1, αν και έχει σχετικά χαμηλότερο ιξώδες από ότι οι περισσότεροι DESs, θα ήταν ενδιαφέρον να εξετασθεί τόσο στην κλασική εκχύλιση όσο και στην εκχύλιση με μικροκύματα, είτε η ανάμιξη του με άλλη αναλογία αιθανόλης, από το 30% που εξετάστηκε στην παρούσα εργασία ή ακόμα και η ανάμιξη του με άλλο διαλύτη όπως είναι το νερό.

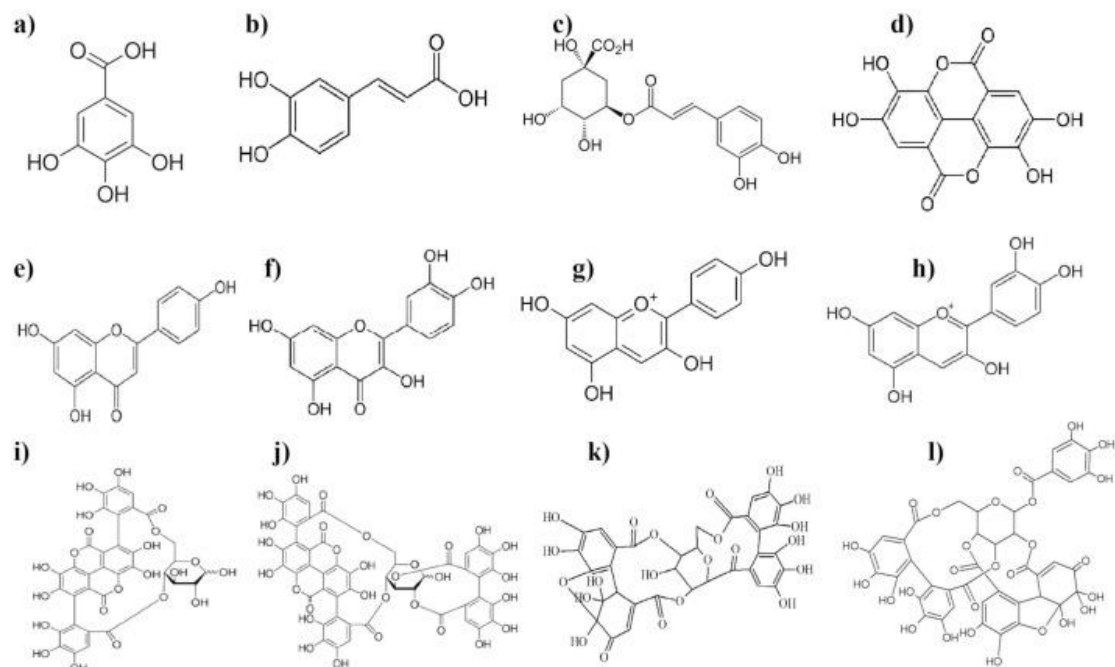
Αν και ο διαλύτης DES 1 αξίζει να μελετηθεί η χρήση του στην εκχύλιση, θα μπορούσε να μελετηθούν και άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνά στην βιβλιογραφία, όπως είναι

η γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη και το κιτρικό οξύ. Επίσης μιας και η διαθεσιμότητα των φλοιών του ροδιού είναι μεγάλη και η κύρια ζήτηση της αξιοποίησης τους είναι η βιομηχανία, θα πρέπει να γίνει μελέτη της εκχύλισης σε πιλοτική κλίμακα καθώς και μια οικονομική ανάλυση για την επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων του εκχυλίσματος του φλοιού του ροδιού για να ταυτοποιηθεί η σύσταση του σε ενώσεις και ποιες από αυτές προσδίδουν την αντιοξειδωτική δράση στο εκχύλισμα. Με αυτόν τον τρόπο θα διαπιστωθεί και η εκλεκτικότητα του κάθε διαλύτη στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών. Πολύ χρήσιμο θα ήταν και η μέτρηση του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή, αφού αυτά είναι που παρουσιάζουν την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Τέλος θα μπορούσε να γίνει μελέτη και για άλλες δράσεις του εκχυλίσματος, όπως είναι η αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδης, αντιϊκή και αντικαρκινική του δράση.

