



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων



Διπλωματική
Εργασία

Μελέτη βιοδραστικών εκχυλισμάτων
δίκταμου και εφαρμογή σε ελαιόλαδο
προστιθέμενης διατροφικής αξίας



Δήμητρα Πετρίδου

Επιβλέπων Καθηγητής: Πέτρος Ταούκης

Αθήνα, 2023

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Πέτρου Ταούκη.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον κ. Πέτρο Ταούκη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τη σοφία που μοιράστηκε μαζί μου κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μου. Οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις του κατά τη διάρκειά της άνοιξαν νέους δρόμους στον τρόπο που αντιλαμβάνομαι το επιστημονικό πεδίο μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον Δρ Δημήτρη Τσιμογιάννη, μέλος ΕΔΠ, για την καθοριστική συμβολή του στην ομαλή διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Το γνωστικό του επίπεδο, το εργαστηριακό του υπόβαθρο, καθώς και η απaráμιλλη υπομονή του αποτέλεσαν πρωταρχικούς παράγοντες που συντέλεσαν στο να πετύχω τα αποτελέσματα που επιδίωκα και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις.

Θέλω σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω επίσης τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την καίρια παρέμβασή τους στους όποιους προβληματισμούς μου δημιουργήθηκαν με τον καιρό, καθώς και για την υποστήριξη που μου παρείχαν. Επιπλέον, οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη στους συμφοιτητές και συναδέλφους μου που συνεργαστήκαμε τον τελευταίο χρόνο στο εργαστήριο. Η υποστήριξη που δέχθηκα ήταν αμέριστη, ενώ οι στιγμές που περάσαμε κατά τη διάρκεια της κοινής μας πορείας, είτε ευχάριστες είτε δυσάρεστες, θα παραμείνουν ανεξίτηλες στη μνήμη μου. Είμαι ευγνώμων που είχα την ευκαιρία να μοιραστούμε αυτήν την αξιομνημόνευτη περίοδο της ζωής μας.

Θα ήθελα να εκφράσω, τέλος, τις εγκάρδιες μου ευχαριστίες προς την οικογένειά μου και τους αγαπημένους φίλους μου για την ανεκτίμητη ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας. Οι συνομιλίες, οι συμβουλές, και η παρουσία τους με βοήθησαν να αντιμετωπίσω το άγχος και τις προκλήσεις αυτής της περιόδου. Χωρίς αυτούς, αυτή η επιτυχία δεν θα ήταν δυνατή.

Περίληψη

Το δίκταμο (*Origanum dictamnus*) είναι ένα ελληνικό ενδημικό αρωματικό φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae). Φυτρώνει αποκλειστικά στα βουνά της Κρήτης, ενώ χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια ως αφέψημα, για την ίαση πλήθους ασθενειών. Οι ευεργετικές του ιδιότητες αποδίδονται στα βιοδραστικά του συστατικά, κυρίως στους δευτερογενείς μεταβολίτες του, δηλαδή τα τερπενοειδή και τις φαινολικές ουσίες. Στις εν λόγω ενώσεις εστιάζεται το επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω των εξαιρετικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Παραλαμβάνονται είτε μέσω εκχυλισμάτων του φυτού είτε μέσω του αιθέριου ελαίου του. Τα κύρια τερπενοειδή του δίκταμου είναι η θυμοκινόνη και τα παράγωγά της, η καρβακρόλη και το ισομερές της (θυμόλη) και το p-κυμένιο. Όσον αφορά τις φαινολικές ουσίες, στο δίκταμο εντοπίζονται κατά κύριο λόγο το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του (ροσμαρινικό, λιθοσπερμικό οξύ κ.λπ.), και φλαβονοειδή. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των παραπάνω σχετίζονται κυρίως με την ύπαρξη ενός ή παραπάνω υδροξυλίων (-OH) στο μόριό τους. Εξάιρεση αποτελεί η θυμοκινόνη, καθώς, παρά την απουσία ομάδας που δρα ως δότης υδρογόνου, έχει αποδειχθεί ότι επιδεικνύει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, πιθανόν λόγω της μετατροπής της σε υδρογονωμένα παράγωγα ή λόγω της συνέργειας που εμφανίζει με άλλες ουσίες.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η χαρτογράφηση του δίκταμου ως προς τα εκχυλίσμα συστατικά του έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αυτό αποτέλεσε τον πρώτο κύκλο πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του φυτού σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου, χρησιμοποιώντας 2 διαδοχικούς διαλύτες, έναν χαμηλής (ακετόνη) και έναν υψηλής (νερό) πολικότητας και εξετάστηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δίκταμου, μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu. Αποδείχθηκε ότι, στο υδατικό εκχύλισμα, περιέχεται υψηλή ποσότητα φαινολικών συστατικών (370 mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος). Έπειτα, μετρήθηκε η αντιριζική ικανότητα του φυτού, μέσω της αντίδρασης με την ελεύθερη ρίζα DPPH. Από εκεί προέκυψε ότι το εκχύλισμα νερού διαθέτει υψηλότερη αντιριζική ικανότητα (578 mg Trolox/g εκχυλίσματος), συγκριτικά με το εκχύλισμα ακετόνης (192 mg Trolox/g εκχυλίσματος). Μέσω ανάλυσης HPLC, εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τα κύρια συστατικά που περιείχαν τα εκχυλίσματα. Στο

εκχύλισμα ακετόνης εντοπίστηκαν κυρίως η θυμοκινόνη και η καρβακρόλη, με συγκέντρωση 22 και 257 mg/g εκχυλίσματος αντίστοιχα. Στο υδατικό εκχύλισμα, εντοπίστηκε σημαντική ποσότητα φλαβονοειδών (86 mg quercetin/g εκχυλίσματος), ροσμαρινικού οξέος (27 mg/g εκχυλίσματος) και παραγώγων καφεϊκού οξέος (46 mg/g εκχυλίσματος).

Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της παραλαβής των φαινολικών συστατικών στα 2 εκχυλίσματα, ενώ έγινε και μελέτη της εκχύλισης της θυμοκινόνης και καρβακρόλης στο ακετονικό εκχύλισμα. Όσον αφορά την παραλαβή των φαινολικών ουσιών στο εκχύλισμα ακετόνης, σε χρόνο 15 λεπτών έχει εκχυλιστεί η πλειοψηφία τους από τον διαλύτη (80%). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην παραλαβή της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, καθώς σε 15 λεπτά, παραλαμβάνεται όλη η διαθέσιμη ποσότητά τους. Από τα παραπάνω, προέκυψε ότι η ακετόνη είναι ένας κατάλληλος διαλύτης για την παραλαβή φαινολικών συστατικών από το δίκταμο, καθώς διεισδύει γρήγορα και εύκολα στη μικροδομή του. Έγινε μαθηματική επεξεργασία των ανωτέρω αποτελεσμάτων μέσω εφαρμογής του 2^{ου} νόμου του Fick για τη διάχυση, μέσω της οποίας προέκυψε ότι μεγάλο μέρος των συστατικών του δίκταμου, εκχυλίζεται από τον εξωτερικό φλοιό της μικροδομής του. Μέσω της χρονικής μελέτης της εκχύλισης των φαινολικών ουσιών με διαλύτη το νερό, προέκυψε ότι δεν υπάρχει σταθερή συμπεριφορά παραλαβής των ουσιών, λόγω της φύσης του διαλύτη. Επομένως, χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση σχετικά με την ανάγκη για προεπεξεργασία του φυτού πριν την υδατική του εκχύλιση.

Επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η παραλαβή του αιθέριου ελαίου του δίκταμου μέσω υδρο-ατμοαπόσταξης. Από το δίκταμο εξάχθηκε αιθέριο έλαιο απόδοσης 2.5%, στο οποίο έγινε ανάλυση GC-MS για τον εντοπισμό των ουσιών που περιέχει. Από την ανάλυση προέκυψε ότι το 56.4% του ελαίου είναι η καρβακρόλη, ενώ άλλα συστατικά που βρέθηκαν ήταν το p-κυμένιο (15.9%), το γ-τερπινένιο (14.5%) και άλλες ουσίες σε ίχνη, όπως για παράδειγμα το τρανς-καρνοφυλλένιο, το α-πινένιο κ.ά., ενώ η θυμοκινόνη εντοπίστηκε σε ποσοστό μόλις 0.7%. Έπειτα, έγινε δοκιμή Folin – Ciocalteu για την εύρεση φαινολικών συστατικών στο αιθέριο έλαιο, η οποία έδειξε ότι περιέχει 328 mg GAE/g αιθέριου ελαίου. Έχοντας υπ' όψιν ότι, κατά τη διεργασία της απόσταξης, ορισμένοι υδρατμοί επανασυμπυκνώθηκαν και διαπέρασαν το φυτό, έγινε χαρτογράφηση του υδατικού υπολείμματος της διεργασίας το οποίο περιείχε φαινολικά συστατικά συγκέντρωσης

5.0 mg GAE/g φυτού, 4.6 mg αντιοξειδωτικών ουσιών/g φυτού , και μικρές ποσότητες ροσμαρινικού οξέος, καφεϊκού οξέος και φλαβονοειδών.

Το απεσταγμένο δίκταμο ξηράνθηκε, κονιοποιήθηκε και υποβλήθηκε στις ίδιες εκχυλίσεις και αναλύσεις με προηγουμένως, για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας του φυτού στα βιοδραστικά συστατικά του. Διαπιστώθηκε μείωση του φαινολικού περιεχομένου στα 2 εκχυλίσματα, της τάξης του 69% στο εκχύλισμα ακετόνης και 49% στο εκχύλισμα νερού. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι μεγάλο μέρος των φαινολών καταστράφηκε λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Μικρή μείωση εμφάνισε και η αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων του απεσταγμένου φυτού. Από την ανάλυση HPLC του ακετονικού εκχυλίσματος, προέκυψε ότι το 92% της θυμοκινόνης έχει καταστραφεί λόγω της επιβολής θερμότητας, ενώ η εκχυλίσιμη ποσότητα της καρβακρόλης έχει μειωθεί κατά 95%, λόγω της απομάκρυνσής της στο αιθέριο έλαιο. Επιπλέον, το σύνολο των καροτενοειδών υπέστη 69% μείωση, λόγω της απόσταξης. Από την ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού, όσον αφορά τη συγκέντρωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος, καθώς και των φλαβονοειδών, προέκυψε ότι μειώθηκαν κατά 21% και 30% αντίστοιχα. Αντίθετα, η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος προσδιορίστηκε κατά 50% υψηλότερη σε σχέση με το μη απεσταγμένο φυτό. Πιθανότατα, με τη διαβροχή και διόγκωση της μικροδομής φυτού κατά την απόσταξη, κατέστη πιο εύκολη η εκχύλιση του ροσμαρινικού οξέος από το εσωτερικό των κόκκων του κονιοποιημένου υλικού.

Στον επόμενο κύκλο πειραμάτων, διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος ακετόνης σε ένα τρόφιμο. Το τρόφιμο στο οποίο ενσωματώθηκε το εκχύλισμα είναι το ελαιόλαδο. Σε αυτό ενσωματώθηκαν τα ακετονικά εκχυλίσματα δίκταμου ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση θυμοκινόνης 5 ppm και αυτά τα ελαιοδιαλύματα στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με διάλυμα καθαρής θυμοκινόνης ώστε να παρασκευαστούν και οι συγκεντρώσεις 50 και 100 ppm. Επίσης παρασκευάστηκε και ελαιοδιάλυμα με καθαρή θυμοκινόνη (50 ppm). Εγινε μια προσπάθεια διερεύνησης της αντιοξειδωτικής δράσης της ουσίας και της γενικότερης συμπεριφοράς της σε ένα λιπιδικό σύστημα με πλήθος αντιοξειδωτικών συστατικών: αφενός τα φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, ελευρωπαΐνη κ.λπ.), αφετέρου τα συστατικά των εκχυλισμάτων χαμηλής πολικότητας του δίκταμου. Τα ελαιοδιαλύματα υπέστησαν θερμική οξείδωση σε φούρνο

θερμοκρασίας 70 °C και φωτοχημική οξείδωση σε θάλαμο ακτινοβολήσης με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και σε θερμοκρασία περιβαλλόντος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων οξείδωσης εκφράστηκαν μέσω της μέτρησης του αριθμού υπεροξειδίων και, σε επιλεγμένα δείγματα, μέσω επιπλέον και της μέτρησης της p-ανισιδίνης, για την εύρεση των πρωτογενών και των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης .

Σε όλα τα δείγματα των θερμικών οξειδώσεων παρατηρήθηκε αύξηση των εν λόγω παραμέτρων με το χρόνο, ακολουθώντας δύο διακριτά στάδια: το πρώτο-αργό στάδιο (επώαση), όπου οι δείκτες οξείδωσης αυξάνονταν με πολύ αργό ρυθμό και στο δεύτερο-γρήγορο στάδιο κατά το οποίο παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση των δεικτών οξείδωσης. Ως παράμετρος της αντιοξειδωτικής δράσης κάθε φορά ορίστηκε η αύξηση της περιόδου επώασης, καθώς αντικατοπτρίζει την παράταση του χρόνου ζωής του ελαιοδιαλύματος. Παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα με εκχυλίσματα του μη απεσταγμένου φυτού υπήρξε ραγδαία αύξηση του χρόνου επώασης, έως και 55% (στην περίπτωση των 100 ppm), ενώ εμφανίστηκε και αναλογική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης στο σύστημα και της παράτασης της περιόδου επώασης. Αντίθετα, στα δείγματα του απεσταγμένου φυτού, ήδη από τη συγκέντρωση των 5 ppm θυμοκινόνης η επέκταση της περιόδου επώασης ήταν στο +58% και αυξήθηκε ελαφρά μέχρι το +66% στα 100 ppm, ενώ δεν παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της περιεχόμενης θυμοκινόνης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε επίπεδο πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης. Σε επίπεδο δευτερογενών η επέκταση της περιόδου επώασης κυμάνθηκε από +51% έως +73%.

Η φωτοχημική οξείδωση χαρακτηρίστηκε από μία ενιαία κινητική, χωρίς την ύπαρξη περιόδου επώασης. Τα εκχυλίσματα περιόρισαν το ρυθμό φωτοχημικής υποβάθμισης του ελαίου αλλά σε χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με τη θερμική οξείδωση, ενώ η συμπεριφορά των δειγμάτων ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία ήταν ίδια. Κρίνοντας με βάση την ειδική ταχύτητα αύξησης του αριθμού των υπεροξειδίων στα δείγματα του μη απεσταγμένου δίκταμου, βρέθηκε ότι στην περίπτωση των 5 ppm θυμοκινόνης, υπάρχει μείωση του ρυθμού κατά 21%, ενώ στην περίπτωση των 50 ppm και 100 ppm θυμοκινόνης, η μείωση ήταν -42% και -46% αντίστοιχα. Τα δείγματα του απεσταγμένου δίκταμου ακολούθησαν παρόμοια πορεία, καθώς ο ρυθμός αύξησης των υπεροξειδίων κυμάνθηκε από -45% (50 ppm) έως και -48% (100 ppm), ενώ στα 5 ppm θυμοκινόνης, η μείωση ήταν ίση με 46%.

Η καθαρή θυμοκινόνη σε κάθε περίπτωση οξειδωσης δεν επέδειξε καμία αντιοξειδωτική δράση. Άρα η ουσία αυτή καθαυτή δεν αποτελεί αντιοξειδωτικό. Μάλιστα, αποκλείεται και το ενδεχόμενο συνέργειάς της με τα φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου. Τα δύο ακετονικά εκχυλίσματα δίκταμου περιέχουν είτε πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά-φαινολικά συστατικά είτε σχετικά υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικές ουσίες οι οποίες είναι αποδεδειγμένα αδρανείς ως αντιοξειδωτικά (π.χ. καρβακρόλη και θυμόλη). Παρολαυτά, τα δύο εκχυλίσματα επέδειξαν από αξιολογή έως ισχυρή αντιοξειδωτική δράση οπότε η αναγέννηση της φαινολικής μορφής της θυμοκινόνης προβάλλει ως η μόνη εξήγηση.

Τα εκχυλίσματα του απεσταγμένου δίκταμου επέδειξαν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Ενώ με τη χρήση εκχυλισμάτων του μη απεσταγμένου φυτού, η περίοδος επώασης παρουσίασε αύξηση μεταξύ 26 και 55%, στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του απεσταγμένου φυτού, η εν λόγω αύξηση κυμάνθηκε από 58-66%. Πιθανή αιτιολόγηση είναι η θυμοκινόνη να εμφανίζει συνέργεια με κάποιο συστατικό που περιέχεται και στο απεσταγμένο φυτό (π.χ. καροτενοειδή), ενώ παρουσία του αιθέριου ελαίου στο μη απεσταγμένο, να υπάρχει έντονη αντεργιστική δράση με συστατικά υψηλής περιεκτικότητας όπως η καρβακρόλη, ή το p-κυμένιο και κατ' αυτόν τον τρόπο η αντιοξειδωτική δράση να εμφανίζεται χαμηλότερη.

Συνοψίζοντας τα συμπεράσματα της συνολικής μελέτης, το δίκταμο περιέχει πλήθος αξιοποιήσιμων βιοδραστικών ουσιών, οι οποίες εμφανίζουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα, και παραλαμβάνονται από αυτό μέσω εκχυλίσεων με αυξανόμενης πολικότητας διαλύτες. Έπειτα από απόσταξη του φυτού με υδρατμούς για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου του, φάνηκε ότι κάποια από αυτά τα συστατικά μετακινήθηκαν στο έλαιο (π.χ. καρβακρόλη), κάποια εκχυλίστηκαν ευκολότερα από το φυτό (π.χ. ροσμαρινικό οξύ), ενώ άλλα καταστράφηκαν μερικώς (π.χ. θυμοκινόνη). Το μη πολικό εκχύλισμα του δίκταμου αποδείχθηκε ότι εμποδίζει την υποβάθμιση του ελαιολάδου από αντιδράσεις οξειδωσης, λόγω της περιεχόμενης σε αυτό θυμοκινόνης. Μάλιστα, η αυξανόμενη συγκέντρωσή της στα συστήματα ελαιολάδου – εκχυλίσματος οδήγησε σε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, η οποία φάνηκε τόσο στα πρωτογενή, όσο και στα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης του συστήματος.

Abstract

“Analysis of bioactive extracts of dittany and application to olive oil of added nutritional value supplements”

Dittany (*Origanum dictamnus*) is a Greek endemic aromatic plant, which belongs to the Lamiaceae family. Dittany grows exclusively in the mountains of Crete, and has been used since ancient times as a decoction to cure many diseases. Its beneficial properties are attributed to its bioactive constituents, mainly its secondary metabolites, namely terpenoids and phenolic substances. These compounds are of great scientific interest because of their excellent antioxidant properties and are obtained either through extracts of the plant or through its essential oil. The main terpenoids of dittany are thymoquinone and its derivatives, carvacrol and its isomer (thymol) and p-cymene. Continuing with the non-volatile phenolic substances, in dittany the derivatives of caffeic acid (rosmarinic acid, lithospermic acid, etc.), and many flavonoids are mainly found in dittany. The antioxidant properties of the above are mainly related to the presence of one or more hydroxyls (-OH) in their molecule. An exception is thymoquinone, as, despite the absence of a hydrogen donor, it has been shown to exhibit significant antioxidant activity, probably due to its conversion to its reduced diphenolic form (dihydrothymoquinone) by reacting with other substances.