Πρόκληση αποτελεί η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από εκχυλίσματα DES, μιας και είναι δύσκολη, λόγω της αμελητέας τάσης ατμών των ευτηκτικών διαλυτών. Αν και οι ευτηκτικοί διαλύτες (DES) είναι μη τοξικοί, ανάλογα με την εφαρμογή τους, προτιμάται να απομακρύνεται ο διαλύτης και να ανακτώνται οι βιοδραστικές ενώσεις. Ο διαχωρισμός του ευτηκτικού διαλύτη από τα φαινολικά μπορεί να γίνει με ανακρυστάλλωση, χρωματογραφία προσρόφησης, χρήση ενός αντιδιαλύτη, υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα και εκχύλιση στερεής φάσης. Η χρωματογραφία προσρόφησης με μακροπορώδη ρητίνη είναι ένας απλός και αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού των φαινολικών ενώσεων από τον διαλύτη. Μετά την φόρτωση στην ρητίνη, γίνεται έκπλυση του δείγματος με νερό για την απομάκρυνση του DES και έπειτα το δείγμα εκπλένεται και με αιθανόλη. Η τελική ανάκτηση φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικών από το εκχύλισμα με DES, μπορεί να ξεπεράσει και το 90%, ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη ρητίνη. [67, 99, 100]. Η χρήση αντιδιαλύτη για την ανάκτηση φλαβονοειδών από το DES είναι μια επίσης μια απλή μέθοδος, αφού το εκχύλισμα, μετά την παραλαβή του από την φυγοκέντρηση, αραιώνεται με έναν οργανικό αντιδιαλύτη, όπως η μεθανόλη και στη συνέχεια φυγοκεντρείται εκ νέου για να δημιουργηθεί ένα διφασικό σύστημα. Το νεοεμφανιζόμενο υπερκείμενο υγρό είναι το σύστημα-στόχος (οργανικός διαλύτης με τα φαινολικά που ανακτήθηκαν) και ο αντιδιαλύτης μπορεί να απομακρυνθεί με εξάτμιση (π.χ. με φυγοκεντρική εξάτμιση υπό κενό). Τέλος, οι Tian et al, προτείνουν μια νέα μέθοδο ανάκτησης των φλαβονοειδών από το DES, που περιλαμβάνει τη μίμηση της μετουσίωσης του DNA στο DES. Ουσιαστικά, ο κύριος στόχος για την αφαίρεση των φλαβονοειδών από το DES είναι η διάσπαση του πλέγματος υδρογόνου που συγκρατεί το DES, διαδικασία παρόμοια με τη μετουσίωση και επιτυγχάνεται με την χρήση ενός μεταλλικού οργανικού πλαισίου χρωμίου από το οποίο η απομόνωση των φλαβονοειδών γίνεται ευκολότερη και πιο εκλεκτική. Αρχικά το DES αραιώνεται σε νερό, στη συνέχεια προστίθεται NaCl, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του πλέγματος υδρογόνου και η παρουσία του χρωμίου επιτρέπει στα φλαβονοειδή να προσκολληθούν σε αυτό και να απομακρυνθούν εύκολα από το αραιωμένο DES.[101]

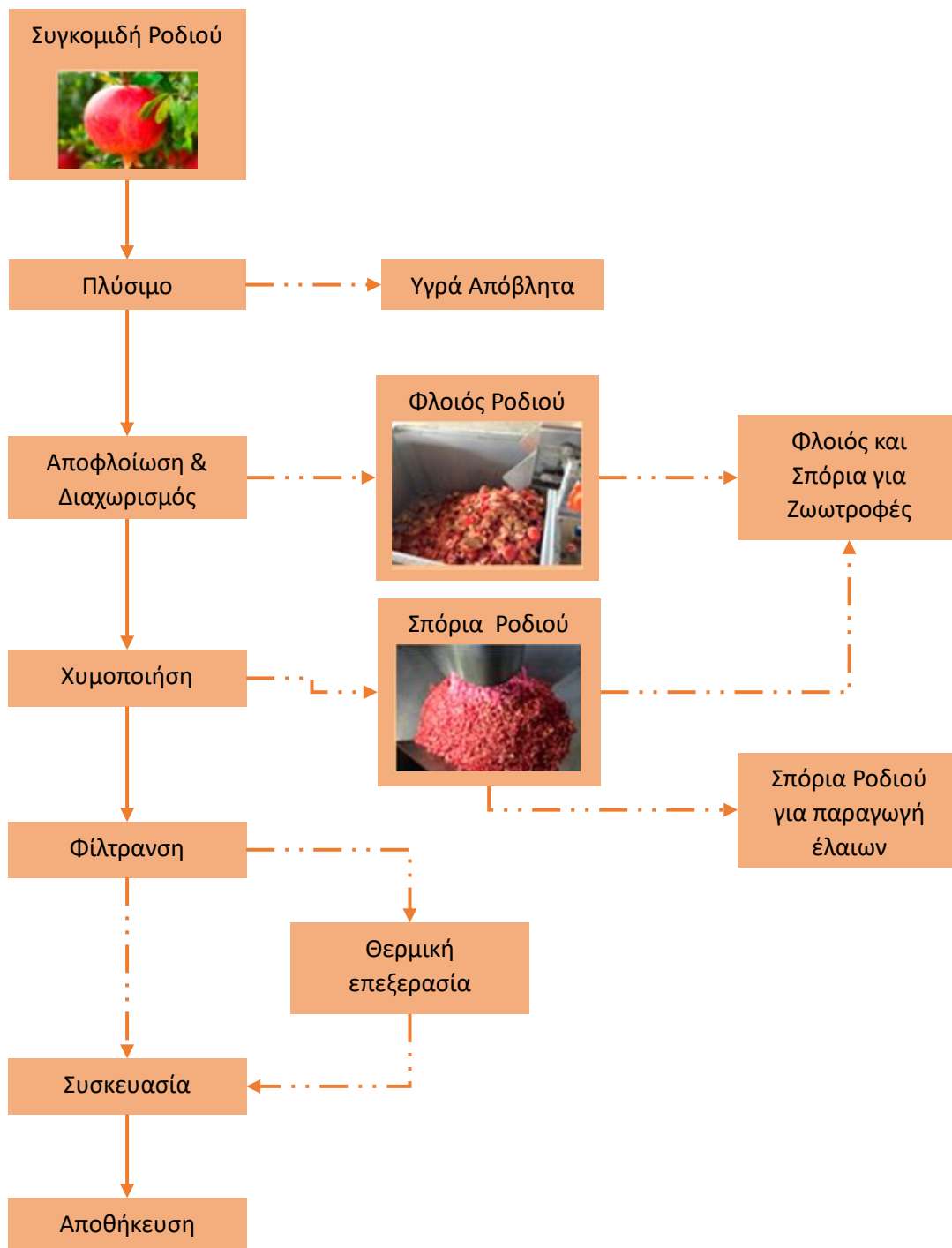
Παράρτημα Α: Χημικοί τύποι κύριων βιοδραστικών συστατικών του φλοιού του ροδιού



Εικόνα 6: Η χημική δομή των κύριων φαινολικών ενώσεων που εντοπίζονται στον φλοιό του ροδιού: (α) γαλλικό οξύ, (β) καφεϊκό οξύ, (γ) χλωρογενικό οξύ, (δ) ελλαγικό οξύ, (ε) απιγενίνη, (στ) κερκετίνη, (ζ) πελαργονιδίνη, (η) κυανιδίνη, (θ) πουνικαλαγίνη, (ι) granatin A, (ια) granatin B