All of the above leads to the conclusion that the mapping of dittany in terms of its extractable components is of particular interest. This constituted the first round of experiments in this thesis. Extraction of the plant was carried out in a semi-infinite project extractor, using 2 successive solvents, one of low (acetone) and one of high (water) polarity, and the total phenolic content of dittany was examined by the Folin - Ciocalteu method. The aqueous extract was found to contain a high amount of phenolic components (370 mg GAE/g dry extract). Then, the antiradical capacity of the plant was measured by the reaction with the free radical DPPH. This showed that the water extract has a higher anti-radical capacity (578 mg Trolox/g extract), compared to the acetone extract (192 mg Trolox/g extract). Through HPLC analysis, the main components contained in the extracts were identified and quantified. Thymoquinone and carvacrol were mainly identified in the acetone extract, with a concentration of 22 and 257 mg/g extract respectively. In the aqueous extract, a significant amount of flavonoids (86 mg quercetin/g extract), rosmarinic acid (27

mg/g extract) and caffeic acid derivatives (46 mg/g extract) were detected. A kinetic study of the uptake of phenolic constituents in the 2 extracts was carried out, and the extraction of thymoquinone and carvacrol in the acetone extract was also studied. Regarding the uptake of phenolic compounds in the acetone extract, within 15 minutes, the majority of them have been extracted from the solvent (80%). The same was observed in the uptake of thymoquinone and carvacrol, as in 15 minutes, all the available amount of them were extracted. From the above, it was concluded that acetone is a suitable solvent for the uptake of phenolic components from dittany, as it penetrates quickly and easily into the microstructure of the dittany. A mathematical interpretation of the above results was carried out by applying Fick's 2nd law of diffusion, through which it was found that a large part of the components of dittany is extracted from the outer cortex of its microstructure. Through the kinetic study of the extraction of phenolic substances with water as solvent, it was found that there is no stable extraction behaviour of the substances due to the nature of the solvent. Therefore, more investigation is needed on the need for pretreatment of the plant before its aqueous extraction.

The next stage of the experimental procedure was the extraction of the essential oil of dittany through hydro-steam distillation. A 2.5% yield of essential oil was extracted from the dittany, in which GC-MS analysis was performed to identify the substances it contains. The analysis revealed that 56.4% of the oil is carvacrol, while other constituents found were p-cymene (15.9%), gamma-terpinene (14.5%) and other trace substances, for example, trans-caryophyllene, alpha-pinene, etc., while thymoquinone was detected at only 0.7%. A Folin - Ciocalteu test was performed to find phenolic constituents in the essential oil, which showed that it contains 328 mg GAE/g of essential oil. Considering that, during the distillation process, some water vapor recondensed and permeated the plant, the aqueous residue of the process was mapped containing phenolic components at a concentration of 5.0 mg GAE/g plant, 4.6 mg antioxidants/g plant, and small amounts of rosmarinic acid, caffeic acid and flavonoids.

The distilled dittany was dried, pulverized and subjected to the same extractions and analyses as before, to investigate the possible effect of heat treatment of the plant on its bioactive components, as it is a by-product, which is potentially usable. A decrease in phenolic content was found in the 2 extracts, of 69% in the acetone extract and

49% in the water extract. It was concluded that much of the phenols were destroyed due to high temperature. A small decrease was observed in the anti radical capacity of the extracts of the distilled plant. After HPLC analysis of the acetone extract, it was found that 92% of the thymoquinone was destroyed due to the application of heat, while the extractable amount of carvacrol was reduced by 95% due to its removal in the essential oil. Also, the total carotenoids have suffered a 69% reduction due to distillation. A similar behaviour was observed from the analysis of the aqueous extract of the plant in terms of the concentration of caffeic acid derivatives and flavonoids, which decreased by 21% and 30% respectively. In contrast, the concentration of rosmarinic acid was determined to be 50% higher than in the undistilled plant. Presumably, by wetting and swelling the plant microstructure during distillation, it became easier to extract rosmarinic acid from inside the granules of the powdered material.

In the next round of experiments, the antioxidant effect of acetone extract on a food was investigated. The food in which the extract was incorporated is olive oil, as it is a lipid system that naturally contains a number of natural antioxidants such as hydroxytyrosol, tyrosol or oleuropein. Acetone extracts of dittany were incorporated into olive oil to obtain a thymoquinone concentration of 5 ppm and these oil solutions were then inoculated with a solution of pure thymoquinone to prepare both 50 and 100 ppm thymoquinone concentrations. An attempt was also made to investigate the antioxidant activity of the substance and its general behaviour in a lipid system with a number of antioxidant components: on the one hand the natural antioxidants of olive oil and on the other hand the components of low-polarity extracts of dittany. The olive oil solutions were subjected to thermal oxidation in a 70 °C oven and photochemical oxidation in a UV lamp irradiation chamber at ambient temperature. The results of the oxidation experiments were expressed by measuring the peroxide value and, in selected samples, additionally by measuring p-anisidine value to find the primary and secondary oxidation products.

In all samples of thermal oxidation, an increase in these parameters was observed with time, following two distinct stages: the first-slow stage (incubation), where the oxidation indexes increased very slowly, and the second-fast stage during which a rapid increase in oxidation indexes was observed. The parameter of antioxidant activity in each case was defined as the increase in the incubation period, as it reflects

the prolongation of the shelf life of the oil solution. It was observed that in the samples with extracts of the undistilled plant there was a rapid increase in the incubation time, up to 55% (in the case of 100 ppm), and a proportional relationship between the concentration of thymoquinone in the system and the extension of the incubation period was also observed. In contrast, in the samples of the distilled plant, already from the concentration of 5 ppm thymoquinone the extension of the incubation period was at +58% and increased slightly up to +66% at 100 ppm, while no dose-dependent relationship was observed between the thymoquinone content and the antioxidant capacity at the level of primary oxidation products. At the level of secondary products, the extension of the incubation period ranged from +51% to +73%.

The photochemical oxidation was characterized by a single kinetics, without the existence of an incubation period. The extracts limited the rate of photochemical degradation of the oil but to a lower extent than thermal oxidation, while the behaviour of the samples against UV radiation was the same. Judging by the specific rate of increase in the number of peroxides in the samples of undistilled dittany, it was found that in the case of 5 ppm thymoquinone, there was a 21% decrease in the rate, while in the case of 50 ppm and 100 ppm thymoquinone, the decrease was -42% and -46% respectively. The samples of distilled dittany followed a similar pattern, as the rate of increase in peroxide ranged from -45% (50 ppm) to -48% (100 ppm), while in the case of 5 ppm thymoquinone, the decrease was equal to 46%.

Pure thymoquinone in each oxidation experiment did not exhibit antioxidant activity. So, the substance itself is not an antioxidant. In fact, the possibility of its synergy with the natural antioxidants of olive oil is excluded. The two acetone extracts of dittany contain either a very low content of antioxidant-phenolic components or a relatively high concentration of phenolic substances which are demonstrably inactive as antioxidants (e.g. carvacrol and thymol). Nevertheless, both extracts demonstrated from remarkable to strong antioxidant activity so the regeneration of the phenolic form of thymoquinone is put forward as the only explanation.

Ultimately, the extracts of distilled dittany showed the strongest antioxidant activity. In fact, while using extracts of the undistilled plant, the incubation period showed an increase between 26 and 55%, in the case of extracts of the distilled plant, this

increase ranged from 58-66%. Therefore, there is a possibility that thymoquinone may show synergy with a component also present in the distilled plant (e.g. carotenoids), while in the presence of the essential oil in the non-distilled plant, there may be a strong antioxidant activity with high content components such as carvacrol, or p-cymene, and thus the antioxidant activity may appear lower.

Summarizing the conclusions of the overall study, dittany contains a variety of useful bioactive substances, which exhibit antioxidant activity, and are obtained from it through extraction with solvents of increasing polarity. After steam distillation of the plant to obtain its essential oil, it was found that some of these compounds were translocated to the oil (e.g. carvacrol), some were more easily extracted from the plant (e.g. rosmarinic acid), while others were partially destroyed (e.g. thymoquinone). The non-polar extract of dittany was shown to prevent the degradation of olive oil by oxidation reactions due to thymoquinone contained in it. In fact, its increasing concentration in the olive oil-extract systems led to a stronger antioxidant activity, which was seen in both primary and secondary oxidation products of the system.

Περιεχόμενα

1.	Το δίκταμο	16
1.1	Γενικές πληροφορίες για το δίκταμο.....	16
1.2	Βιοδραστικά συστατικά ως κυτταρικοί μεταβολίτες	18
1.2.1	Κυτταρικοί μεταβολίτες.....	18
1.2.2	Λιπίδια και λιπαρά οξέα	19
1.2.3	Δευτερογενείς μεταβολίτες – βιοδραστικά συστατικά	19
1.3	Σύσταση του δίκταμου	26
1.3.1	Θυμοκινόνη.....	26
1.3.2	Αιθέριο έλαιο	30
1.3.3	Καφεϊκό οξύ.....	32
1.3.4	Ροσμαρινικό οξύ	33
2.	Εκχύλιση	34
2.1	Εκχύλιση στερεού – υγρού.....	35
2.2	Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού – υγρού	36
2.2.1	Εκχύλιση Soxhlet.....	36
2.2.2	Απόσταξη	38
2.2.3	Εκχύλιση μέσω διαβροχής.....	40
2.2.4	Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες	41
2.3	Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης.....	43
2.3.1	Εκχύλιση με υπερήχους (UAE)	43
2.3.2	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE)	44
2.3.3	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)	45
2.3.4	Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF).....	46
2.3.5	Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)	47
2.3.6	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα	48
3.	Το ελαιόλαδο	48
3.1	Κατηγοριοποίηση ελαιολάδου	48
3.2	Συστατικά του ελαιολάδου.....	49
3.2.1	Λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια	49
3.2.2	Φαινολικές ουσίες στο ελαιόλαδο	51
3.3	Μηχανισμοί υποβάθμισης του ελαιολάδου.....	52
3.3.1	Αυτοοξειδωση.....	53

3.3.2	Φωτοχημική οξείδωση	54
3.3.3	Μέτρηση έκτασης οξείδωσης	55
4.	Πειραματικό μέρος	56
4.1	Σχεδιασμός πειραμάτων – Στόχος	56
4.2	Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια – Συσκευές	61
4.2.1	Πρώτες ύλες	61
4.2.2	Αντιδραστήρια	61
4.2.3	Συσκευές	62
4.3	Πειραματική διαδικασία	66
4.3.1	Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες	66
4.3.2	Απόσταξη με υδρατμούς	68
4.3.3	Ενσωμάτωση εκχυλισμάτων σε ελαιόλαδο	69
4.3.4	Θερμική & Φωτοχημική οξείδωση	71
4.4	Αναλυτικές μέθοδοι	71
4.4.1	Μέτρηση υγρασίας δείγματος	71
4.4.2	Μέτρηση στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος	71
4.4.3	Εύρεση ολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω Folin – Ciocalteu	72
4.4.4	Εύρεση αντιριζικής ικανότητας μέσω DPPH	75
4.4.5	Ανάλυση HPLC στα εκχυλίσματα	77
4.4.6	Ανάλυση GC-MS στο αιθέριο έλαιο	78
4.4.7	Μέτρηση αριθμού υπεροξειδίων στα ελαιοδιαλύματα	79
4.4.8	Μέτρηση αριθμού p-ανισιδίνης στα ελαιοδιαλύματα	81
5.	Αποτελέσματα – Σχολιασμός	82
5.1	Αποτελέσματα εκχυλίσεων δίκταμου πριν την απόσταξη του φυτού	82
5.1.1	Απόδοση σε ολικά στερεά (TS)	82
5.1.2	Ολικά φαινολικά συστατικά (TPC) και αντιριζική ικανότητα εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη παραλαβής TPC	83
5.1.3	Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ακετόνης	92
5.2	Αποτελέσματα υδρο-ατμοαπόσταξης	104
5.2.1	Αιθέριο έλαιο	105
5.2.2	Υπόλειμμα απόσταξης με υδρατμούς	107
5.3	Αποτελέσματα εκχυλίσεων δίκταμου μετά την απόσταξη – Συγκριτική μελέτη	108

5.3.1	Απόδοση σε ολικά στερεά (TS).....	109
5.3.2	Ολικά φαινολικά συστατικά (TPC) και αντιριζική ικανότητα εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη παραλαβής TPC.....	110
5.3.3	Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ακετόνης.....	118
5.4	Αποτελέσματα αυτό-οξείδωσης ελαιοδιαλύματος με εκχύλισμα μη απεσταγμένου δίκταμου.....	127
5.4.1	Αποτελέσματα της θερμικής οξείδωσης ελαιόλαδου εμπλουτισμένου με εκχύλισμα του μη απεσταγμένου φυτού.....	127
5.4.2	Αποτελέσματα της φωτοχημικής οξείδωσης των δειγμάτων του μη απεσταγμένου φυτού.....	131
5.5	Αποτελέσματα αυτό-οξείδωσης ελαιοδιαλύματος με εκχύλισμα απεσταγμένου δίκταμου – Συγκριτική μελέτη.....	134
5.5.1	Αποτελέσματα της θερμικής οξείδωσης των δειγμάτων του απεσταγμένου φυτού.....	135
5.5.2	Αποτελέσματα της φωτοχημικής οξείδωσης των δειγμάτων του απεσταγμένου φυτού.....	138
5.5.3	Συγκριτικά αποτελέσματα για τα δείγματα απεσταγμένου και μη απεσταγμένου φυτού.....	140
6.	Συμπεράσματα – προτάσεις για μελλοντική έρευνα	143
	Βιβλιογραφία	148
	Παράρτημα.....	157

1. Το δίκταμο

1.1 Γενικές πληροφορίες για το δίκταμο.

Το δίκταμο, ή δίκταμος, είναι ένα ενδημικό φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae). Στα χειλανθή ανήκουν παραπάνω από 7000 είδη αρωματικών φυτών, τα οποία αποτελούν βασικό συστατικό πολλών τροφίμων, φαρμάκων, καθώς και προϊόντων περιποίησης. Οι 2 βασικές υποκατηγορίες των χειλανθών είναι τα *Nepetoideae*, δηλαδή αυτά που περιέχουν ροσμαρινικό οξύ, και τα *Lamioideae*, δηλαδή όσα περιέχουν ιριδοειδή. Άλλα αρωματικά φυτά που εντάσσονται στην οικογένεια των Lamiaceae είναι ο δυόσμος, το θυμάρι, το δενδρολίβανο και η ρίγανη (Bekut et. Al., 2018).

Η ονομασία του οφείλεται στο όρος Δίκτη, το οποίο βρίσκεται στο Λασίθι της Κρήτης, και στο Δίκταμνο, δηλαδή στο θάμνο της Δίκτης. Ο επιστημονικός όρος για το δίκταμο είναι *Origanum dictamnus* L., ενώ άλλες ονομασίες για αυτό είναι οι: *Amaracus dictamnus*, *Origanum creticum*, *Latifolium tomentosum*, *Origanum pseudodictamnus* ή *dictamnus creticus* (Γούλα κ.ά., 2004).

Πρόκειται για ένα αρωματικό, αειθαλές, θαμνώδες φυτό, το οποίο έχει μέγεθος περίπου ίσο με 30 εκατοστά. Έχει ωοειδή φύλλα, μήκους περίπου 8 – 10 mm, πάνω στα οποία εντοπίζονται αδενικές και μη τρίχες, οι οποίες συντελούν στην παραγωγή του αιθερίου ελαίου του φυτού (Εικόνα 1.1). Τα άνθη του έχουν χαρακτηριστικό ροδαλό χρώμα (Εικόνα 1.2).

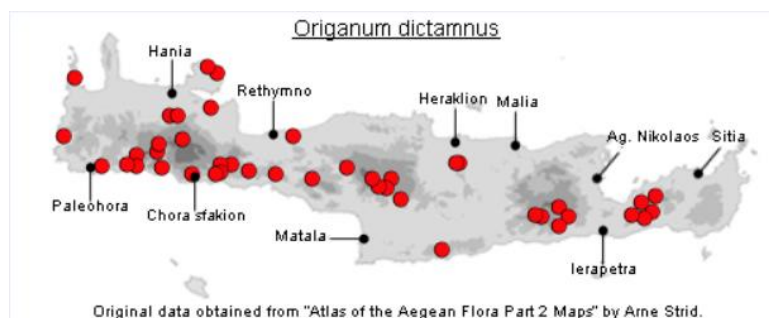


Εικόνα 1.1 – Φύλλα δίκταμου.



Εικόνα 1.2 – Άνθη του δίκταμου.

Το δίκταμο είναι αυτοφυές, και εντοπίζεται σε σχισμές από βράχια, σε φαράγγια ή ακόμα και σε γκρεμούς, σε υψόμετρα από 0 έως 1500 μέτρα (Πάγκαλος, 2009). Το φυτό εντοπίζεται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές της Κρήτης (Εικόνα 1.3). Συγκεκριμένα, φυτρώνει κατά κύριο λόγο στα: Λευκά Όρη, τον Κίσσαμο, στη χερσόνησο Σπάθα, το Σираκάρι, Κουνένι, Σφηνάρι, Μαλεβίτσι, Μεσσαρά, Ψηλορείτη, Κουρταλιώτικο, Κοτσιφού, Αγία Γαλήνη, Σπήλι, Χουδέτσι, Κάτω Ασίτες, Έμπαρος (Τέζιας, 2004). Μάλιστα, ενώ έχουν γίνει προσπάθειες καλλιέργειάς του και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας, όπως για παράδειγμα τα Ιωάννινα ή η Αθήνα, οι προσπάθειες δεν απέφεραν καρπούς, καθώς το φυτό που προέκυψε έχασε τη χαρακτηριστική οσμή και όψη του. Για αυτό το λόγο, το δίκταμο έχει χαρακτηριστεί ως απειλούμενο είδος (Τσουβαλάκη, 2009). Σύμφωνα με δεδομένα που αντιστοιχούν στο έτος 2007 στην Ελλάδα, το δίκταμο αντιστοιχεί στο 0.35% των συνολικά παραγόμενων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών που προορίζονται για εμπορική χρήση, δηλαδή 9565.2 τόνους. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σπανιότητα του φυτού (Πάγκαλος, 2011).



Εικόνα 1.3 - Περιοχές της Κρήτης στις οποίες εντοπίζεται το δίκταμο.

Στα αρχαία χρόνια, το δίκταμο χρησιμοποιούνταν συχνά για θεραπευτικούς λόγους, καθώς, όπως αναφέρεται σε αρχαία κείμενα, χρησιμοποιούνταν ως φάρμακο για πάνω από 30 ασθένειες. Αρχικά, το φυτό βρήκε ευρεία εφαρμογή από τον Ιπποκράτη, καθώς το χρησιμοποιούσε για τη θεραπεία του στομαχόπονου, του κρυώματος και άλλων προβλημάτων υγείας, ή ακόμα και για πιο σοβαρές ασθένειες, όπως η φυματίωση. Προχωρώντας στα μεταγενέστερα χρόνια του Πλούταρχου και του Διοσκουρίδη, υπήρχε ο ισχυρισμός ότι η εντριβή του στο σώμα απωθούσε τα ερπετά και τα έντομα (Τέζιας, 2004). Τέλος, ο Γαληνός, ο οποίος θεωρείται ο πατέρας της φαρμακευτικής επιστήμης, εκθείαζε τις θεραπευτικές ιδιότητες του δίκταμου, και ιδιαίτερα τη δράση του έναντι στις ρευματικές παθήσεις, αλλά και στην πρόληψη των αποβολών (Liolios et. al., 2010).