Παράρτημα Β : Διαδικασία Χυμοποίησης Ροδιού

Σύμφωνα με τους Lampakis et al. η διαδικασία χυμοποίησης του ροδιού παράγει ως απόβλητα το φλοιό του ροδιού και τους σπόρους, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, που έως και σήμερα είτε απορρίπτεται στους ΧΥΤΑ είτε κομποστοποιείται είτε χρησιμοποιείται ως ζωτροφή.[7]

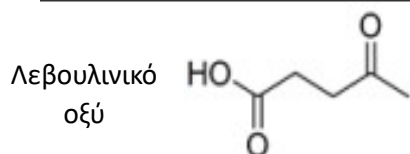
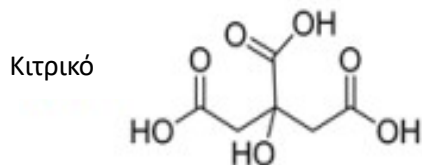
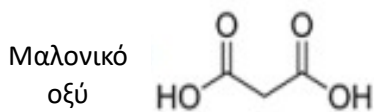
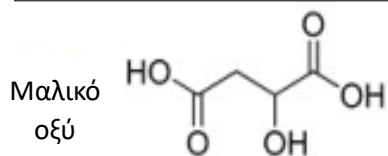
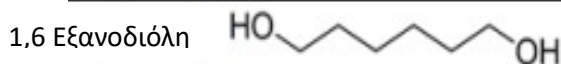
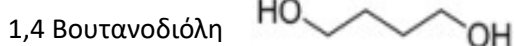
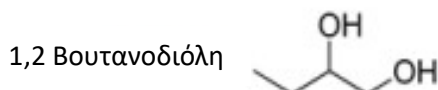
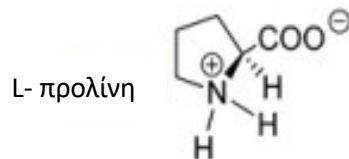
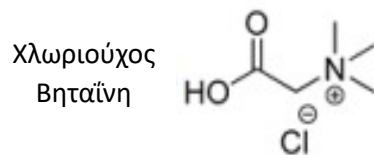
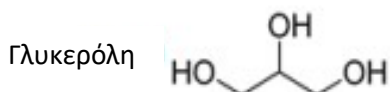
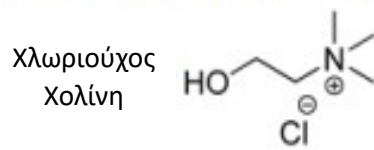
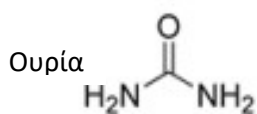


Παράρτημα Γ : Κύρια συστατικά των DESs που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι κύριοι δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών επικονίζονται στην παρακάτω εικόνα 8.

Δότης Δεσμού Υδρογόνου (HBD)

Δέκτης Δεσμού Υδρογόνου (HBA)



Εικόνα 8: Κύρια συστατικά των DESs για εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών

Βιβλιογραφία

1. Stover, E. and E.W. Mercure, *The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise*. HortScience horts, 2007. **42**(5): p. 1088-1092.
2. Kahramanoğlu, I., *Trends in pomegranate sector: production, postharvest handling and marketing*. Int. J. Agric. For. Life Sci, 2019. **3**: p. 239-246.
3. Singh, B., et al., *Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (Punica granatum L.) peel: A review*. Food Chemistry, 2018. **261**: p. 75-86.
4. Andrade, M.A., et al., *Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications?* Trends in Food Science & Technology, 2019. **86**: p. 68-84.
5. Li, Y., et al., *Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract*. Food Chemistry, 2006. **96**(2): p. 254-260.
6. Fischer, U.A., R. Carle, and D.R. Kammerer, *Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn*. Food Chemistry, 2011. **127**(2): p. 807-821.
7. Lampakis, D., P. Skenderidis, and S. Leontopoulos, *Technologies and Extraction Methods of Polyphenolic Compounds Derived from Pomegranate (Punica granatum) Peels. A Mini Review*. Processes, 2021. **9**(2): p. 236.
8. Magangana, T.P., et al., *Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (Punica granatum L.) Peel Waste: A Review*. Molecules, 2020. **25**(20): p. 4690.
9. Xiang, Q., et al., *The bioactivity and applications of pomegranate peel extract: A review*. Journal of Food Biochemistry, 2022. **46**(7): p. e14105.
10. Chan, C.-L., et al., *Enhancing antioxidant capacity of Lactobacillus acidophilus-fermented milk fortified with pomegranate peel extracts*. Food bioscience, 2018. **26**: p. 185-192.
11. El-Said, M.M., et al., *Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts*. Annals of Agricultural Sciences, 2014. **59**(2): p. 207-212.
12. Iqbal, S., et al., *Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions*. Food Research International, 2008. **41**(2): p. 194-200.
13. Naveena, B., et al., *Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties*. Meat science, 2008. **80**(4): p. 1304-1308.
14. Topuz, O.K., et al., *Influence of pomegranate peel (Punica granatum) extract on lipid oxidation in anchovy fish oil under heat accelerated conditions*. Journal of Food Science and Technology, 2015. **52**: p. 625-632.
15. Turgut, S.S., A. Soyer, and F. Işıkcı, *Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage*. Meat science, 2016. **116**: p. 126-132.
16. Çam, M., N.C. İçyer, and F. Erdoğan, *Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development*. LWT-Food Science and Technology, 2014. **55**(1): p. 117-123.
17. Kaderides, K., A.M. Goula, and K.G. Adamopoulos, *A process for turning pomegranate peels into a valuable food ingredient using ultrasound-assisted*

- extraction and encapsulation*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015. **31**: p. 204-215.
18. Bouarab-Chibane, L., et al., *Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging*. European Food Research and Technology, 2017. **243**: p. 1997-2009.
 19. Firuzi, M.R., et al., *Incorporation of pomegranate juice concentrate and pomegranate rind powder extract to improve the oxidative stability of frankfurter during refrigerated storage*. Lwt, 2019. **102**: p. 237-245.
 20. Kanatt, S.R., R. Chander, and A. Sharma, *Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products*. International journal of food science & technology, 2010. **45**(2): p. 216-222.
 21. Kennas, A., et al., *Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2020. **19**(1): p. 99-108.
 22. Sandhya, S., et al., *Preparation of pomegranate peel extract powder and evaluation of its effect on functional properties and shelf life of curd*. Lwt, 2018. **92**: p. 416-421.
 23. Udayasoorian, L., et al., *Comparative evaluation on shelf life extension of MAP packed Litopenaeus vannamei shrimp treated with natural extracts*. LWT, 2017. **77**: p. 217-224.
 24. Zhuang, S., et al., *Effects of pomegranate peel extract on quality and microbiota composition of bighead carp (Aristichthys nobilis) fillets during chilled storage*. Food microbiology, 2019. **82**: p. 445-454.
 25. Oliveira, R., et al., *Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves*. Journal of Dairy Science, 2010. **93**(9): p. 4280-4291.
 26. Chaudhary, A., et al., *Pomegranate peels waste hydrolyzate optimization by Response Surface Methodology for Bioethanol production*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021. **28**(9): p. 4867-4875.
 27. Talekar, S., et al., *An integrated green biorefinery approach towards simultaneous recovery of pectin and polyphenols coupled with bioethanol production from waste pomegranate peels*. Bioresource Technology, 2018. **266**: p. 322-334.
 28. Bhatnagar, A., M. Sillanpää, and A. Witek-Krowiak, *Agricultural waste peels as versatile biomass for water purification – A review*. Chemical Engineering Journal, 2015. **270**: p. 244-271.
 29. Rowayshed, G., et al., *Nutritional and chemical evaluation for pomegranate (Punica granatum L.) fruit peel and seeds powders by products*. Middle East Journal of Applied Sciences, 2013. **3**(4): p. 169-179.
 30. Ben Nasr, C., N. Ayed, and M. Metche, *Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1996. **203**(4): p. 374-378.
 31. Ullah, N., et al., *Proximate composition, minerals content, antibacterial and antifungal activity evaluation of pomegranate (Punica granatum L.) peels powder*. Middle East J Sci Res, 2012. **11**(3): p. 396-401.
 32. Kitts, D.D., *Bioactive substances in food: identification and potential uses*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1994. **72**(4): p. 423-434.
 33. Saad, H., et al., *Characterization of pomegranate peels tannin extractives*. Industrial crops and Products, 2012. **40**: p. 239-246.
 34. Hernández-Corroto, E., et al., *Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (Punica granatum L.) using pressurized liquids and deep eutectic solvents*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020. **60**: p. 102314.