1.2 Βιοδραστικά συστατικά ως κυτταρικοί μεταβολίτες

1.2.1 Κυτταρικοί μεταβολίτες

Οι ουσίες που περιέχει το δίκταμο, καθώς και όλα τα φυτά, διαχωρίζονται στις εξής 2 κατηγορίες: στους πρωτογενείς και στους δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή σε οργανικές ουσίες που παράγονται από τα φυτικά κύτταρα μέσω βιοσυνθετικών οδών.

Οι πρωτογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Προχωρώντας στους δευτερογενείς μεταβολίτες, γίνεται λόγος για σύνθετες οργανικές ενώσεις, οι οποίες δε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βλάστηση του φυτού. Παρόλα αυτά, βοηθάνε το φυτό να αμυνθεί ενάντια στις δυσκολίες του περιβάλλοντος στο οποίο μεγαλώνει, καθώς και

να αλληλεπιδρά με τους οργανισμούς που βρίσκονται σε αυτό. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών (Azmir et. al., 2013).

1.2.2 Λιπίδια και λιπαρά οξέα

Στα φύλλα του δίκταμου, έχει αποδειχθεί ότι περιέχεται σημαντική ποσότητα λιπιδίων και λιπαρών οξέων, ουσίες που εντάσσονται στην κατηγορία των πρωτογενών μεταβολιτών, δηλαδή πλήθος πολικών και μη πολικών λιπιδίων. Αναφορικά με τα πολικά λιπίδια, αποτελούνται κατά κύριο λόγο από γλυκολιπίδια, με κυρίαρχο τα μονογαλακτοζυλ-διγλυκερίδια (MDGD). Άλλα γλυκολιπίδια που εντοπίζονται είναι τα δι- και πολύ-γαλακτοζυλ-διγλυκερίδια (DGDG, PGDG) και άλλα σουλφολιπίδια, καθώς και σύνθετες ενώσεις γλυκολιπιδίων με υδατάνθρακες (σερεβροζίτες). Όσον αφορά τα μη πολικά λιπίδια του δίκταμου, τα βασικότερα είναι οι στερόλες, οι στερυλικόι εστέρες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, αλκόολες, κηροί, ενώ σε μικρό ποσοστό εντοπίζονται τριγλυκερίδια, τριτερπενικά οξέα και αιθέρια έλαια. Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε πλειοψηφία στα φύλλα του φυτού είναι το παλμιτικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Τέλος, έχουν εντοπιστεί και ορισμένα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG), η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI), φωσφατιδυλο-χολίνη (PC), η φωσφατιδυλο-σερίνη (PS) και η φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (PE) (Komaitis et. Al., 1988).

1.2.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες – βιοδραστικά συστατικά

Τα βιοδραστικά συστατικά αποτελούν σύνθετες οργανικές ενώσεις, οι οποίες δεν συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη του φυτού. Όμως, αξίζει ιδιαίτερη μνεία σε αυτά, καθώς παρουσιάζουν εξαιρετικές φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες, τόσο κατά τη χρήση τους από ανθρώπους, όσο και από ζώα (Bernhoft et. al., 2010). Προκειμένου να απομονωθούν τα βιοδραστικά συστατικά, τόσο στο δίκταμο, όσο και σε υπόλοιπα αρωματικά φυτά, εκχυλίζονται με πολικούς και μη διαλύτες.

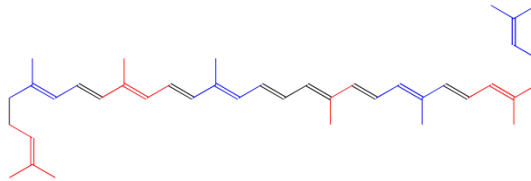
Οι 3 κατηγορίες στις οποίες διαχωρίζονται είναι:

- Τερπένια και τερπενοειδή.

- Αλκαλοειδή.
- Φαινολικές ενώσεις (Lagos et. al., 2015).

Τερπένια και τερπενοειδή

Μια μεγάλη κατηγορία βιοδραστικών συστατικών αποτελούν τα τερπένια και τα παράγωγά τους. Τα τερπένια είναι οργανικές ουσίες που απαντώνται τόσο σε ζωικούς όσο και σε φυτικούς οργανισμούς, όπως για παράδειγμα φρούτα, λαχανικά και αρωματικά φυτά. Πρόκειται για ολιγομερή του ισοπρενίου (C_5H_8) (Εικόνα 1.4). Τα τερπενοειδή προκύπτουν από τη χημική τροποποίηση των τερπενίων, ώστε να αποκτήσουν χαρακτηριστική ομάδα με οξυγόνο, όπως για παράδειγμα υδροξύλιο (-OH) ή καρβονύλιο (=O).



Εικόνα 1.4 - Τερπένιο, ως ολιγομερές του ισοπρενίου.

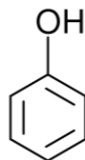
Τα τερπένια και τα τερπενοειδή έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Σύμφωνα με παλαιότερη επιδημιολογική μελέτη, έχουν ανασταλτικό χαρακτήρα έναντι σε κύτταρα που ευθύνονται για τον καρκίνο του δέρματος, του πνεύμονα, του προστάτη κ.ά. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ομάδα βιοδραστικών συστατικών παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση, ιδιαίτερα σε ορισμένα Gram θετικά βακτήρια, ενώ ορισμένα μονοτερπένια δρουν ενάντια σε μικροοργανισμούς, όπως ο *L. monocytogenes* ή ο *E. coli* (Paduch et. al., 2007).

Στο δίκταμο, έχουν εντοπιστεί πλήθος τερπενίων και τερπενοειδών. Τα βασικότερα αποτελούν το p-κυμένιο, η καρβακρόλη, η θυμοκινόνη και τα παράγωγά της, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και η λιναλοόλη, ενώ έχουν εντοπιστεί και ίχνη από ορισμένα τριτερπένια (Ntalli et. al., 2010; Kouri et. al., 2007).

Φαινολικές ενώσεις

Μία Επιπλέον κατηγορία βιοδραστικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά είναι οι φαινολικές ενώσεις. Οι εν λόγω ουσίες έχουν κεντρίσει τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς υπάρχουν πολλά είδη στη φύση, σε μεγάλες ποσότητες, ενώ έχουν αποδεδειγμένα αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Διαφοροποιούνται

από τις υπόλοιπες, λόγω της ύπαρξης της φαινολικής ομάδας στο μόριό τους, δηλαδή ενός βενζολικού δακτυλίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια (-OH) πάνω σε αυτόν (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 - Φαινολική ομάδα με ένα υδροξύλιο.

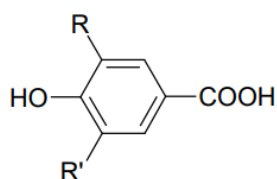
Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς πρόκειται για βιοδραστικά συστατικά με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη υδροξυλομάδας στο δακτύλιο του μορίου, γεγονός που του επιτρέπει, τόσο να δίνει άτομα υδρογόνου, όσο και να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, ενώ ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανίζουν και προοξειδωτική δράση.

Οι φαινολικές ενώσεις συντίθενται είτε με φυσικό τρόπο, δηλαδή μέσω του μεταβολισμού φυτικών οργανισμών (φυσικά αντιοξειδωτικά), είτε με τεχνητό τρόπο (συνθετικά αντιοξειδωτικά). Παρακάτω, θα παρουσιαστούν οι κατηγορίες στις οποίες διαχωρίζονται τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία αναζητήθηκαν ως επί το πλείστον στην παρούσα μελέτη (Καλτσής, 2021):

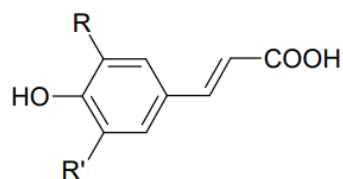
α) Φαινολικά οξέα.

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν φαινολικές ενώσεις με έναν ή παραπάνω βενζολικούς δακτυλίους και μια καρβοξυλομάδα. Περιλαμβάνονται σε πλήθος φρούτων και λαχανικών, ενώ συμβάλλουν στην σύνθεση των πρωτεϊνών και στην ενζυμική δράση στο φορέα στον οποίο βρίσκονται. Τα φαινολικά οξέα διαχωρίζονται σε 2 βασικές κατηγορίες: : τα παράγωγα κινναμικού οξέος, τα οποία εμφανίζονται στη φύση στην εστεροποιημένη τους μορφή, και τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος (Εικόνα 1.6) (Καλτσής, 2021).

Benzoic acid derivatives



Cinnamic acid derivatives

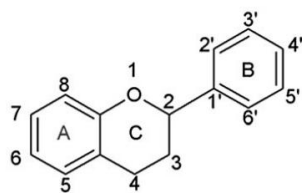


Εικόνα 1.6 - Παράγωγα βενζοϊκού και κινναμικού οξέος.

Τα φαινολικά οξέα ευθύνονται για πολλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου στο οποίο βρίσκονται, όπως για παράδειγμα το χρώμα, η υφή και η γεύση του. Επιπλέον, λόγω της καρβοξυλομάδας που διαθέτουν, εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία παρόλα αυτά, εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες. Τα παράγωγα του κινναμικού οξέος εμφανίζουν εν γένει ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκριτικά με τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, καθώς η ανθρακική αλυσίδα που συνδέει την καρβοξυλομάδα με το δακτύλιο είναι μεγαλύτερη και ακόρεστη. Πρωταρχικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του οξέος παίζει το πλήθος των υδροξυλίων, καθώς και η θέση τους στο δακτύλιο. Με την αύξηση των χαρακτηριστικών υδροξυλομάδων στο μόριο, αυξάνονται τα διαθέσιμα άτομα Η που μπορούν να δοθούν. Τα κύρια φαινολικά οξέα που απαντώνται στο δίκταμο είναι το ροσμαρινικό, το καφεϊκό και το π-κουμαρικό οξύ και η ορεσβυσίνη Α (Robbins, 2003; Rice – Evans et. al., 1996).

β) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις εξαιρετικού ενδιαφέροντος, καθώς εμφανίζονται σε πλήθος φυτών και τροφίμων που έχουν φυτική προέλευση, όπως για παράδειγμα τα μήλα ή τα κρεμμύδια. Τα φλαβονοειδή, συγκεκριμένα, είναι κυκλικά διφαινυλο-προπάνια, τα οποία ρυθμίζουν πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα στα φυτά, όπως το χρώμα και η οσμή τους. Εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς και δράση ενάντια σε νόσους όπως η νόσος του Alzheimer ή η αθηροσκλήρωση. Η βασική δομή τους αποτελείται από 3 δακτυλίους, τον Α (αρωματικός δακτύλιος), τον Β (φαινολικός δακτύλιος) και τον C (βενζοπυρανικός δακτύλιος), όπως φαίνεται από την Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7 - Βασική δομή φλαβονοειδών.

Η κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών βασίζεται στον τρόπο σύνδεσης μεταξύ των δακτυλίων B και C, καθώς και με την υποκατάσταση του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Αναλυτικότερα, όταν ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 3 με το δακτύλιο C, γίνεται λόγος για *ισοφλαβονοειδή*, ενώ αν συνδέεται στη θέση 4 με τον C, τότε η ουσία ονομάζεται *νεοφλαβονοειδές*. Εάν ο δακτύλιος B συνδεθεί στη θέση 2 με το δακτύλιο C, τότε, ανάλογα με τη δομή του βενζοπυρανικού τμήματος, τα φλαβονοειδή διαχωρίζονται σε: *φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες* (Panche et. al., 2016; Pereira et. al., 2009).

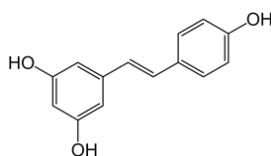
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών, από τη σκοπιά της δημιουργίας ελευθέρων ριζών, εξηγείται με βάση τη δομή του μορίου. Πιο συγκεκριμένα:

- Ο φαινολικός δακτύλιος (B), λόγω των υδροξυλομάδων (-OH) που διαθέτει, αποτελεί πιθανό δότη H, άρα σε αυτό το σημείο δεσμεύεται η ελεύθερη ρίζα. Επομένως, όσο περισσότερα υδροξύλια διαθέτει το φλαβονοειδές, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, που έχει 2 υδροξύλια στον B δακτύλιο, στις θέσεις 3' και 4' (βλ. Εικόνα 1.8), εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με την καιμπερόλη, η οποία έχει μόλις 1 υδροξύλιο στο φαινολικό δακτύλιο, στη θέση 4'.
- Σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση της ουσίας παίζει η ύπαρξη διπλών δεσμών στο μόριο, καθώς οι ακόρεστες ενώσεις σχηματίζουν σταθερότερες ρίζες.
- Κατά τον πολυμερισμό των φλαβονοειδών προς σχηματισμό νέων ενώσεων, με την αύξηση των μονομερών στην αλυσίδα, αυξάνεται και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.
- Οι αγλυκόνες των φλαβονοειδών διαθέτουν μεγαλύτερη αντιριζική ικανότητα συγκριτικά με τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους (Γεωργάκα 2005· Ορδούδη, 2007).

Τα φλαβονοειδή που απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο δίκταμο είναι η απιγενίνη, η καιμπφερόλη, η εριοδικτυόλη, η κερκετίνη, η ταξιφολίνη και η ναρινγκενίνη (Liolios et. al., 2004).

γ) Στιλβένια

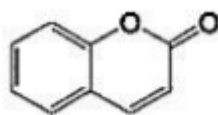
Τα στιλβένια είναι φαινολικές ενώσεις, η δομή των οποίων βασίζεται στο 1,2 διφαινυλοαιθυλένιο. Πρόκειται για ακόρεστους κυκλικούς υδρογονάνθρακες, που δεν συναντώνται συχνά στη φύση. Σύμφωνα με έρευνες, ορισμένα στιλβένια, όπως η ρεσβερατρόλη (Εικόνα 1.8), εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Μέσω των στιλβενίων, δημιουργούνται οι βινιφερίνες, οι οποίες εμφανίζουν αντιμυκητιακές ιδιότητες (Γεωργάκα, 2005· Καλτσής, 2021).



Εικόνα 1.8 - Ρεσβερατρόλη.

δ) Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι φαινολικά συστατικά, τα οποία απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς. Χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία ως αρωματικές ουσίες, ως ενισχυτικά αρώματος και ως σταθεροποιητές, ενώ διαθέτουν αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Garrard, 2014). Η βασική δομή των κουμαρινών περιλαμβάνει έναν βενζολικό δακτύλιο, του οποίου τα 2 υδρογόνα έχουν υποκατασταθεί από μία λακτονοειδή αλυσίδα, δημιουργώντας έτσι δεύτερο δακτύλιο συνδεδεμένο με τον πρώτο (Εικόνα 1.9) (Καλτσής, 2021).

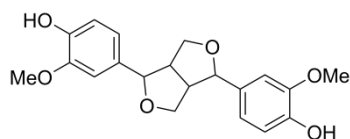


Εικόνα 1.9 - Κουμαρίνη.

ε) Λιγνάνες

Οι λιγνάνες (από τη λατινική λέξη *lignum*, που σημαίνει ξύλο) είναι φαινολικές ουσίες, που παράγονται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος. Οι λιγνάνες απαρτίζονται από 2 φαινυλοπροπανικές ομάδες (Εικόνα 1.10). Πρόκειται για

ουσίες που εμφανίζουν δράση ενάντια στο άσθμα και στον ελώδη πυρετό, ενώ διαθέτουν αντιβακτηριδιακές, αντιοξειδωτικές και αντιπαρασιτικές ιδιότητες. Τέλος, εμφανίζουν φυτοοιστρογονική συμπεριφορά (Gulcin, 2020; Γεωργάκα, 2005).



Εικόνα 1.10 - Λιγνάνη.

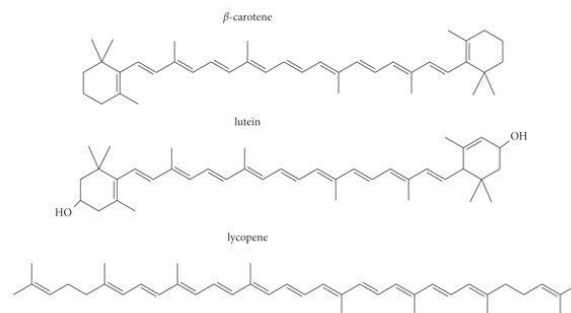
στ) Ταννίνες

Άλλη μία κατηγορία φαινολικών ουσιών που συγκαταλέγεται στα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι ταννίνες. Πρόκειται για υδατοδιαλυτές προανθοκυανίνες που συναντώνται στα φυτά και τα προστατεύουν από την τοξικότητα των φυτοφαρμάκων. Οι ταννίνες είναι πολυμερισμένα φαινολικά μεγάλου μοριακού βάρους, που διαχωρίζονται στις συμπυκνωμένες και στις υδρολύμενες ταννίνες. Συνήθως, εντοπίζονται σε αρωματικά φυτά, στον καφέ και στο κακάο, ενώ έχουν βρεθεί και σε ορισμένα τροπικά φρούτα. Διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση, ενώ συντελούν στην αντιμετώπιση προβλημάτων της ούρησης (Γούτη 2021· Καλτσής 2021).

ζ) Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή αποτελούν ακόρεστα μόρια που αποτελούνται από 40 άνθρακες, δηλαδή 8 μονομερή ισοπρενίου συνδεδεμένα μεταξύ τους. Είναι κυρίως φυτικής προέλευσης, ενώ, συνήθως, προσδίδουν κίτρινο ή κόκκινο χρώμα στα τρόφιμα, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικές χρωστικές ουσίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το λυκοπένιο, το β-καροτένιο και η λουτεΐνη (Εικόνα 1.11). Μπορούν να εντοπιστούν σε φρούτα και λαχανικά, όπως το καρότο ή η ντομάτα, ενώ πολύ συχνά αποκαλούνται και *προβιταμίνες Α*, καθώς η τελευταία είναι προϊόν του μεταβολισμού των καροτενοειδών. Οι 2 βασικές κατηγορίες των καροτενοειδών είναι οι ξανθοφύλλες και τα καροτένια. Η βασική διαφορά μεταξύ των 2 κατηγοριών έγκειται στην πολικότητα, καθώς οι ξανθοφύλλες έχουν πολική ομάδα στο άκρο τους.

Τα καροτενοειδή διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς λόγω των διπλών δεσμών που διαθέτουν στο μόριό τους (πάνω από 11), προσελκύουν ελεύθερα ηλεκτρόνια. Μία χαρακτηριστική περίπτωση ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης εμφανίζει το β-καροτένιο (Χρυσολωράς, 2012).

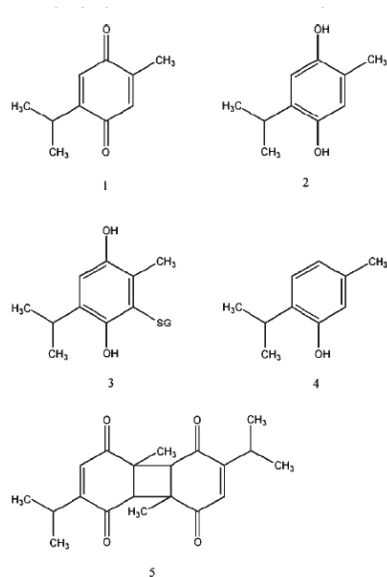


Εικόνα 1.11 – β -καροτένιο, λουτεΐνη και λυκοπένιο.