35. Qu, W., et al., *Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products*. Food Chemistry, 2012. **132**(3): p. 1585-1591.
36. Ramlagan, P., et al., *Advances towards the analysis, metabolism and health benefits of punicalagin, one of the largest ellagitannin from plants, with future perspectives*. Phytomedicine Plus, 2022. **2**(3): p. 100313.
37. Shahidi, F. and Y. Zhong, *Measurement of antioxidant activity*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 757-781.
38. Waterhouse, A.L., *Determination of Total Phenolics*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2002. **6**(1): p. 11.1.1-11.1.8.
39. Antolovich, M., et al., *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst, 2002. **127**(1): p. 183-198.
40. Kaderides, K., et al., *Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction*. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2019. **137**: p. 1-11.
41. Trang, D.H.T., H.L. Son, and P.V. Trung, *Investigation on the <i>in vitro</i> antioxidant capacity of methanol extract, fractions and flavones from <i>Oroxylum indicum</i> Linn bark*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **54**.
42. Hinneburg, I., H.J. Damien Dorman, and R. Hiltunen, *Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices*. Food Chemistry, 2006. **97**(1): p. 122-129.
43. Alkhatib, M., et al., *Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum (Pomegranate) in Respiratory and Digestive Diseases: A Review*. Applied Sciences, 2022. **12**(23): p. 12326.
44. Veggi, P.C., J. Martinez, and M.A.A. Meireles, *Fundamentals of Microwave Extraction, in Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, F. Chemat and G. Cravotto, Editors. 2013, Springer US: Boston, MA. p. 15-52.
45. Atkins, P., P.W. Atkins, and J. de Paula, *Atkins' physical chemistry*. 2014: Oxford university press.
46. Berrueta, L., B. Gallo, and F. Vicente, *A review of solid phase extraction: basic principles and new developments*. Chromatographia, 1995. **40**: p. 474-483.
47. Kothari, V., et al., *Revealing the antimicrobial potential of plants*. International Journal of Biosciences and Technology, 2010. **3**(1): p. 1-20.
48. Naviglio, D., et al., *Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques*. Foods, 2019. **8**(7): p. 245.
49. https://food.ec.europa.eu/safety/food-improvement-agents/extraction-solvents_en.
50. Montesano, D. and M. Gallo, *1.09 - Sustainable Approaches for the Extraction and Characterization of Phytochemicals from Food Matrices, in Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach*, P. Ferranti, Editor. 2023, Elsevier: Oxford. p. 103-118.
51. Farooq, S., et al., *Chapter 2 - Extraction techniques, in Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, S.A. Mir, A. Manickavasagan, and M.A. Shah, Editors. 2022, Academic Press. p. 23-37.
52. Mustafa, A. and C. Turner, *Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review*. Analytica chimica acta, 2011. **703**(1): p. 8-18.
53. Mourtzinou, I. and A. Goula, *Polyphenols in agricultural byproducts and food waste, in Polyphenols in plants*. 2019, Elsevier. p. 23-44.
54. Jovanović, A.A., et al., *Optimization of the extraction process of polyphenols from Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques*. Separation and Purification Technology, 2017. **179**: p. 369-380.
55. Mazzutti, S., R.C. Pedrosa, and S.R.S. Ferreira, *Green processes in foodomics. Supercritical fluid extraction of bioactives*. 2021.