1.3 Σύσταση του δίκταμου

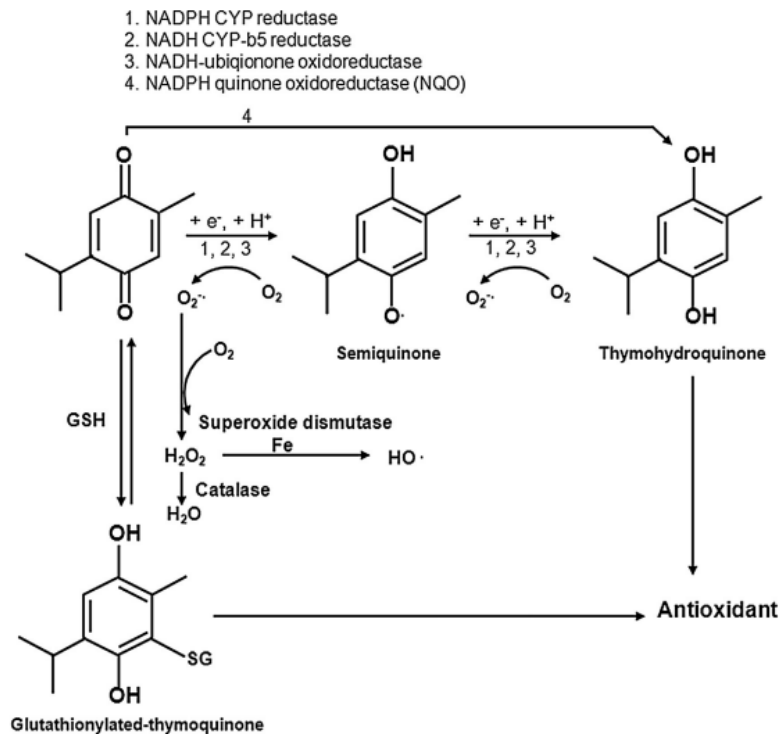
1.3.1 Θυμοκινόνη

Μία ουσία που απαντάται στο δίκταμο, η οποία παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα είναι η θυμοκινόνη. Η εν λόγω ουσία ανήκει στην υποκατηγορία των τερπενοειδών και, συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα μονοτερπενοειδές, την 2,2-ισοπροπυλ-5-μεθυλ-1,4-βενζοκινόνη, η δομή της οποίας απεικονίζεται παρακάτω. Η θυμοκινόνη (TQ) απαντάται είτε αυτούσια, είτε μέσω διαφόρων παραγώγων της, όπως για παράδειγμα της ανηγμένης της μορφής (διϋδροθυμοκινόνη) (DHTQ), της γλουταθειονυλ-διϋδροθυμοκινόνης, θυμόλης (TOH) ή διμερούς (DTQ) (Εικόνα 1.12) (Khalife et. al., 2007).



Εικόνα 1.8 - 1. Θυμοκινόνη (TQ), 2. Διυδροθυμοκινόνη (DHTQ), 3. γ-γλουταθειονυλ-διυδροθυμοκινόνη, 4. θυμόλη (TOH), 5. Διμερές της θυμοκινόνης (DTQ).

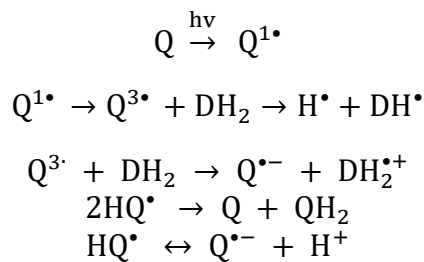
Τα παραπάνω παράγωγα προκύπτουν από την αναγωγή της θυμοκινόνης, είτε μέσω ενζυμικά είτε μέσω μη-ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Η τελική μορφή του μορίου εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες στις οποίες βρίσκεται, ενώ μπορεί να διαθέτει αντιοξειδωτική ή προοξειδωτική δράση. Μέσω ενός συστήματος 2 διαδοχικών αντιδράσεων πρόσληψης ηλεκτρονίου, η θυμοκινόνη (TQ) μετατρέπεται σε ανιόν ημικινόνης, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε διυδροθυμοκινόνη (DHTQ). Το σύμπλεγμα ενζύμων που καταλύει την αντίδραση αποτελείται από την NADPH CYP αναγωγή (1), την NADPH CYP-b5 αναγωγή (2) και την NADPH-ubiquinone οξειδαναγωγή (3). Η παραπάνω μετατροπή μπορεί να γίνει και σε ένα στάδιο, καταλυόμενη από το ένζυμο NADPH-quinone οξειδαναγωγή (4). Πέρα από το σχηματισμό της διυδροθυμοκινόνης, η μη ενζυματική αντίδρασή της με τη γλουταθειόνη, που εντοπίζεται στα ηπατικά κύτταρα, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό γλουταθειονυλ-διυδροθυμοκινόνης. Οι παραπάνω μηχανισμοί απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα (Kundu et. al., 2014):



Εικόνα 1.9 – Μηχανισμοί αναγωγής της θυμοκινόνης.

Τόσο η διϋδροθυμοκινόνη, όσο και η γλουταθειονυλ-διϋδροθυμοκινόνη παρουσιάζουν σημαντικές αντιριζικές ικανότητες. Η διϋδροθυμοκινόνη, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, έχει παρουσιάσει υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τη θυμοκινόνη (Staniek et. al., 2010).

Πέρα από τη βιοχημική μετατροπή της, η θυμοκινόνη ανάγεται σε διϋδροθυμοκινόνη μέσω της παρουσίας φωτός. Σύμφωνα με έρευνα, μέσω της προσφερόμενης ακτινοβολίας ($h\nu$), η κινόνη (Q) μετατρέπεται σε διεγερμένο ενδιάμεσο, το οποίο αντιδρά με αλκοόλη, και σχηματίζεται η ημικινόνη (HQ^\bullet), η οποία με τη σειρά της μετατρέπει τη θυμοκινόνη (Q) σε διϋδροθυμοκινόνη (QH_2). Ο μηχανισμός που προτείνεται είναι ο ακόλουθος (Göerner, 2004):



Η θυμοκινόνη εντοπίζεται κυρίως στα φύλλα και στα κλαδιά του δίκταμου. Η περιεκτικότητά της στο φυτό είναι μεταβαλλόμενη, και εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες καλλιέργειας του φυτού (εποχή, τοποθεσία κ.λπ.). Μπορεί είτε να εντοπιστεί σε ίχνη, δηλαδή σε περιεκτικότητες κάτω του 1%, είτε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (έως και 23%) (Liolios et. al., 2010). Πέρα από το δίκταμο, η θυμοκινόνη εντοπίζεται σε διάφορα άλλα φυτά και τρόφιμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι σπόροι του μαύρου κύμινου (*Nigella sativa*), στους οποίους μάλιστα αποτελεί και το βασικό βιοδραστικό συστατικό, σε περιεκτικότητα 36 – 38%. Επιπλέον, η θυμοκινόνη έχει εντοπιστεί στην ανεμώνη (*Ranunculaceae*), στο αγριμόνιο (*Eupatorium cannabinum L.*), στο θαμνόκεδρο (*Juniperus communis L.*), στην καλλιτρίδα (*Tetraclinis articulata*), καθώς και σε πλήθος χειλανθών, όπως για παράδειγμα στο κόκκινο και στο μωβ περγαμόντο (*Monarda didyma L.*, *Monarda media L.*), στο θρούμπι (*Satureja hortensis L.*, *Satureja Montana L.*), το πλατύφυλλο θυμάρι (*Thymus pulegioides L.*), στο κανονικό και στο άγριο θυμάρι (*Thymus vulgaris L.*, *Thymus serpyllum L.*) (Ahmad et. al., 2019; Taborsky et. al., 2012).

Η θυμοκινόνη αποτελεί μια ουσία με υψηλό επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς έχει παρουσιάσει εξαιρετικές αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριδιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μέσω της χρήσης της επιτυγχάνεται, τόσο πρόληψη της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, όσο και μείωση υπαρχόντων κακοηθών όγκων. Διαθέτει ανασταλτική δράση έναντι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, σύμφωνα με δοκιμές *in vitro*, άρα αποτρέπει τη δημιουργία κυττάρων που σχετίζονται με πολλές μορφές επιθετικού καρκίνου, όπως για παράδειγμα του μαστού, του αίματος, του προστάτη, του παγκρέατος κλπ (Aggarwaal et. al., 2008). Έπειτα από δοκιμές σε επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα, έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι η θυμοκινόνη έχει ανασταλτική δράση έναντι στη διαβητική νεφροπάθεια, καθώς και στην υπεργλυκαιμία. Βοηθάει στην πρόληψη της αρθρίτιδας επαγόμενης από κολλαγόνο, το οποίο δείχνει ότι πιθανόν να είναι αποτελεσματική έναντι της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Sayed et. al., 2008).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ύπαρξη υδροξυλομάδων (-OH) είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που καθιστούν τις φαινολικές ενώσεις ως αντιοξειδωτικές ουσίες. Παρά την έλλειψη υδροξυλίων σε αυτή την περίπτωση, η οποία εξηγεί και τη χαμηλή αντιριζική ικανότητά της, η θυμοκινόνη έχει εμφανίσει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η ουσία καταστέλλει τη

δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίων ($O_2^{\cdot-}$), τα οποία συμβάλλουν στην οξειδωση των λιπαρών (Badary et. al., 2003). Άλλη μία πιθανή ερμηνεία του φαινομένου είναι η αναγωγή της θυμοκινόνης σε διυδροθυμοκινόνη (βλ. Εικόνα 1.13), η οποία εμφανίζει υψηλή αντιριζική ικανότητα, στο κύτταρο μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (Staniek et. al., 2010). Η βιοχημική ερμηνεία του φαινομένου είναι ότι η θυμοκινόνη ενεργοποιεί την παραγωγή κυτταροπροστατευτικών ενζύμων, τα οποία αποτρέπουν το οξειδωτικό στρες, όπως για παράδειγμα η καταλάση (Mahmoud et. al., 2019).

1.3.2 Αιθέριο έλαιο

Ένας από τους λόγους που τα αρωματικά φυτά παρουσιάζουν εξαιρετικό εμπορικό ενδιαφέρον, πέρα από τη στερεή πρώτη ύλη, είναι τα αιθέρια έλαια που παράγουν. Πρόκειται για έλαια που περιλαμβάνουν την πλειοψηφία των πτητικών συστατικών του φυτού. Λόγω της ευχάριστης οσμής τους, χρησιμοποιούνται ευρέως στην παρασκευή αρωμάτων. Επιπλέον, λόγω των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, προστίθενται σε πολλά τρόφιμα σαν συντηρητικά, ή ακόμα και σαν ενισχυτικά γεύσης (Πάγκαλος, 2011).

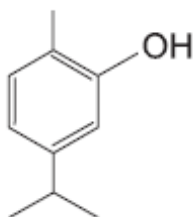
Οι επικρατέστερες μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων από τα φυτά είναι η απόσταξη με νερό, με ατμό, με νερό και ατμό και η πρέσα ψυχρής έκθλιψης. Στη διεργασία της απόσταξης, το φυτό έρχεται σε επαφή με ατμό, ο οποίος εκχylίζει τα συστατικά του αιθερίου ελαίου και τα συμπαρασύρει μέχρι τη συμπύκνωσή του, όπου διαχωρίζονται οι 2 φάσεις. Μεταξύ των 3 διεργασιών απόσταξης, η πιο συμφέρουσα από πλευράς απόδοσης σε αιθέριο έλαιο, είναι η απόσταξη με ατμό, γι' αυτό και χρησιμοποιείται περισσότερο στη βιομηχανία. Αναφορικά με τη διεργασία έκθλιψης, εφαρμόζεται μηχανική πίεση στο υλικό, με σκοπό να βγει το έλαιο από αυτό και να διαχωριστεί από το στερεό υπόλειμμα του φυτού μέσω ψεκασμού. Στα θετικά της εν λόγω διεργασίας συγκαταλέγεται η χρήση θερμοκρασιών περιβάλλοντος, άρα και η μείωση απωλειών των βιοδραστικών συστατικών του ελαίου (Reyes – Jurado et. al., 2015).

Αναφορικά με το αιθέριο έλαιο του δίκταμου, είναι ένα παράγωγο του φυτού, το οποίο βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία αρωμάτων, καθώς και στην ποτοποιία. Αποτελεί συστατικό αλκοολούχων ποτών, όπως το βερμούτ. Μάλιστα,

μεγάλο μέρος των εξαγωγών του δίκταμου στην Ιταλία οφείλεται στην Martini & Rossi, καθώς χρησιμοποιούν το αιθέριο έλαιο του φυτού για την κατασκευή του Martini (Πάγκαλος, 2011). Σχετικά με την απόδοση του δίκταμου σε αιθέριο έλαιο, είναι περίπου 1.1% επί ξηρού φυτού (Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2004).

Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου του δίκταμου διαφέρουν σε ποσοστό, λόγω διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας του φυτού, καθώς και του σημείου του δίκταμου από το οποίο εξάγεται. Οι κύριες ουσίες που εντοπίζονται σε κάθε περίπτωση είναι η καρβακρόλη, η οποία βρίσκεται σταθερά σε πλειοψηφία, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο, ενώ σε ορισμένα αιθέρια έλαια εντοπίζεται και θυμοκινόνη. Άλλες ουσίες που πιθανόν να εντοπιστούν είναι το α-πινένιο, το σαβινένιο, η θυμόλη και η λιναλοόλη (Liolios et. al., 2010).

Η καρβακρόλη είναι ένα μονοτερπένιο, παράγωγο του π-κυμενίου, με μία υδροξυλομάδα στον αρωματικό δακτύλιο (Εικόνα 1.14). Εμφανίζεται κυρίως στα αιθέρια έλαια των χειλανθών, ούσα πτητική ένωση. Η καρβακρόλη αποδίδει μία ευχάριστη οσμή, ενώ έχει κόκκινο χρώμα. Δεδομένου των αντιμικροβιακών και αντιβακτηριδιακών ιδιοτήτων του, χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων (Λεμονής, 2017). Η καρβακρόλη αποδεδειγμένα παρουσιάζει αποτελεσματική δράση ενάντια στα βακτήρια *E. coli*, *Salmonella* και *B. cereus*.



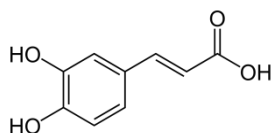
Εικόνα 1.10 - Καρβακρόλη.

Πέρα από αντιμικροβιακές, η καρβακρόλη εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Λόγω της υδροξυλομάδας που διαθέτει, δύναται να δεσμεύσει ελεύθερες υπεροξειδικές και ανιοντικές ρίζες, ενώ ταυτόχρονα ισχυροποιεί τα υπάρχοντα αντιοξειδωτικά ένζυμα, ενώ σύμφωνα με μελέτη *in vivo* που διεξάχθηκε σε ποντίκια, η χορήγηση καρβακρόλης συνέβαλε στην καταπολέμηση ασθενειών, όπως η παγκρεατίτιδα, η ηπατοτοξικότητα, ακόμα και στον καρκίνο του ήπατος (Sharifi-Rad et. al., 2018).

Η καρβακρόλη και η θυμοκινόνη αποτελούν πτητικές ουσίες που συναντώνται στα μη πολικά εκχυλίσματα του δίκταμου σε πλειοψηφία. Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που έχει προκύψει από μελέτη που αφορά στο δίκταμο και τα μη πολικά συστατικά του είναι ότι, ενώ τα άπολα εκχυλίσματα δεν φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική αντιριζική ικανότητα έναντι της ρίζας DPPH, εάν ενσωματωθούν σε λιπιδικό υπόστρωμα (π.χ. ένα φυτικό έλαιο) επιδεικνύουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα (Kouri et. al., 2007).

1.3.3 Καφεϊκό οξύ

Άλλη μία φαινολική ένωση που συναντάται στο δίκταμο, και όχι μόνο, είναι το καφεϊκό οξύ (Εικόνα 1.15). Το καφεϊκό οξύ ανήκει στα φαινολικά οξέα και, συγκεκριμένα, στα παράγωγα του κινναμικού οξέος, ενώ προκύπτει από τη σύνθεση της λιγνίνης ως δευτερογενές προϊόν μεταβολισμού. Εντοπίζεται κυρίως σε αφεψήματα, όπως το τσάι ή ο καφές, στο κρασί, σε πλήθος αρωματικών φυτών, όπως το θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.), στις ελιές και σε ορισμένα φρούτα, όπως το μήλο ή το μύρτιλο (Sakai et. al., 2022; Spagnol et. al., 2019).

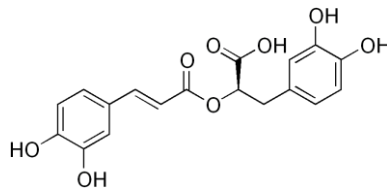


Εικόνα 1.11 - Καφεϊκό οξύ.

Το καφεϊκό οξύ είναι μία φαινόλη που, λόγω της ύπαρξης της καρβοξυλομάδας στο μόριό της, εμφανίζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Gülçin, 2006). Επιπλέον, έχει επιδείξει δόσοεξαρτώμενη δράση κατά των καρκινωμάτων που ευθύνονται για τη λευχαιμία, ενώ έχει ανασταλτικές ικανότητες ενάντια στον HIV (Σύμπουρα, 2015· Kreis et. al., 1990). Επιπλέον, συντελεί στη μείωση της χοληστερόλης, καρδιακών παθήσεων και της αθηροσκλήρωσης (Spagnol et. al., 2019).

1.3.4 Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ είναι ένα είδος φαινολικού οξέος που έχει προκύψει από την εστεροποίηση του καφεϊκού οξέος με το 3,4-διυδροξυλοφαινυλογαλακτικό οξύ (Εικόνα 1.16). Συναντάται σε πολλές περιπτώσεις στην οικογένεια των χειλανθών (*Lamiaceae*) και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της υποκατηγορίας *Nepetoideae*. Το ροσμαρινικό οξύ προκύπτει βιοσυνθετικά, μέσω των αμινοξέων L-φαινυλαλανίνη και L-τυροσίνη, ενώ διαθέτει εξαιρετικές αντιοξειδωτικές, αντικρκικές, αντιβακτηριδιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Petersen et. al., 2003).



Εικόνα 1.12 - Ροσμαρινικό οξύ.

Πέρα από το δίκταμο, το ροσμαρινικό οξύ εντοπίζεται σε πολλά άλλα φυτά της οικογένειας των χειλανθών. Βρίσκεται, σε μεγάλο ποσοστό, στο μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.), στο δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.), στη ρίγανη (*Origanum vulgare* L.), στο θρούμπι (*Satureja hortensis* L.) και στο θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.).

Λόγω της ύπαρξης 4 υδροξυλομάδων στο μόριό του, συνεπώς και της αυξημένης ικανότητάς του για δέσμευση ριζών, το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί ουσία με σημαντική αντιοξειδωτική και αντικαρκινική ικανότητα. Η αντιοξειδωτική του δράση ξεπερνάει ακόμα και τη δράση της βιταμίνης E (Σάλτας, 2012). Το ροσμαρινικό οξύ διαθέτει τη δυνατότητα αναστολής της δράσης ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης, όπως για παράδειγμα η λιποξυγενάση (Petersen et. al., 2003). Τέλος, το ροσμαρινικό οξύ δύναται να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία δερματικών ασθενειών, όπως για παράδειγμα ο έρπης ή ασθένειες που συνδέονται με τον εντεροϊό 71 (νόσος χεριών, ποδιών και στόματος, άσηπτη μηνιγγίτιδα κ.ά.) (Dabbs, 2021).

2. Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι μία από τις πιο διαδεδομένες διεργασίες στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων για την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών. Πρόκειται για μια τεχνική που ένας υγρός ή αέριος διαλύτης συμπαρασύρει τα εκχυλιζόμενα συστατικά από ένα στερεό ή υγρό υπόστρωμα. Το μίγμα διαλύτη – εκχυλισμένης ουσίας ονομάζεται «εκχύλισμα», ενώ το κλάσμα που εκχυλίζεται ορίζεται ως «διαλυμένη ουσία». Η εκχύλιση είναι μία διεργασία που είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη, καθώς δεν είναι εκλεκτική, είναι γρήγορη και μπορεί να διαχωρίσει ενώσεις από τη μήτρα τους, είτε βρίσκονται σε μικρό είτε σε μεγάλο ποσοστό. Παρόλα αυτά, στο τέλος της διεργασίας, απαιτείται επιπλέον επεξεργασία για την απομάκρυνση του διαλύτη και τον καθαρισμό της ουσίας ενδιαφέροντος.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της εκχύλισης αποτελεί η παραλαβή λιπιδικών ενώσεων από τους καρπούς, όπως για παράδειγμα στην ελαιοβιομηχανία. Αναφορικά με τα αρωματικά φυτά, αξιοποιείται για την ανάκτηση βιοδραστικών ουσιών και για την απομάκρυνση του αιθερίου ελαίου. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την παραλαβή ουσιών, όπως για παράδειγμα την παραλαβή της ζάχαρης από τα ζαχαρότευτλα. Υπάρχουν περιπτώσεις που δεν χρειάζεται η ανάκτηση της διαλυμένης ουσίας, αλλά η απομάκρυνσή της από το προϊόν, π.χ. η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τοξινών στα τρόφιμα μέσω εκχύλισης.

Στη βιομηχανία εφαρμόζονται ήδη διάφορες συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, όπως η εκχύλιση Soxhlet, η υδροαπόσταξη, η υδρο-ατμοαπόσταξη, η ατμοαπόσταξη, η εκχύλιση μέσω διαβροχής σε κλειστό σύστημα, καθώς και η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες σε ανοιχτό σύστημα. Νέες τεχνολογίες έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της ενεργειακής εξοικονόμησης, καθώς και της μεγαλύτερης απόδοσης που προσφέρουν σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες. Γίνεται λόγος για εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE), εκχύλιση με υπερήχους (UAE), εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE), εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF) και εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE).

Οι διεργασίες εκχύλισης διαχωρίζονται σε 2 κατηγορίες: στην εκχύλιση στερεού – υγρού και στην εκχύλιση υγρού – υγρού. Όσον αφορά την πρώτη, γίνεται λόγος για απομάκρυνση ουσιών από στερεό υπόστρωμα με τη χρήση ενός υγρού διαλύτη, δημιουργώντας έτσι ένα εκχύλισμα, δηλαδή μίγμα διαλύτη – εκχυλιζόμενων συστατικών. Στο δεύτερο είδος εκχύλισης, το υγρό που περιέχει την ουσία ενδιαφέροντος αναμειγνύεται με κατάλληλο διαλύτη, ώστε να εκχυλιστεί η ουσία. Έπειτα, προστίθεται ένας τρίτος, κατάλληλος διαλύτης, ο οποίος θα συμπαρασύρει τις εκχυλιζόμενες ουσίες από το σχηματιζόμενο διάλυμα.

2.1 Εκχύλιση στερεού – υγρού

Στη βιομηχανία τροφίμων, συνήθως βρίσκει εφαρμογή η εκχύλιση στερεού – υγρού. Ενδεικτικά, αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα εκχυλίσεων στερεού – υγρού που εφαρμόζονται ευρέως:

- Εκχύλιση καφεΐνης από τον καφέ.
- Εκχύλιση χυμού από φρούτα (μήλο, δαμάσκηνο κ.ά.).
- Εκχύλιση κολλαγόνου από ζώα.
- Εκχύλιση στερεών από τσάι.
- Εκχύλιση πηκτίνης από χυμό μήλου (Γιαννιώτης, 2007).

Το τρόφιμο αφού υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, δηλαδή κονιοποίηση και ξήρανση, υπόκειται σε εκχύλιση με τον κατάλληλο διαλύτη και στις κατάλληλες συνθήκες, ώστε να επιτευχθεί ανάκτηση των ουσιών ενδιαφέροντος με την ελάχιστη συγκέντρωση ανεπιθύμητων συστατικών. Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τις συνθήκες της διεργασίας είναι ο περιορισμός της καταστροφής άλλων συστατικών του τροφίμου μέσω θερμικής ή οποιασδήποτε άλλης καταπόνησης. Για την ανάκτηση των βιοδραστικών ουσιών, ο διαλύτης απομακρύνεται μέσω συμπύκνωσης (Χανιώτη, 2020).

Διάχυση και μεταφορά μάζας κατά την εκχύλιση

Η βασική αρχή της εκχύλισης στερεού – υγρού είναι η μεταφορά μάζας μέσω διάχυσης διαμέσου της μικροδομής της στερεής μήτρας, δηλαδή στο εσωτερικό και το εξωτερικό του στερεού κόκκου. Κατά την εισχώρηση του διαλύτη στο στερεό

υπόστρωμα, συμπαρασύρει τις διαλυτές σε αυτόν ενώσεις. Στη συνέχεια, το μίγμα εκχυλιζόμενων ουσιών και διαλύτη εξέρχεται από το στερεό υπόστρωμα και η ουσία ενδιαφέροντος περνά στον κύριο όγκο του διαλύτη. Τέλος, απομακρύνεται ο διαλύτης.

Η κινητήριος δύναμη για τη μεταφορά μάζας κατά την εκχύλιση είναι η διαφορά συγκέντρωσης στη διεπιφάνεια στερεού – υγρού. Μαθηματικά, η διάχυση της ουσίας από το εσωτερικό στο εξωτερικό του κόκκου περιγράφεται από το νόμο του Fick:

$$\frac{N_C}{A_T} = -D \frac{dC_c}{dz}$$

όπου N_C ο ρυθμός διάλυσης της ουσίας στο διάλυμα (kg/s), A_T το εμβαδό της διεπιφάνειας στερεού – υγρού (m^2), C_c είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας C στο διάλυμα (kg/m^3), Z είναι η απόσταση μέσα στο πορώδες της στερεής μήτρας (m) και D είναι ο συντελεστής διάχυσης (m^2/s). Αναφορικά με το συντελεστή διάχυσης, στα τρόφιμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφολογία των πόρων τους.

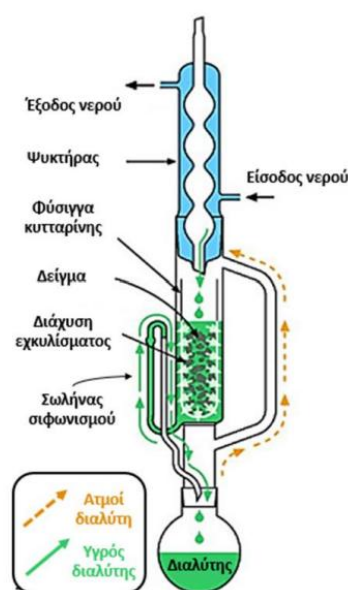
2.2 Συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στερεού – υγρού

2.2.1 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet, που πήρε το όνομά της από τον εφευρέτη της, Franz Ritter von Soxhlet, εφευρέθηκε το 1879 και αποτέλεσε τη ναυαρχίδα για τη μέθοδο της εκχύλισης συστατικών από στερεή μήτρα. Χρησιμοποιείται για πάνω από έναν αιώνα, κυρίως στον προσδιορισμό των λιπαρών στο γάλα. Σήμερα, εφαρμόζεται για την παραγωγική εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από διάφορα φυτά και παραπροϊόντα τους, όπως για παράδειγμα από τα παραπροϊόντα της βιομηχανίας καφέ.

Η εκχύλιση Soxhlet έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από το δίκταμο. Έχοντας χρησιμοποιήσει τόσο πολικούς (μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο) όσο και μη πολικούς (εξάνιο) διαλύτες, έχει ανακτηθεί μεγάλο ποσοστό αντιοξειδωτικών ουσιών. Μέσω της χρήσης πολικού διαλύτη, έχει επιτευχθεί εκχύλιση μεγάλου ποσού φαινολικών ουσιών, όπως για παράδειγμα το καφεϊκό οξύ, ενώ μεγάλη αντιριζική ικανότητα έχουν επιδείξει τα συστατικά του μη πολικού εκχυλίσματος, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Lagouri et. al., 2010).

Πρόκειται για μία εκχύλιση συνεχούς έργου, η οποία λειτουργεί ως εξής: Αρχικά, το δείγμα που περιέχει τις ουσίες ενδιαφέροντος τοποθετείται εντός φύσιγγας, η οποία είναι φτιαγμένη από κυτταρίνη, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται στον εκχυλιστήρα. Στη συνέχεια, αφού έχει προστεθεί ο κατάλληλος διαλύτης σε σφαιρική φιάλη, η φιάλη τοποθετείται κάτω από τον εκχυλιστήρα. Κάτω από τη σφαιρική φιάλη υπάρχει συσκευή θέρμανσης, μέσω της οποίας βράζει ο διαλύτης. Με την έναρξη του βρασμού του διαλύτη, οι ατμοί που προκύπτουν συμπυκνώνονται, μέσω ψυκτήρα στο πάνω μέρος της διάταξης, και πέφτουν στο σωλήνα ατμού, ενώ στη συνέχεια εκρέουν στη φύσιγγα με το στερεό δείγμα. Έτσι, πραγματοποιείται η εκχύλιση του υλικού και το εκχύλισμα οδηγείται στον κατάλληλο σωλήνα σιφωνισμού. Εάν το εκχύλισμα φτάσει σε συγκεκριμένη στάθμη στο σωλήνα που βρίσκεται, πραγματοποιείται σιφωνισμός και επαναρρέει στη σφαιρική φιάλη με τον καθαρό διαλύτη, όπου και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 2.1 (Seidel, 2008).



Εικόνα 2.1 - Συσκευή εκχύλισης Soxhlet.

Η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών μέσω Soxhlet αποτελεί μία συμφέρουσα μέθοδο για πολλούς λόγους. Πρόκειται για μια απλή μέθοδο εκχύλισης, που μπορεί να δεχτεί μεγάλες ποσότητες στερεής μήτρας, ενώ λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας που επικρατεί, υπάρχει μεγάλη διαλυτότητα των συστατικών στο διαλύτη. Επίσης, το στερεό υπόστρωμα δέχεται καθαρό διαλύτη καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας, γεγονός που καθιστά το δυναμικό μεταφοράς των στερεών στο διαλύτη υψηλό.

Δεδομένου ότι το στερεό προϊόν από το οποίο παραλαμβάνονται οι εκχυλιζόμενες ουσίες παραμένει στη φύσιγγα κυτταρίνης, δεν αναμειγνύεται με το εκχύλισμα, επομένως δεν απαιτείται διήθηση του εκχυλίσματος στο τέλος της διαδικασίας.

Παρά τα σημαντικά προτερήματά της, η εκχύλιση Soxhlet έχει ορισμένες αδυναμίες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αρχικά, επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, διότι βασίζεται στο βρασμό του διαλύτη. Αυτό με τη σειρά του προκαλεί μερική καταστροφή των εκχυλιζόμενων συστατικών. Ενώ πρόκειται για απλή και εύκολη μέθοδο εκχύλισης, είναι αρκετά χρονοβόρα, ενώ ο όγκος του διαλύτη που χρειάζεται είναι αρκετά μεγάλος, γεγονός που συνεπάγεται περιβαλλοντικό και οικονομικό πρόβλημα. Εφόσον το εκχύλισμα αποτελείται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από διαλύτη, χρειάζεται η απομάκρυνσή του από αυτό, δηλαδή μία επιπλέον διαδικασία μετά την εκχύλιση. Τέλος, λόγω της περιορισμένης εκλεκτικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, το πλήθος των εκχυλιζόμενων συστατικών είναι μη ελέγξιμο (De Castro et. al., 1998).

Στην περίπτωση του δίκταμου, έπειτα από μελέτη, διαπιστώθηκε ότι, ενώ επιτυγχάνεται υψηλή απόδοση σε εκχύλισμα, η διαδικασία είναι χρονοβόρα. Πιο συγκεκριμένα, η εκχύλιση του δίκταμου με συσκευή τύπου Soxhlet διαρκεί περίπου 5 ώρες, ενώ το εκχύλισμα, το οποίο περιείχε ορισμένες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως το ροσμαρινικό οξύ και η καρβακρόλη, εμφάνισε σημαντική αντιριζική ικανότητα (Lemonis et. al., 2013).

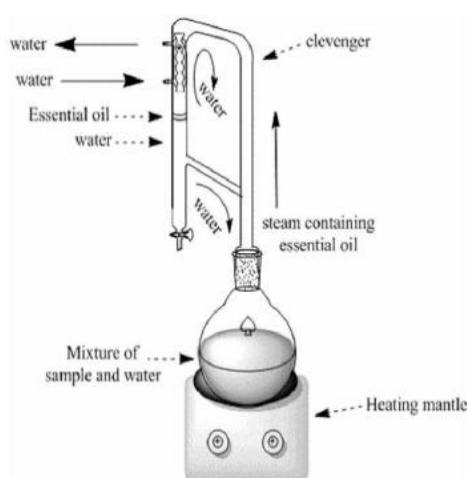
2.2.2 Απόσταξη

Η απόσταξη χρησιμοποιείται τόσο για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών, όσο και για την απομόνωση του αιθερίου ελαίου από τα αρωματικά φυτά. Η απόσταξη γίνεται με 3 διαφορετικούς τρόπους:

- Απόσταξη με νερό (υδρο-απόσταξη).
- Απόσταξη με ατμό (ατμο-απόσταξη)
- Απόσταξη με νερό και ατμό (υδρο-ατμοαπόσταξη).

Μία από τις συνηθέστερες διεργασίες στη βιομηχανία για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου, και γενικότερα των πιο πτητικών συστατικών των αρωματικών φυτών, είναι η απόσταξη με νερό τύπου *Clevenger*. Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται νερό που

βράζει. Μέσα στη σφαιρική φιάλη, πέρα από νερό, τοποθετείται το φυτό προς απόσταξη. Μέσω των δημιουργούμενων υδρατμών που διαπερνούν το φυτό, εκχλιζονται τα πτητικά συστατικά του και το μίγμα ατμών – αιθερίου ελαίου οδηγείται στον ψυκτήρα. Εκεί, το απόσταγμα ψύχεται και καταλήγει σε βαθμονομημένη στήλη, στην οποία δημιουργούνται 2 στιβάδες, το νερό και το αιθέριο έλαιο. Το αιθέριο έλαιο παραμένει στη στήλη ενώ μέρος του συμπυκνωμένου νερού οδηγείται στη σφαιρική φιάλη, για την παραγωγή υδρατμών. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται, μέχρι την παραγωγή όλης της ποσότητας αιθερίου ελαίου. Η υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2 - Υδροαπόσταξη τύπου Clevenger.

Πρόκειται για μια διεργασία παραλαβής βιοδραστικών ουσιών η οποία είναι απλή, οικονομική και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που το αιθέριο έλαιο διαχωρίζεται δύσκολα, όπως για παράδειγμα από ρίζες φυτών ή από τεμαχισμένους καρπούς. Παρόλα αυτά, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, υπάρχει μεγάλη απώλεια βιοδραστικών συστατικών, ενώ είναι σχετικά χρονοβόρα διαδικασία με μικρή απόδοση σε παραγωγή αιθερίου ελαίου.

Παρόμοια διαδικασία πραγματοποιείται στην περίπτωση της υδρο-ατμοαπόσταξης. Πρόκειται για την εξέλιξη της απόσταξης με νερό, με τη διαφοροποίηση ότι το φυτό δεν έρχεται απευθείας σε επαφή με το νερό που βράζει, αλλά τοποθετείται μέσω ενός πλέγματος πάνω από το νερό. Συγκριτικά με την υδροαπόσταξη, υπερτερεί σαν μέθοδος, καθώς το φυτό δεν έρχεται σε επαφή με το θερμό νερό, αλλά κυρίως με τους

ατμούς του, γεγονός που συνεπάγεται μικρότερη, αλλά όχι μηδενική, απώλεια θερμοευαίσθητων ουσιών.

Στην περίπτωση της ατμοαπόσταξης, το φυτό δεν έρχεται σε επαφή με το νερό που βράζει, προκειμένου να απομακρυνθούν τα πτητικά του συστατικά, αλλά διαπερνάται απευθείας με ατμό, ο οποίος παράγεται σε ατμολέβητα. Μέσω απόσταξης με ατμό, παραλαμβάνεται η μέγιστη ποσότητα αιθερίου ελαίου, το οποίο μάλιστα είναι καλύτερης ποιότητας, καθώς δεν έχει υποστεί θερμική καταπόνηση. Προκειμένου να παραληφθεί το αιθέριο έλαιο του δίκταμου σε μικρής κλίμακας παραγωγή, χρησιμοποιούνται κυρίως συσκευές υδρο-ατμοαπόσταξης και ατμοαπόσταξης, καθώς περιλαμβάνει ορισμένα θερμοευαίσθητα συστατικά.

Άλλα είδη απόσταξης, που δεν εφαρμόζονται τόσο στην Ελλάδα, είναι η στροβιλο-απόσταξη, η οποία βασίζεται στη θέρμανση του μίγματος νερού – φυτού εξωτερικά, μέσω διπλών τοιχωμάτων, και στο συνεχή τεμαχισμό του στερεού δείγματος και η υδροδιαχυτική απόσταξη, κατά την οποία ο ατμός εισέρχεται στο δείγμα έχοντας καθοδική και όχι ανοδική πορεία (Πεχλιβανίδου, 2022· Πουλή, 2015).

2.2.3 Εκχύλιση μέσω διαβροχής

Η διαβροχή αποτελεί για πολλά χρόνια τώρα μία λύση για μικρής κλίμακας παραλαβή βιοδραστικών ουσιών από φυτά, σε σπιτικό ή βιομηχανικό επίπεδο. Χρειάζεται, αρχικά, να τεμαχιστεί σε πολύ μικρά κομμάτια το φυτό, προκειμένου η διεπιφάνεια φυτού – διαλύτη να είναι μεγάλη. Έπειτα, το φυτό τοποθετείται μαζί με τον κατάλληλο διαλύτη σε κλειστό δοχείο, το οποίο αναδεύεται έντονα. Μόλις τελειώσει η εκχύλιση, το μίγμα φυτού – εκχυλίσματος διηθείται για να απομακρυνθούν τα στερεά, ενώ το φυτό συμπιέζεται προκειμένου να ανακτηθούν τυχόν υπολειμματικά συστατικά που έχουν εγκλωβιστεί σε αυτό. Τέλος, ακολουθεί μία επιπλέον διήθηση στο υγρό για τον τελικό καθαρισμό του.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της εκχύλισης με διαβροχή είναι η διαρκής ανάδευση, η οποία εξασφαλίζει πλήρη αναμιξιμότητα του φυτού με το διαλύτη, άρα και πιο επιτυχημένη εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών, ενώ μέσω της διήθησης, απομακρύνονται τα εκχυλισμένα συστατικά από την επιφάνεια του φυτού, επομένως είναι ευκολότερη η διείδυση στη στερεή μήτρα (Azmir et. al., 2013).

Η διαδικασία της εκχύλισης μέσω διαβροχής (maceration) παραμένει μέχρι και σήμερα μία από τις επικρατέστερες τεχνικές εκχύλισης αρωματικών συστατικών από διάφορα φυτά στη βιομηχανία αλκοολούχων ποτών. Το δίκταμο, που χρησιμοποιείται στην παρασκευή ποτών όπως το βερμούτ ή το αψέντι, υφίσταται εκχύλιση με διαβροχή σε μίγμα νερού και αιθανόλης, σε αναδευόμενα δοχεία, για να απελευθερώσει ουσίες όπως για παράδειγμα η καρβακρόλη. Η εν λόγω διεργασία διαρκεί μερικές εβδομάδες, ενώ σε βιομηχανίες παραγωγής κρασιού, το δίκταμο διαβρέχεται με το ίδιο το κρασί για να του αποδώσει όλα του τα αρώματα (Gambelunghe et. al. 2002; Tonutti et. al. 2010).

2.2.4 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

Η τελευταία συμβατική μέθοδος εκχύλισης είναι η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με χρήση οργανικών διαλυτών, που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών από το δίκταμο στην παρούσα μελέτη. Πρόκειται για μια διεργασία που βασίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης από το στερεό υπόστρωμα στο διαλύτη.

Η εκχύλιση μέσω οργανικών διαλυτών πραγματοποιείται σε σταθερή κλίνη. Πιο συγκεκριμένα, εφόσον το φυτό έχει τεμαχιστεί και πακτωθεί μέσα στον εκχυλιστήρα, διαβιβάζεται σε αυτό καθαρός διαλύτης από κάτω, ενώ στην πάνω μεριά της στήλης εκρέει το εκχύλισμα. Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες μπορεί να διαχωριστεί σε 2 στάδια: στο στάδιο της έκπλυσης, δηλαδή την εξάντληση των ουσιών από τον εξωτερικό φλοιό του κόκκου και στο στάδιο της διάχυσης, δηλαδή την εκχύλιση των συστατικών από το εσωτερικό. Κατά την έκπλυση, εκχυλίζονται από το φυτό όσα βιοδραστικά συστατικά έχουν μεταπηδήσει στην επιφάνεια του κόκκου λόγω της προεπεξεργασίας του φυτού. Κατά τη διάχυση, απομονώνονται οι ουσίες που βρίσκονται στο εσωτερικό της μήτρας, όπως για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες, εξαιτίας των οποίων παρατηρείται αποχρωματισμός του εκχυλίσματος μετά το πέρας της έκπλυσης. Μαθηματικά, η συγκέντρωση της εκάστοτε εκχυλιζόμενης ουσίας στο υπόστρωμα περιγράφεται από το δεύτερο νόμο του Fick:

$$\ln(C_{\infty} - C_t) = \ln(C_{\infty} - C_0) - kt$$

Όπου C_{∞} η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στα εκχυλιζόμενα συστατικά σε άπειρο χρόνο, C_t η συγκέντρωση σε χρόνο t , C_0 η αρχική συγκέντρωση της κάθε ουσίας και k σταθερά ρυθμού.

Η απόδοση της εκχύλισης επηρεάζεται άμεσα από ορισμένους παράγοντες. Αυτοί είναι, αρχικά, ο διαλύτης, οι συνθήκες της εκχύλισης (θερμοκρασία, pH), οι επαναλήψεις της εκχύλισης του φυτού, καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων του φυτού.

Ξεκινώντας από το διαλύτη, η φύση του επηρεάζει τη σύσταση και την ποιότητα του εκχυλίσματος. Οι πιο διαδεδομένοι είναι το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη, ενώ διαλύτες όπως η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας έχουν χαμηλότερη απόδοση. Κοιτώντας τη σκοπιά της πολικότητας, ανάλογα με τη χρήση πολικού ή μη διαλύτη, επιτυγχάνεται εκχύλιση διαφορετικών συστατικών. Στην περίπτωση του δίκταμου, εάν υποστεί εκχύλιση με πολικό διαλύτη, όπως για παράδειγμα η αιθανόλη, επιτυγχάνεται απομάκρυνση πολικών συστατικών, δηλαδή φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών. Εάν χρησιμοποιηθεί μη πρωτικός διαλύτης, όπως για παράδειγμα η ακετόνη ή ο οξικός αιθυλεστέρας, αφαιρούνται από το φυτό τα άπολα συστατικά του, όπως για παράδειγμα ορισμένες χλωροφύλλες και κάποια λιποδιαλυτά συστατικά (Kouri et. al., 2007). Σύμφωνα με έρευνα σε υδατικό, μεθανολικό, αιθανολικό και ακετονικό εκχύλισμα δίκταμου, οι περισσότερες αντιοξειδωτικές ουσίες εντοπίζονται στο υδατικό εκχύλισμα, μετά στο μεθανολικό, στο αιθανολικό και, τέλος, το εκχύλισμα με την ελάχιστη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών είναι το εκχύλισμα ακετόνης (Møller et. al., 1999).

Αναφορικά με τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, η θερμοκρασία αποτελεί δίκτο μαχαίρι για την εκχύλιση των βιοδραστικών ουσιών. Διατηρώντας αυξημένη θερμοκρασία, η διάρρηξη του κόκκου για την εκχύλιση των συστατικών του καθίσταται ευκολότερη, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η διαλυτότητα του στερεού στο διαλύτη, του οποίου το ιξώδες μειώνεται. Εάν επικρατεί υψηλή θερμοκρασία στη διάταξη της εκχύλισης, ελλοχεύει ο κίνδυνος καταστροφής των θερμοευαίσθητων συστατικών του φυτού. Όσον αφορά τις συνθήκες pH, εκτός του ότι επηρεάζει σημαντικά τη διαλυτότητα των εκχυλιζόμενων συστατικών, σε ακραίες συνθήκες μεταβάλλει τη δομή των εκχυλιζόμενων ουσιών. Για παράδειγμα, η θυμοκινόνη, που εντοπίζεται σε μη πολικά εκχυλίσματα του δίκταμου, σε ακραία

αλκαλικό pH υφίσταται υποβάθμιση, ενώ είναι πιο σταθερή σε όξινο περιβάλλον (Darakhshan et. al., 2015). Επιπλέον, παίζει μεγάλο ρόλο το μέγεθος των κόκκων στους οποίους διατμείται το εκχυλιζόμενο υλικό, καθώς μεγαλύτερη διάτμηση συνεπάγεται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής. Η επανάληψη των εκχυλίσεων στο ίδιο φυτό αυξάνει την ποσότητα βιοδραστικών συστατικών που εκχυλίζονται. Ας αναφερθεί εδώ ότι ο βέλτιστος αριθμός επαναλήψεων είναι 3-5 φορές.

Πέρα από τους παραπάνω παράγοντες, η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες διαφοροποιείται και ως προς το χρόνο της εκχύλισης. Αυτός μπορεί να κυμαίνεται από 1 λεπτό μέχρι και 24 ώρες. Παρόλα αυτά, οι μεγάλοι χρόνοι συνεπάγονται πιθανή οξείδωση των εκχυλιζόμενων ουσιών.

2.3 Μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

2.3.1 Εκχύλιση με υπερήχους (UAE)

Μια μη συμβατική παραλλαγή της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες είναι η χρήση υπερήχων. Λέγοντας υπερήχους, εννοούμε τη διάδοση υπερηχητικών κυμάτων, δηλαδή μηχανικών κυμάτων συχνότητας πάνω από 20 kHz, δηλαδή του ανωτάτου ορίου των ηχητικών κυμάτων που αντιλαμβάνεται ο άνθρωπος, μέσα στο εκχυλιζόμενο στερεό. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται τα υπερηχητικά κύματα πριν την εκχύλιση είναι για να δημιουργηθεί σπηλαίωση.

Κατά τη διάδοση υπερηχητικών κυμάτων στο σύστημα φυτού – διαλύτη, δημιουργείται ένα διαμήκες κύμα, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στη δημιουργία μικρών φυσαλίδων τοπικά λόγω της έντονης συστολής και διαστολής που υφίσταται ο διαλύτης σε εκείνη την περιοχή. Λόγω αυτής της αναταραχής, σε εκείνα τα σημεία επικρατούν συνθήκες αρνητικής πίεσης, η οποία φτάνει έως και 50 MPa, και πολύ υψηλής θερμοκρασίας. Επομένως, όταν αναπόφευκτα καταστραφούν οι μικροφυσαλίδες, τα γειτονικά τους κύτταρα διαρρηγνύονται, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική διείδυση του διαλύτη στο μόριο, άρα και την επιτυχημένη εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών του.

Πρόκειται για μία επαναστατική τεχνική εκχύλισης, η οποία συνεπάγεται τη χρήση μικρότερης ποσότητας διαλύτη και εξοικονόμηση ενέργειας. Επιπλέον, η διάρρηξη των κυττάρων μέσω υπερήχων συνεπάγεται μικρότερο χρόνο εκχύλισης. Στα αρνητικά της συγκεκριμένης διαδικασίας συγκαταλέγεται η ανάπτυξη ακραίων συνθηκών πίεσης και θερμοκρασίας στα σημεία που δημιουργείται σπηλαιώση, άρα και η καταστροφή ορισμένων μικροσυστατικών του εκχυλιζόμενου στερεού.

Στην περίπτωση του δίκταμου, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους συχνότητας 35 MHz, συγκριτικά με συμβατική εκχύλιση με διαβροχή και στη συνέχεια με πετρελαϊκό αιθέρα, δεν επέφερε σημαντική διαφοροποίηση ως προς το φαινολικό περιεχόμενο, καθώς και την τελική αντιριζική ικανότητα του εκχυλίσματος. Επιπλέον, μετά από ανάλυση HPLC, προέκυψε ότι το ποσοστό της θυμοκινόνης στο εκχύλισμα από 12.07% ανέβηκε στο 19.7%, ενώ η συγκέντρωση της καρβακρόλης ακολούθησε καθοδική πορεία, με πτώση από το 85.8% στο 75.97% στο οργανικό εκχύλισμα (Κανέλλου, 2012).

2.3.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE)

Μία καινούρια «πράσινη» μέθοδος εκχύλισης είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE). Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται κυρίως σε φυτικές πρώτες ύλες, με σκοπό την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών τους, αλλά και του αιθερίου ελαίου τους. Λέγοντας μικροκύματα, εννοούμε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με συχνότητα από 0.3 έως 300 GHz. Οι οικιακοί φούρνοι μικροκυμάτων εκπέμπουν κύματα συχνότητας 2.45 GHz.

Μέσω των κυμάτων που διαδίδονται στο μέσο, απορροφάται ενέργεια από τα πολικά συστατικά του συστήματος στερεό – διαλύτης (π.χ. νερό). Το πόση ενέργεια απορροφάει ένα σύστημα ενός συγκεκριμένου διαλύτη καθορίζεται κυρίως από τη διηλεκτρική σταθερά του. Επιπλέον, δημιουργείται θέρμανση τοπικά, η οποία σε συνδυασμό με την απορροφούμενη ενέργεια, έχει ως αποτέλεσμα να διαμορφωθεί ένα περιστροφικό δίπολο στο ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο οδηγεί στην ιοντική μετανάστευση εντός του συστήματος. Η εν λόγω ιοντική ροή που δημιουργείται συναντά αντίσταση από το μέσο στο οποίο βρίσκεται, επομένως παράγεται

θερμότητα. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, στην καλύτερη διείσδυση του διαλύτη στη στερεή μήτρα, το οποίο επιφέρει αποτελεσματικότερη εκχύλιση. Έπειτα από τη διείσδυση του διαλύτη στο στερεό, εκχυλίζονται τα συστατικά ενδιαφέροντος από αυτό και μεταφέρονται από τον εσωτερικό στον εξωτερικό φλοιό του. Στη συνέχεια, όπως και σε κάθε άλλη περίπτωση εκχύλισης, διαχωρίζεται το εκχύλισμα από το στερεό και απομακρύνεται ο διαλύτης (Al-Harabsheh et. al., 2004).

Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων με τους πολικούς διαλύτες, καθώς και η επιλεκτική θέρμανση του στερεού υποστρώματος, καθιστούν την εκχύλιση με μικροκύματα ως την ιδανική εναλλακτική για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων συστατικών από αρωματικά φυτά. Με την τοποθέτηση του φυτού σε άπολο διαλύτη, δεν απορροφάται από αυτό ενέργεια, ενώ η εκχύλιση με υποβοήθηση από μικροκύματα συνεπάγεται μικρότερη ποσότητα φυτού αλλά και διαλύτη για την παραλαβή βιοδραστικών ουσιών. Παρόλα αυτά, έπειτα από μελέτη σε φύλλα καπνού και φλούδες από πορτοκάλι, αποδείχθηκε ότι τα μικροκύματα επιδρούν αρνητικά στην κυτταρική δομή τους (Kratchanova et. al., 2004; Zhou et. al., 2006).

Στην περίπτωση του δίκταμου, έχει μελετηθεί στο παρελθόν η εκχύλιση κλειστού τύπου του φυτού. με διάφορους διαλύτες, με τη συμβατική μέθοδο και υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Η συμβατική κλειστή εκχύλιση διήρκεσε 2h, σε αντίθεση με την εκχύλιση με μικροκύματα, η οποία διήρκεσε 4 min. Πέρα από μικρότερο χρόνο εκχύλισης, με τη χρήση μικροκυμάτων επετεύχθη μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο στο εκχύλισμα. Κοιτώντας το εκχύλισμα ακετόνης και νερού, το οποίο ήταν και το πιο αποδοτικό σε βιοδραστικές ουσίες, το TPC αυξήθηκε κατά 54% (Proestos et. al., 2008).

2.3.3 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό (SFE)

κρίσιμο σημείο μιας ουσίας είναι οι υψηλότερες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης στις οποίες η ουσία είναι μίγμα ατμού – υγρού. Πάνω από το εν λόγω σημείο, δημιουργείται το *υπερκρίσιμο ρευστό*, το οποίο είναι ένα ομογενές, πτητικό ρευστό το οποίο συμπεριφέρεται ταυτόχρονα σαν υγρό και σαν αέριο. Για να μετατραπεί ένα ρευστό σε υπερκρίσιμο, αρκεί να θερμανθεί τόσο ώστε η τελική θερμοκρασία του να

είναι πάνω από την κρίσιμη. Εναλλακτικά, το ρευστό συμπιέζεται για να ξεπεραστεί η κρίσιμη πίεσή του.

Το πιο σύνηθες ρευστό που χρησιμοποιείται στην υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), καθώς είναι ένα ρευστό οικονομικό, φιλικό προς το περιβάλλον, με μικρή τοξικότητα και χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία. Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα εκχυλίζει κυρίως τα πτητικά και λιπόφιλα συστατικά της μήτρας, αποφεύγοντας φαινόμενα υποβάθμισης λόγω της παρουσίας φωτός ή αέρα. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι εάν συζευχθεί το υπερκρίσιμο CO₂ με κάποιον οργανικό διαλύτη στην εκχύλιση, αυξάνεται η απόδοσή της σε βιοδραστικά συστατικά.

Όσον αφορά το δίκταμο, σύμφωνα με μελέτη, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση υπερκρίσιμου CO₂ έπειτα από συμβατική εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα οδήγησε σε υψηλή απόδοση εκχύλισης. Το πιο σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι με τη χρήση υπερκρίσιμης εκχύλισης επικουρικά με την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, παρατηρήθηκε αισθητή αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος, όσον αφορά τη δυνατότητα του φυτού να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Lemonis et. al., 2013).

2.3.4 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF)

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed Electric Fields, PEF) αποτελούν πρακτική που έχει τραβήξει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στην προεπεξεργασία πολλών τροφίμων. Η επεξεργασία ενός τροφίμου με παλμικά ηλεκτρικά πεδία περιλαμβάνει την εφαρμογή τάσης για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (από 100 μέχρι 10000 μsec) υψηλής έντασης (από 0.1 μέχρι 10 kV) μέσω 2 ηλεκτροδίων. Σε σχέση με την απλή εκχύλιση και τις προαναφερθείσες μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, η προκατεργασία με PEF έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την απόδοση σε φαινολικά συστατικά σε πλήθος τροφίμων, όπως για παράδειγμα στα σταφύλια.

Μέσω της εφαρμογής ρεύματος στα κύτταρα, επιτυγχάνεται ηλεκτροδιάτρηση, η οποία τις περισσότερες φορές είναι μη αντιστρεπτή. Με τον όρο «ηλεκτροδιάτρηση» εννοούμε την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων, όταν αυτά εκτεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη πρόσβαση του διαλύτη στο κύτταρο, άρα και ευκολότερη εκχύλιση των συστατικών του. Αυτό

σημαίνει ότι μειώνεται δραστικά ο χρόνος εκχύλισης, ενώ ταυτόχρονα παραμένουν αναλλοίωτες οι ουσίες που διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας ενός δείγματος με παλμικά ηλεκτρικά πεδία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Για αρχή, μεγάλο ρόλο παίζει η ένταση του πεδίου που θα εφαρμοστεί. Εάν η ένταση είναι μεταξύ 0.1 και 1 kV/cm, η διάτρηση των μεμβρανών είναι αντιστρεπτή, ενώ αν η ένταση είναι μεταξύ 0.5 και 3 kV/cm, είναι αναντίστρεπτη. Στη συγκεκριμένη διεργασία, είναι επιθυμητή η μη αντιστρεπτή η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο χρόνος επεξεργασίας του δείγματος και η συχνότητα εφαρμογής των παλμών πριν την εκχύλιση, καθώς με την εφαρμογή συχνών και παρατεταμένων παλμών στο δείγμα ελλοχεύει ο κίνδυνος απότομης αύξησης της θερμοκρασίας, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό.

Μετά από μελέτη που διεξήχθη σε ρίγανη (*O. vulgare L.*) και άγριο θυμάρι (*T. serpyllum L.*), προέκυψε ότι η απόδοση εκχύλισης σε φαινολικά συστατικά στην περίπτωση προκατεργασίας με PEF έντασης 3 kV/cm ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης με αιθανόλη, συγκεκριμένα αυξήθηκαν κατά 28.9% για τη ρίγανη και 47.4% για το θυμάρι. Επιπλέον, και στις 2 περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι χρειάστηκε λιγότερος χρόνος για την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών (Carpentieri et. al., 2021).

2.3.5 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (PLE)

Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό αποτελεί, πρακτικά, μια παραλλαγή της συμβατικής εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες. Η βάση της μεθόδου είναι η ίδια, όμως ο εκάστοτε διαλύτης βρίσκεται σε υψηλή θερμοκρασία (50 – 200 °C). Για να εξασφαλιστεί η παραμονή του διαλύτη σε υγρή φάση, βρίσκεται υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (99 – 148 atm). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το νερό, το εξάνιο, η ακετόνη και η μεθανόλη. Μέσω της αυξημένης θερμοκρασίας, αυξάνεται η διαλυτότητα των εκχυλιζόμενων συστατικών, ενώ στην περίπτωση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών, αποδυναμώνονται οι δεσμοί που συνδέουν τις φαινόλες με το στερεό υπόστρωμα.

2.3.6 Εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα

Η προεπεξεργασία του δείγματος με ένζυμα πριν την εκχύλιση αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο διευκόλυνσης της εκχύλισης. Ο ρόλος των ενζύμων σε αυτή την περίπτωση είναι η διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών, με απώτερο σκοπό την ευκολότερη εκχύλιση ενδοκυτταρικών ουσιών. Ορισμένα ένζυμα που επικουρούν την εκχυλιστική διαδικασία είναι οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες και οι πηκτινάσες (Puri et. al., 2012).