56. Pan, Z., et al., *Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel*. Ultrasonics sonochemistry, 2011. **18**(5): p. 1249-1257.
57. Wang, Z., et al., *Extract of phenolics from pomegranate peels*. The open food science journal, 2011. **5**(1).
58. Al-Rawahi, A.S., et al., *Chemical composition, water sorption isotherm, and phenolic contents in fresh and dried pomegranate peels*. Drying technology, 2013. **31**(3): p. 257-263.
59. Sood, A. and M. Gupta, *Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel*. Food Bioscience, 2015. **12**: p. 100-106.
60. Gullon, B., et al., *Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (Punica granatum) flour obtained from co-product of juice extraction*. Food control, 2016. **59**: p. 94-98.
61. Derakhshan, Z., et al., *Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds*. Food and chemical toxicology, 2018. **114**: p. 108-111.
62. Harini, K., et al., *Effect of Punica granatum peel extracts on antimicrobial properties in Walnut shell cellulose reinforced Bio-thermoplastic starch films from cashew nut shells*. Carbohydrate polymers, 2018. **184**: p. 231-242.
63. Kharchoufi, S., et al., *Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts*. Industrial Crops and Products, 2018. **111**: p. 345-352.
64. Dardavila, M.M., et al., *Extraction of Bioactive Compounds from C. vulgaris Biomass Using Deep Eutectic Solvents*. Molecules, 2023. **28**(1).
65. Thakker, M.R., M. Desai, and J. Parikh, *Extraction of Phytochemicals Using Neoteric Solvents*. J. Agroecol. Nat. Resour. Manag, 2014. **1**: p. 153-158.
66. Wils, L., S. Hilali, and L. Boudesocque-Delaye, *Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France?* Molecules, 2021. **26**(21).
67. Bertolo, M.R.V., et al., *Utilization of pomegranate peel waste: Natural deep eutectic solvents as a green strategy to recover valuable phenolic compounds*. Journal of Cleaner Production, 2021. **327**: p. 129471.
68. Skarpalezos, D. and A. Detsi, *Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources*. Applied Sciences, 2019. **9**(19): p. 4169.
69. Kareem, M.A., et al., *Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2010. **55**(11): p. 4632-4637.
70. Garcia, G., et al., *Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications*. Energy & Fuels, 2015. **29**(4): p. 2616-2644.
71. Plastiras, O.-E. and V. Samanidou, *Applications of Deep Eutectic Solvents in Sample Preparation and Extraction of Organic Molecules*. Molecules, 2022. **27**(22): p. 7699.
72. Guzmán-Lorite, M., M.L. Marina, and M.C. García, *Successive extraction using natural deep eutectic solvents and pressurized liquids for a greener and holistic recovery of proteins from pomegranate seeds*. Food Research International, 2022. **161**: p. 111862.
73. Abbott, A.P., et al., *Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations*. Chemistry – A European Journal, 2007. **13**(22): p. 6495-6501.
74. Smith, E.L., A.P. Abbott, and K.S. Ryder, *Deep eutectic solvents (DESs) and their applications*. Chemical reviews, 2014. **114**(21): p. 11060-11082.
75. Habibi, E., et al., *A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples*. Analytica chimica acta, 2013. **762**: p. 61-67.
76. Hayyan, A., et al., *A novel ammonium based eutectic solvent for the treatment of free fatty acid and synthesis of biodiesel fuel*. Industrial Crops and Products, 2013. **46**: p. 392-398.