3. Το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό συστατικό της διατροφής στην Ελλάδα και, γενικότερα, στη Μεσόγειο. Πρόκειται για ένα τρόφιμο εξαιρετικής διατροφικής αξίας που προέρχεται από τον καρπό της ελιάς (*Olea europaea* L.), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο στο μαγείρεμα, όσο και αυτούσιο. Μάλιστα, πέρα από την ευρεία χρήση του στον ελλαδικό χώρο, αποτελεί ένα από τα κυριότερα προϊόντα που παράγει η Ελλάδα και εξάγει παγκοσμίως. Για του λόγου το αληθές, σύμφωνα με έρευνα, το 1/5 της παραγωγής ελαιολάδου στην Ευρώπη προέρχεται από την Ελλάδα (Aparicio et. al., 2013).

3.1 Κατηγοριοποίηση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, ανάλογα με το βαθμό επεξεργασίας που έχει υποστεί, διαχωρίζεται σε παρθένο, ραφινρισμένο και μίγμα παρθένου και ραφινρισμένου ελαιολάδου. Επιπλέον, πέρα από τη σάρκα του καρπού της ελιάς, από την οποία παράγεται το ελαιόλαδο, από το κουκούτσι του καρπού παρασκευάζεται το πυρηνέλαιο. Το παρθένο ελαιόλαδο είναι το λάδι το οποίο έχει υποστεί πλύση, φυγοκέντρηση, διήθηση και απόχυση, δηλαδή καθαρά μηχανικές διεργασίες. Πέρα από αυτές, στο παρθένο ελαιόλαδο δεν εφαρμόζονται άλλες χημικές ή θερμικές επεξεργασίες (Aparicio et. al., 2013).

Ο βασικότερος παράγοντας που διαχωρίζει ποιοτικά το παρθένο ελαιόλαδο είναι η συγκέντρωσή του σε λιπαρά οξέα, και συγκεκριμένα η συγκέντρωση σε ελαϊκό οξύ,

καθώς είναι το κυρίαρχο οξύ. Το παρθένο ελαιόλαδο χωρίζεται στις ακόλουθες κατηγορίες (European Commission Regulation, 1991):

- Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, με οξύτητα που δεν ξεπερνάει τα 0.8 g ελαϊκού οξέος ανά 100g λαδιού.
- Παρθένο, όπου η μέγιστη οξύτητά του είναι 2 g ελαϊκού οξέος / 100 g ελαιολάδου.
- Κανονικό παρθένο, με οξύτητα μικρότερη ή ίση του 3.3
- Λαμπάντε, με οξύτητα μεγαλύτερη του 3.3. Να διευκρινιστεί εδώ ότι το ελαιόλαδο λαμπάντε δεν προορίζεται για κατανάλωση, λόγω της μεγάλης οξύτητας που έχει. Αντίθετα, χρησιμοποιείται για τεχνικούς σκοπούς, όπως για παράδειγμα ως καύσιμο.

Αναφορικά με το ραφινρισμένο ελαιόλαδο, είναι ένα επεξεργασμένο ελαιόλαδο, από το οποίο έχουν αφαιρεθεί μεγάλες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων. Το ραφινάρισμα συμπεριλαμβάνει την αποκομίωση του ελαιολάδου, την εξουδετέρωση των οξέων με αλκαλικό διάλυμα, τη διοχέτευση ατμού και τη διήθησή του.

3.2 Συστατικά του ελαιολάδου

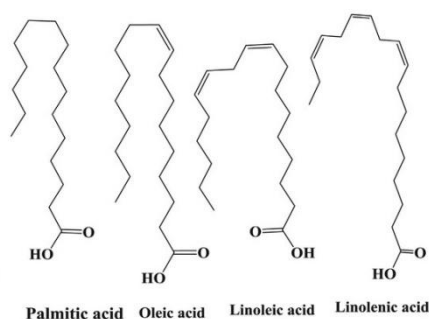
Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά βάση από τριγλυκερίδια (98-99%), δηλαδή από εστέρες της γλυκερόλης με διάφορα λιπαρά οξέα. Επιπλέον, στο ελαιόλαδο περιέχονται ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το 72% των οξέων είναι μονοακόρεστα, το 14% πολυακόρεστα και το υπόλοιπο 14% είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα. Τέλος, σε μικρότερες ποσότητες περιέχονται φαινολικά συστατικά, τα οποία καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη γεύση του λαδιού, τερπενοειδή, τοκοφερόλες, στερόλες και σκουαλένιο. Η ακριβής σύσταση του εκάστοτε ελαίου διαφέρει, καθώς εξαρτάται από την ποικιλία και την τοποθεσία από την οποία προέρχεται.

3.2.1 Λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια

Το ελαιόλαδο περιέχει υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, δηλαδή οξέων με ένα διπλό δεσμό στην ανθρακική τους αλυσίδα. Τα μονοακόρεστα οξέα, λόγω της ύπαρξης ενός μόνο διπλού δεσμού, σε σχέση με τα πολυακόρεστα,

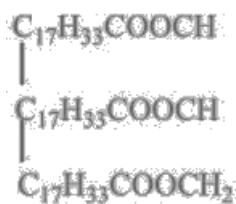
αντιστέκονται εντονότερα στην ποιοτική υποβάθμιση του ελαίου λόγω υψηλών θερμοκρασιών, γεγονός που υποδεικνύει ότι το ελαιόλαδο είναι κατάλληλο για μαγείρεμα.

Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα επιδεικνύουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα οξέα του ελαίου. Το κυρίαρχο μονοακόρεστο οξύ στο ελαιόλαδο είναι το ελαϊκό, το οποίο του αποδίδει και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Άλλα λιπαρά οξέα που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό, το λινολεϊκό και το λινολενικό οξύ (Εικόνα 3.1) (Di Serio et. al., 2016). Το παλμιτικό είναι κορεσμένο οξύ, ενώ τα υπόλοιπα 2 είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.



Εικόνα 3.1 - Λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο.

Συνεχίζοντας με τα τριγλυκερίδια, πρόκειται για εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, εφόσον στο ελαιόλαδο κυριαρχεί το ελαϊκό οξύ, το τριγλυκερίδιο που συναντάται σε πλειοψηφία είναι η τριελαΐνη, δηλαδή ο εστέρας της γλυκερόλης με το ελαϊκό οξύ (Εικόνα 3.2). Πέρα από την τριελαΐνη, στο ελαιόλαδο συναντάται η παλμιτοδιελαΐνη και η διελαΐλολινελαΐνη (Γρίμπιλας, 2023).



Εικόνα 3.2 - Τριελαΐνη.

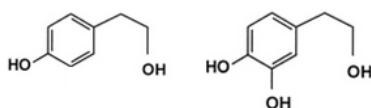
3.2.2 Φαινολικές ουσίες στο ελαιόλαδο

Πέρα από τα κύρια συστατικά του ελαιολάδου, δηλαδή τα λιπαρά οξέα και τα τριγλυκερίδια, σε μικρότερες ποσότητες συναντώνται και ορισμένες φαινολικές ουσίες, οι οποίες μάλιστα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου, καθώς και στην αντιοξειδωτική του ικανότητα.

Οι φαινολικές ουσίες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

Πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα

Σε αυτή την υποκατηγορία συναντώνται ουσίες όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η α-τοκοφερόλη και το γαλλικό, το βανιλικό, το καφεϊκό, το κινναμικό και το φερουλικό οξύ. Ιδιαίτερα η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη (Εικόνα 3.3). Έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν εξαιρετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ειδικά η υδροξυτυροσόλη, άρα και πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση, ενώ συμβάλλουν και στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής του ελαιολάδου, καθώς εμποδίζουν τις αντιδράσεις υποβάθμισης της ποιότητάς του. Επιπλέον, το καφεϊκό οξύ έχει επιδείξει σημαντική αντιβακτηριδιακή δράση, ενώ το σύνολο των πολυφαινολών και των φαινολικών οξέων επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση στα λιπίδια του αίματος (Σκοπαράτζος, 2021, Romani et. al., 2019).

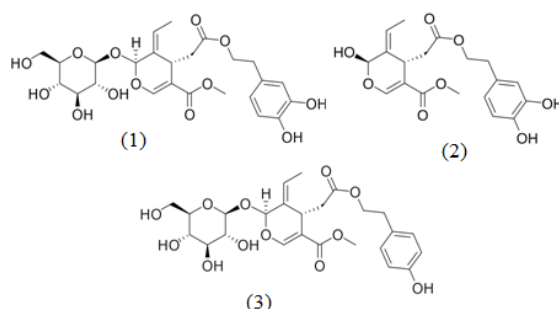


Εικόνα 3.3 – Τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.

Σεκοϊριδοειδή και παράγωγά τους

Συγκεκριμένα, στο ελαιόλαδο απαντώνται η ελευρωπαΐνη και η αγλυκόνη της, σε μεγάλο ποσοστό στα φαινολικά συστατικά, η ολεοκανθάλη, η ελαιασίνη και το άγλυκο του λιγκστροσίδη (Εικόνα 3.4). Λόγω της δομής τους, και συγκεκριμένα των υδροξυλομάδων που διαθέτουν, τα σεκοϊριδοειδή έχουν τη δυνατότητα να προσφέρουν άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων, σταματώντας έτσι τη διαδικασία της οξειδωτικής υποβάθμισης του τροφίμου, η οποία αναλύεται εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο. Λόγω αυτής της αντιοξειδωτικής ικανότητας που διαθέτουν, οι

ουσίες εμφανίζουν δράση ενάντια σε φλεγμονές, σε παθήσεις όπως ο διαβήτης και σε ανάπτυξη καρκινωμάτων, ενώ η ελευρωπαΐνη αναστέλλει πλήθος καρδιακών παθήσεων που οφείλονται στη δημιουργία θρόμβων (Aparicio et. al., 2013; Montoya et. al., 2021; Romani et. al., 2019).



Εικόνα 3.4 – (1) Ελευρωπαΐνη, (2) Αγλυκόνη της ελευρωπαΐνης, (3) Αγλυκο του λιγκστροσιδή.

Λιγνάνες

Οι λιγνάνες που απαντώνται στο ελαιόλαδο είναι η πινορεσινόλη και η ακετοξυπινορεσινόλη. Οι λιγνάνες, εκτός της προστασίας του οργανισμού από παθήσεις που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, όπως η δημιουργία καρκινικών κυττάρων, έχει παρατηρηθεί ότι έχουν αντι-οιστρογονική δράση (Σκοπαράτζος, 2021).

Φλαβονοειδή

Ορισμένα φλαβονοειδή που έχουν παρατηρηθεί στο ελαιόλαδο, σε ίχνη, είναι η λουτεολίνη και η απιγενίνη. Λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, προστατεύουν από νόσους όπως η αθηροσκλήρωση ή η νόσος του Alzheimer. Επιπλέον, τα εν λόγω φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι συντελούν στην πρόληψη του γαστρικού καρκίνου (Σκοπαράτζος, 2021, Romani et. al., 2019).

3.3 Μηχανισμοί υποβάθμισης του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι ένα τρόφιμο που, λόγω δυσμενών εξωτερικών συνθηκών, όπως οι υψηλές θερμοκρασίες ή η υπεριώδης ακτινοβολία, υποβαθμίζεται ποιοτικά. Ο κύριος μηχανισμός που εκφράζει την εν λόγω υποβάθμιση είναι η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαίου. Η οξείδωση είναι μία συστοιχία αντιδράσεων, στα

προϊόντα της οποίας οφείλονται τα δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, όπως η περίεργη γεύση, η άσχημη οσμή, καθώς και η κακή ποιότητά του, λόγω της οποίας πολλές φορές καθίσταται ακατάλληλο για κατανάλωση. Οι πιθανοί τρόποι οξείδωσης του ελαίου είναι η αυτοοξείδωση, η φωτοοξείδωση και η ενζυμικά καταλυόμενη οξείδωση.

3.3.1 Αυτοοξείδωση

Ξεκινώντας από την αυτοοξείδωση, πρόκειται για ένα σύστημα αντιδράσεων, κατά τις οποίες παράγονται ελεύθερες ρίζες ως ενδιάμεσα προϊόντα. Τα στάδια της αυτοοξείδωσης των λιπαρών μπορούν να διαχωριστούν στο στάδιο της έναρξης, στο στάδιο της διάδοσης και στο στάδιο του τερματισμού:

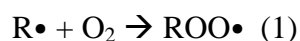
2 Έναρξη

Κατά την έναρξη, σχηματίζεται η ελεύθερη ρίζα ($R\cdot$) του λιπαρού οξέος (RH), με την απελευθέρωση του ατόμου υδρογόνου. Πέρα από τη ρίζα του οξέος, σχηματίζεται και ελεύθερη ρίζα υδρογόνου ($H\cdot$), ενώ το οξυγόνο δε συμμετέχει σε αυτό το στάδιο:



3 Διάδοση

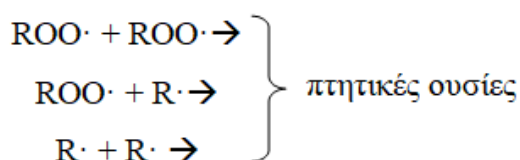
Κατά το στάδιο της διάδοσης, οι ελεύθερες ρίζες του οξέος που έχουν προκύψει ($R\cdot$) αντιδρούν με το οξυγόνο (O_2) παράγονται υπεροξειδικές ρίζες ($ROO\cdot$), ενώ τα εναπομείναντα λιπαρά οξέα (RH) αντιδρούν με τις ρίζες ($ROO\cdot$) προς παραγωγή υδροϋπεροξειδίων ($ROOH$):



Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αντίδραση (1) είναι ταχύτερη, ενώ η (2) ελέγχει το ρυθμό της οξείδωσης. Με την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών στο έλαιο, δεσμεύονται οι υπεροξειδικές ρίζες που παράγονται, με αποτέλεσμα η αντίδραση οξείδωσης να σταματήσει. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται ($R\cdot$) συμμετέχουν εκ νέου σε αντίδραση με το οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι μια συνεχόμενη αλυσιδωτή αντίδραση παραγωγής υπεροξειδικών ριζών.

4 Τερματισμός

Στο στάδιο του τερματισμού, οι ασταθείς υπεροξειδικές ρίζες που έχουν παραχθεί προηγουμένως ($\text{ROO}\cdot$) αντιδρούν μεταξύ τους, ή και με τις ελεύθερες ρίζες του λιπαρού ($\text{R}\cdot$), για την παραγωγή σταθεροποιημένων πτητικών ουσιών (αλδεϋδών, κετονών, αλκοολών κ.ά):



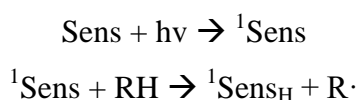
Οι εν λόγω ουσίες, ακόμα και αν βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στο ελαιόλαδο, γίνονται αντιληπτές, λόγω της δυσάρεστης γεύσης και οσμής που αποδίδουν στο τρόφιμο. Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι η ακεταλδεϋδη, το τετραϋδροφουράνιο, το κυκλοεξάνιο, το βουτυρικό οξύ και πολλά άλλα (Aparicio et. al., 2013; Gunstone, 2012).

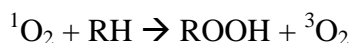
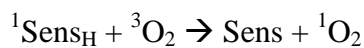
Στην αυτό-οξειδωση, παρατηρούνται 2 στάδια: το αργό στάδιο της επώασης, κατά το οποίο παράγονται τα υπεροξείδια και, στη συνέχεια, το γρήγορο στάδιο το οποίο οδηγεί και στα τελικά πτητικά προϊόντα.

3.3.2 Φωτοχημική οξείδωση

Συνεχίζοντας με την περίπτωση της φωτοχημικής οξείδωσης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί, χρειάζεται να υπάρχουν στο σύστημα οι ενεργοποιητές. Στην περίπτωση του ελαιολάδου, ως ενεργοποιητές ορίζονται οι χλωροφύλλες, κατά κύριο λόγο, αλλά και οι φαιοφυτίνες, ουσίες που ευθύνονται για το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα του τροφίμου.

Μία ουσία ενεργοποιητής (Sens), όταν έρθει σε επαφή με το φως, απορροφά ενέργεια ($h\nu$) και μεταβαίνει στη διεγερμένη του κατάσταση ($^1\text{Sens}$). Ο διεγερμένος ενεργοποιητής με τη σειρά του αντιδρά με το λιπαρό (RH), σχηματίζοντας ελεύθερη ρίζα ($\text{R}\cdot$), η οποία οξειδώνεται με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω:





Στη συνέχεια, ο διεγερμένος ενεργοποιητής αντιδρά με ${}^3\text{O}_2$, προκειμένου να επανέλθει στην αρχική κατάσταση, ενώ το προκύπτων ${}^1\text{O}_2$ (διεγερμένο οξυγόνο) αντιδρά ευκολότερα με το λιπαρό, σχηματίζοντας υδροϋπεροξειδίο (ROOH). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν παρατηρούνται διαχωρισμοί μεταξύ των σταδίων., ενώ οι αντιοξειδωτικές ουσίες δεν αναστέλλουν τη συγκεκριμένη αντίδραση. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένες ενώσεις, όπως η α-τοκοφερόλη ή το β-καροτένιο, που διακόπτουν τη φωτοχημική οξείδωση.

3.3.3 Μέτρηση έκτασης οξείδωσης

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η έκταση της οξείδωσης στο έλαιο, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Οι πιο χαρακτηριστικοί είναι: ο αριθμός υπεροξειδίων (PV), η κατανάλωση οξυγόνου, τα συζυγή διένια (K_{232}), ο αριθμός p-ανισιδίνης (p-AV) και η δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA).

Ξεκινώντας από τη μέτρηση του αριθμού των υπεροξειδίων (δείκτης PV), πρόκειται για μια τιτλοδοτική μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα, με τον αριθμό PV προσδιορίζονται τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης, δηλαδή οι υπεροξειδικές ενώσεις και ρίζες που παράγονται. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι προσδιορισμού του δείκτη PV, αλλά η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η ιωδομετρική. Πέρα από την ιωδομετρία, χρησιμοποιείται και μία φασματομετρική μέθοδος συνδυασμένη με τη μέτρηση της δυνατότητας αναγωγής του σιδήρου. Επιπλέον, μέσω της εύρεσης του καταναλωθέντος οξυγόνου, συνήθως χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία, υπολογίζεται η έκταση της αντίδρασης. Τέλος, ευρεία εφαρμογή βρίσκει και η μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες, δηλαδή η μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 232 nm, μέσω της οποίας βρίσκεται ο αριθμός των διενίων που υπάρχουν στο οξειδωμένο έλαιο.

Συνεχίζοντας, υπάρχουν διάφορες τεχνικές μέτρησης των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης, δηλαδή των προϊόντων του σταδίου του τερματισμού. Η πιο διαδεδομένη είναι ο δείκτης p-AV, δηλαδή ο αριθμός της p-Ανισιδίνης. Πιο συγκεκριμένα, ο δείκτης p-AV, πρακτικά, είναι φασματομετρική μέθοδος. Οι καρβονυλικές ουσίες του οξειδωμένου ελαίου, ουσιαστικά, αντιδρούν με την p-

ανισιδίνη, επομένως με τη μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος στα 350 nm, ποσοτικοποιούνται τα προϊόντα της οξείδωσης. Τέλος, μέσω της δοκιμής TBA στο διάλυμα, μετράται η μηλονική αλδεϋδη που έχει παραχθεί από την οξείδωση του λινολενικού και του λινελαϊκού οξέος του ελαίου (Aparicio et. al., 2013).