77. Rajha, H.N., et al., *Innovative process of polyphenol recovery from pomegranate peels by combining green deep eutectic solvents and a new infrared technology*. LWT, 2019. **111**: p. 138-146.
78. Zheng, X., et al., *Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total phenolic compounds from pomegranate peel*. J. Med. Plants Res, 2011. **5**(6): p. 1004-1011.
79. Boggia, R., et al., *Green extraction from pomegranate marcs for the production of functional foods and cosmetics*. Pharmaceuticals, 2016. **9**(4): p. 63.
80. Achilonu, M.C. and D.O. Umesiobi, *Bioactive phytochemicals: bioactivity, sources, preparations, and/or modifications via silver tetrafluoroborate mediation*. Journal of Chemistry, 2015. **2015**.
81. Ghafoor, K., et al., *Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(11): p. 4988-4994.
82. Zou, T.B., et al., *Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis*. Mar Drugs, 2013. **11**(5): p. 1644-55.
83. Tabaraki, R., Z. Yosefi, and G.H.A. ASADI, *Chemical composition and antioxidant properties of Malva sylvestris L*. 2012.
84. Kazemi, M., et al., *Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids*. Food chemistry, 2016. **206**: p. 156-166.
85. Živković, J., et al., *Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology*. Separation and Purification Technology, 2018. **194**: p. 40-47.
86. Sharayei, P., et al., *Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel*. Lwt, 2019. **101**: p. 342-350.
87. Orak, H.H., H. Yagar, and S.S. Isbilir, *Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (Punica granatum L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents*. Food Science and Biotechnology, 2012. **21**: p. 373-387.
88. Prakash Maran, J., et al., *Microwave assisted extraction of pectin from waste Citrullus lanatus fruit rinds*. Carbohydr Polym, 2014. **101**: p. 786-91.
89. Venkataramanamma, D., P. Aruna, and R.P. Singh, *Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel*. Journal of Food Science and Technology, 2016. **53**(5): p. 2497-2503.
90. Maran, J.P., et al., *Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel*. Carbohydrate polymers, 2013. **97**(2): p. 703-709.
91. Hayat, K., et al., *Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro*. Separation and Purification Technology, 2009. **70**(1): p. 63-70.
92. Goula, A.M., *Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil—Kinetic modeling*. Journal of Food Engineering, 2013. **117**(4): p. 492-498.
93. Bu, F., et al., *The effect of choline chloride-butenediol based deep eutectic solvents on ultrasound-assisted extraction, antioxidant activity and stability of anthocyanins extracted from Perilla frutescens (L.) Britt*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2023. **32**: p. 101000.
94. Sa, E.J., B.-S. Lee, and B.H. Park, *Separation of n-hexane-ethanol azeotropic mixture using choline chloride +1,4-butanediol deep eutectic solvents*. Chemical Engineering Research and Design, 2023. **192**: p. 1-11.
95. Spigno, G. and D. De Faveri, *Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study*. Journal of food engineering, 2009. **93**(2): p. 210-217.

96. Xu, L.H., et al., *The construction of a new deep eutectic solvents system based on choline chloride and butanediol: The influence of the hydroxyl position of butanediol on the structure of deep eutectic solvent and supercapacitor performance*. Journal of Power Sources, 2021. **490**: p. 229365.
97. Shirsath, S.R., et al., *Intensification of extraction of curcumin from Curcuma amada using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters*. Ultrasonics Sonochemistry, 2017. **38**: p. 437-445.
98. Georgiopoulou, I., et al., *Process Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Chlorophyll, Carotenoid and Phenolic Compounds from Chlorella vulgaris and Comparison with Conventional and Supercritical Fluid Extraction*. Applied Sciences, 2023. **13**(4): p. 2740.
99. Yoo, D.E., et al., *Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds*. Food Chemistry, 2018. **255**: p. 357-364.
100. Cao, J., et al., *Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyphenyl acetates from Ginkgo biloba leaves*. Journal of Cleaner Production, 2017. **152**: p. 399-405.
101. Tian, H., et al., *Recovery of Natural Products from Deep Eutectic Solvents by Mimicking Denaturation*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(11): p. 9976-9983.