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Σχεδιασμός πειραμάτων – Στόχος

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ανάκτησης των βιοδραστικών ουσιών του δίκταμου μέσω της διεργασίας της εκχύλισης με δύο διαλύτες, χαμηλής (ακετόνη) και υψηλής πολικότητας (νερό) αντίστοιχα, και κατά πόσο αυτή επηρεάζεται από την πρότερη αφαίρεση του αιθερίου ελαίου μέσω υδροατμοαπόσταξης. Ειδικότερα, για τον διαλύτη χαμηλής πολικότητας, μελετήθηκε η κινητική που διέπει τη διεργασία της εκχύλισης. Τα χαμηλής πολικότητας εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν, ενσωματώθηκαν σε ελαιόλαδο, το οποίο υποβλήθηκε σε συνθήκες επιταχυνόμενης θερμικής και φωτοχημικής οξείδωσης. Εξετάστηκε κατά πόσο τα εκχυλίσματα δίκταμου μπορούν να παρεμποδίσουν την οξείδωση του λιπαρού υποστρώματος, εάν υπάρχουν ενδείξεις συνεργιστικών δράσεων για συγκεκριμένα συστατικά υψηλού ενδιαφέροντος και το ενδεχόμενο της δυνητικής αξιοποίησης εκχυλισμάτων δίκταμου ως αντιοξειδωτικά συστατικά σε φόρμουλες συμπληρωμάτων διατροφής και λειτουργικών τροφίμων δίκταμου.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του δίκταμου. Η εκχύλιση έγινε σε στήλη ημιδιαλείποντος έργου, σταθερής κλίνης, η οποία ήταν πακτωμένη με κονιοποιημένο και κοσκινισμένο υλικό (περίπου 20g), στο οποίο διαβιβαζόταν συνεχώς φρέσκος διαλύτης μέσω περισταλτικής αντλίας. Η πρώτη ύλη ήταν ήδη αποξηραμένη, ωστόσο προσδιορίστηκε η υπολειμματική υγρασία του δίκταμου, προκειμένου όλα τα μετέπειτα αποτελέσματα να είναι ανηγμένα σε ξηρή βάση. Ο λόγος που επιλέχθηκε για αυτό το πείραμα η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου με διαβίβαση οργανικού διαλύτη είναι γιατί πρόκειται για μια απλή μέθοδο, η οποία είναι γρήγορη και αρκετά οικονομική. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος,

προκειμένου να μην υποστούν καταστροφή οι βιοδραστικές ουσίες του φυτού. Τέλος, εφόσον μέσα στους στόχους της εργασίας ήταν η κινητική μελέτη της παραλαβής των βιοδραστικών συστατικών του δίκταμου, μέσω της εν λόγω διάταξης, κατέστη ευκολότερη η δειγματοληψία του εκχυλίσματος ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα.

Η εκχύλιση που εφαρμόστηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν διπλή και διαδοχική. Συγκεκριμένα, το δίκταμο υπέστη αρχικά εκχύλιση με ακετόνη. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, συλλέχθηκε το ακετονικό εκχύλισμα και, στο ίδιο στερεό υλικό, διαβιβάστηκε νερό και έγινε και η δεύτερη εκχύλιση με χρήση νερού. Επιλέχθηκε ακετόνη για την πρώτη εκχύλιση του φυτού, καθώς πρόκειται για έναν μη πολικό διαλύτη, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει από το δίκταμο όλα τα άπολα συστατικά του, όπως για παράδειγμα η καρβακρόλη και η θυμοκινόνη, καθώς επίσης χλωροφύλλες, λιπίδια, καροτενοειδή κλπ. Το «καθαρισμένο» δίκταμο υπέστη εκχύλιση με έναν πολικό πρωτικό διαλύτη, το νερό, ο οποίος είναι οικονομικός και φιλικός προς το περιβάλλον, ενώ δύναται να συμπαρασύρει τα πολικά βιοδραστικά συστατικά που περιέχει το φυτό, δηλαδή το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ κ. ά. Όσον αφορά το συνδυασμό αυτών των 2 διαλυτών, πρόκειται για πλήρως αναμίξιμους διαλύτες. Στην περίπτωση της διπλής διαδοχικής εκχύλισης του δίκταμου, κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο καθώς, κατά τη δεύτερη εκχύλιση, το νερό διαπερνά το διαβρεγμένο από ακετόνη δίκταμο. Εάν δεν αναμιγνύονταν μεταξύ τους, το νερό δεν θα μπορούσε να εκτοπίσει τον οργανικό διαλύτη και η εκχύλιση θα ήταν πολύ χαμηλής απόδοσης. Αυτό, πέρα από το ότι θα σήμαινε ότι δεν γίνεται να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση, θα επέφερε και πρόβλημα απότομης αύξησης της πίεσης στον εκχυλιστήρα, άρα και πιθανή αδυναμία ολοκλήρωσης της εκχύλισης.

Στα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του στερεού υπολείμματος, μέσω ξήρανσης. Μετρήθηκε το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο μέσω Folin – Ciocalteu και η αντιριζική τους ικανότητα, μέσω της μεθόδου DPPH. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στις μεθόδους Folin – Ciocalteu και DPPH, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στη διεθνή βιβλιογραφία. Για την εύρεση των συστατικών του κάθε εκχυλίσματος, εφαρμόστηκε ανάλυση HPLC.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υδρο-ατμοαπόσταξης στο δίκταμο, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της συγκεκριμένης θερμικής κατεργασίας του δίκταμου στην τελική συγκέντρωσή του σε βιοδραστικές ουσίες. Με αυτή τη διαδικασία παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο του δίκταμου. Για το χαρακτηρισμό του αιθερίου ελαίου, πραγματοποιήθηκε σε αυτό ανάλυση GC-MS.

Όσον αφορά το απειαιωμένο δίκταμο, συλλέχθηκε από τον αποστακτήρα, ξηράνθηκε σε φούρνο κυκλοφορίας αέρα, στους 40°C, κονιοποιήθηκε, και σε αυτό το υλικό πραγματοποιήθηκε διπλή εκχύλιση με ακετόνη και νερό. Στα εκχυλίσματα έγιναν αναλύσεις στερεού υπολείμματος, Folin – Ciocalteu, DPPH και HPLC, όπως και προηγουμένως. Αυτό έγινε με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ της πρώτης ύλης που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία και της ανεπεξέργαστης πρώτης ύλης.

Η διεργασία της απόσταξης για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου, όπως αναφέρθηκε έγινε με την τεχνική της υδρο-ατμοαπόσταξης. Στη συγκεκριμένη τεχνική, η παραγωγή του ατμού δεν γίνεται από ατμολέβητα, αλλά με θέρμανση ορισμένης ποσότητας νερού που βρίσκεται στον πυθμένα του αποστακτήρα. Μέρος του νερού μετατρέπεται σε ατμό και αφενός διαβρέχει το φυτό, το οποίο βρίσκεται σε διάτρητο πλέγμα πάνω από το θερμαινόμενο νερό, αφετέρου διαπερνά το φυτικό υλικό και συμπαρασύρει το αιθέριο έλαιο. Σημαντικό μέρος του νερού, συμπυκνώνεται στη φυτική μάζα, εκχυλίζει μερικώς τα υδατοδιαλυτά συστατικά και επιστρέφει στην κύρια μάζα του θερμαινόμενου νερού. Στο τέλος της απόσταξης το απομένον νερό είναι στην πραγματικότητα ένα αραιό εκχύλισμα μέρους των υδατοδιαλυτών συστατικών. Σε αυτό το υδατικό υπόλειμμα της απόσταξης που παρέμεινε στον αποστακτήρα έγιναν οι ίδιες αναλύσεις με προηγουμένως, καθώς έτσι σχηματίστηκε μια ευρύτερη εικόνα για τυχόν απώλειες βιοδραστικών ουσιών από το φυτό.

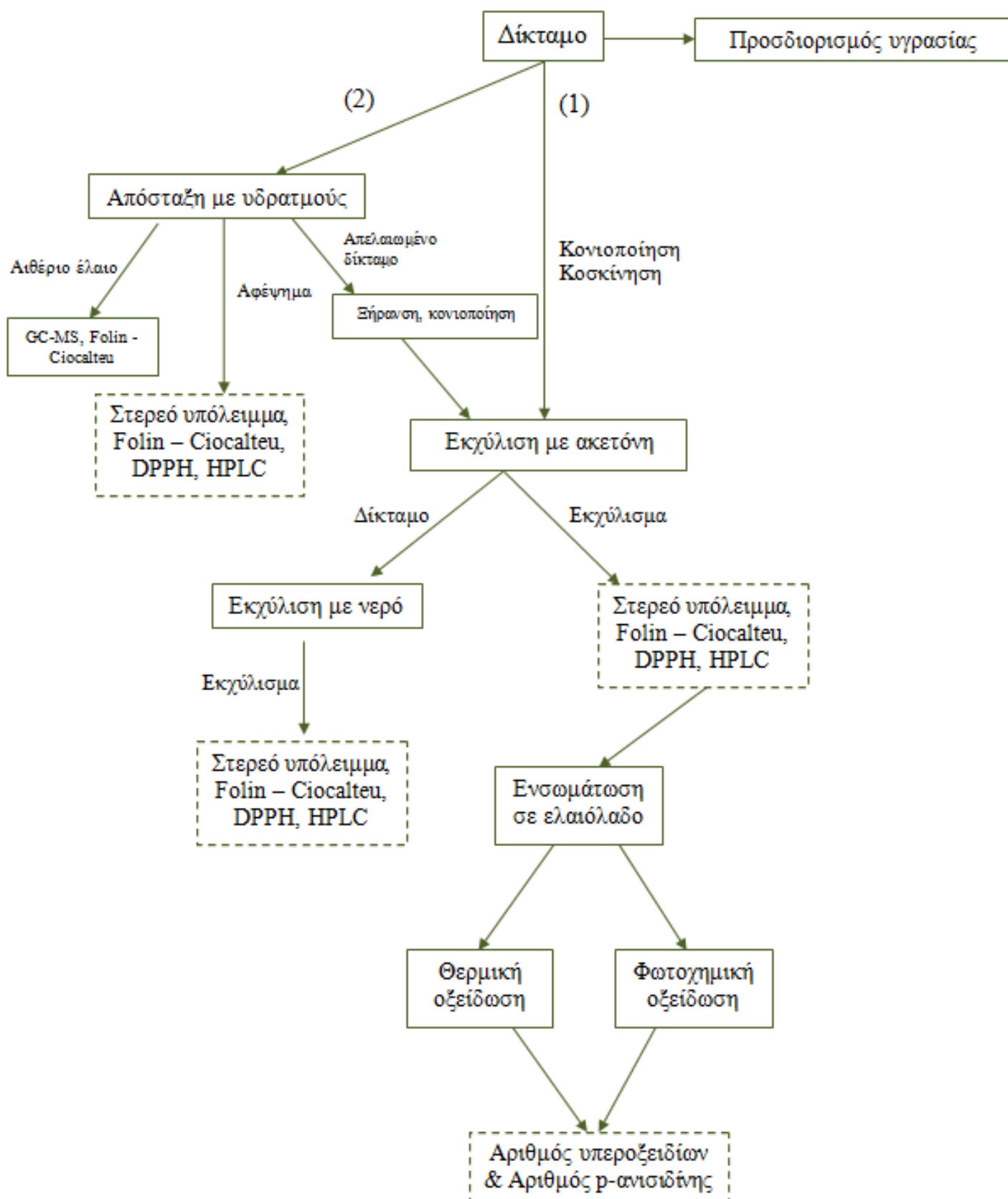
Όλα τα πειράματα εκχυλίσεων που παρουσιάστηκαν παραπάνω έγιναν εις διπλούν. Έγινε διπλό κινητικό πείραμα εκχύλισης με ακετόνη, τόσο στο απειαιωμένο δίκταμο όσο και στο μη. Η κινητική μελέτη των εκχυλίσεων αφορά κυρίως την εξέλιξη της παραλαβής των φαινολικών συστατικών, αλλά και τη συγκέντρωση ορισμένων βιοδραστικών ουσιών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα έπειτα από ανάλυση HPLC.

Όπως περιγράφηκε και στο θεωρητικό μέρος, ένα ιδιαίτερο συστατικό του δίκταμου αποτελεί η θυμοκινόνη καθώς αποτελεί μια ουσία που μπορεί να υπό συνθήκες να

μετασχηματιστεί στη μητρική της διφαινόλη (διυδροθυμοκινόνη), και να δράσει ως αντιοξειδωτικό. Συνεπώς, συμμετέχοντας σε οξειδοαναγωγικούς κύκλους, η θυμοκινόνη θα μπορούσε να αποτελέσει ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό για ένα λιπιδικό υπόστρωμα. Προκειμένου να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση της θυμοκινόνης, ως συστατικό του ακετονικού εκχυλίσματος δίκταμου σε ένα λιπιδικό φορέα, τα δύο εκχυλίσματα απειαιωμένου και μη δίκταμου ενσωματώθηκαν σε δείγματα ελαιολάδου.

Μέσω της μέτρησης του αριθμού υπεροξειδίων και του αριθμού της p-ανισιδίνης στα παραπάνω δείγματα, αποτυπώθηκε μία ξεκάθαρη εικόνα για την πορεία της οξείδωσης στο εκάστοτε λιπιδικό σύστημα, άρα και για την αντιοξειδωτική ικανότητά του.

Το διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 4.1 – Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.

4.2 Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια – Συσκευές

4.2.1 Πρώτες ύλες

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα ήταν αποξηραμένο δίκταμο. Η συγκομιδή του πραγματοποιήθηκε το 2022. Το δίκταμο παρελήφθη από τοπικό παραγωγό των Χανίων Κρήτης. Για την εξέταση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε παρθένο ελαιόλαδο από τον ίδιο παραγωγό.

4.2.2 Αντιδραστήρια

Όσον αφορά το μέρος της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύτες: η ακετόνη (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) και απιονισμένο νερό. Αναφορικά με την αντίδραση Folin – Ciocalteu, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany), απιονισμένο νερό και ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri), ενώ για την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς, ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε άνυδρο γαλλικό οξύ 98% w/w (Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey), το οποίο διαλύθηκε σε 10% vol αιθανόλη σε απιονισμένο νερό. Για την αντίδραση Folin – Ciocalteu στο αιθέριο έλαιο, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ισοπροπανόλη (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany). Στην αντίδραση DPPH, το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany), το οποίο διαλύθηκε σε μεθανόλη (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany). Στην καμπύλη αναφοράς του, ως πρότυπο αντιοξειδωτικό χρησιμοποιήθηκε το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany), διαλυμένο σε μεθανόλη. Στην ανάλυση HPLC χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC – MS, τα οποία ήταν οξινοσμένα με τριφθοροξικό οξύ (TFA) 0.2% w/w (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Επιπλέον, για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της θυμοκινόνης μέσω HPLC, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη θυμοκινόνη (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) και ακετόνη ως διαλύτης (Sigma- Aldrich, Steinheim,

Germany). Τέλος, για την ανάλυση GC-MS του αιθερίου ελαίου, χρησιμοποιήθηκε για αυτό ως διαλύτης εξάνιο (Fisher Chemical, Leicestershire, UK).

Για τη μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων στα πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών οξικού οξέος (CH_3COOH) και χλωροφορμίου (CHCl_3), σε αναλογία 3:2 (Fisher Chemical, Leicestershire, UK & Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Germany). Επίσης χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI) (Penta Chemicals, Prague, Czech Republic) σε απιονισμένο νερό. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε δείκτης αμύλου πατάτας (Lach-Ner, Neratovice, Czechia) 1% w/w σε απιονισμένο νερό και τιτλοδότης θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.01N (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Germany). Συνεχίζοντας με την εύρεση του αριθμού της p-ανισιδίνης, για την αραίωση του ελαιοδιαλύματος χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ισοοκτάνιο (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Επιπλέον, για τη δημιουργία διαλύματος ανισιδίνης, χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ (CH_3COOH).

4.2.3 Συσκευές

Όσον αφορά την προετοιμασία του δίκταμου για την εκχύλιση, χρησιμοποιήθηκε οικιακός πολυκόπτης για την κονιοποίηση, και κόσκινο 850 μm για την κοσκίνηση. Για την ξήρανση του απεσταγμένου φυτού, χρησιμοποιήθηκε φούρνος κυκλοφορίας αέρα. Για τις ζυγίσεις ακριβείας χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων (XT 220A, Precisa) (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 - Αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων.

Ξεκινώντας με τη διεργασία της εκχύλισης, έγινε σε ανοξείδωτη εκχυλιστική στήλη, η οποία είχε ύψος 9 cm και διάμετρο 3 cm. Η στήλη ήταν συνδεδεμένη μέσω λάστιχου σιλικόνης στο κάτω μέρος της με περισταλτική αντλία (Millipore, Bedford, Massachusetts), της οποίας το άλλο άκρο αντλούσε διαλύτη. Στο πάνω μέρος της στήλης υπήρχε μικρός σωλήνας για τη συλλογή του εκχυλίσματος, το οποίο κατέληγε σε ογκομετρικό κύλινδρο (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 - Εκχυλιστήρας ημιδιαλείποντος έργου.

Αναφορικά με την απόσταξη με υδρατμούς, χρησιμοποιήθηκε αποστακτήρας εργαστηριακής κλίμακας. Η διάταξη αποτελούνταν από χάλκινο καζάνι, το οποίο είχε χωρητικότητα 17 λίτρων. Το καζάνι περιείχε εσωτερική αντίσταση, η οποία θέρμαινε το νερό. Μέσα στο καζάνι, επίσης, υπήρχε μεταλλική διάτρητη επιφάνεια, πάνω στην οποία τοποθετήθηκε το φυτό που υπέστη απόσταξη. Οι υδρατμοί που παράγονταν στο καζάνι, οι οποίοι συμπαρέσυραν το αιθέριο έλαιο, κατέληγαν σε δεύτερο δοχείο,

το οποίο λειτουργούσε ως ψυκτήρας, και ύστερα σε βαθμονομημένη στήλη (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3 - Συσκευή υδρο-ατμοαπόσταξης.

Για την ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων του δίκταμου σε ελαιόλαδο, χρησιμοποιήθηκε αρχικά μαγνητικός αναδευτήρας και, στη συνέχεια, περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Heidolph G1, Germany) (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4 - Περιστροφικός εξατμιστήρας.

Συνεχίζοντας με τα πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης, στη θερμική οξείδωση, χρησιμοποιήθηκε φούρνος αέρα (Binder), ενώ στη φωτοχημική, χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβόληση των δειγμάτων ήταν συστοιχία 2 λαμπών υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους 365 nm, τάσης 230 Volt και ισχύος 24 W (LTF – Labortechnik, Wasserburg, Germany).

Προχωρώντας στις συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Precision Liquid Chromatography – HPLC). Η διάταξη αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλυσης, HP 1100 και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων (Diode Array Detector – DAD) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), συνδεδεμένα με στήλη Hypersil C₁₈ column ODS 5μm, 250x 4.6mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany) (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5 - Συσκευή ανάλυσης HPLC.

Στη συνέχεια, για την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του δίκταμου, χρησιμοποιήθηκε συσκευή αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή μάζας (Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC – MS). Πρόκειται για ένα σύστημα GC HP 6890 συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας HP 5973 (Hewlett – Packard, Palo Alto, California, USA). Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου διαχωρίστηκαν μέσω στήλης MS HP – 5 (30m x 320 μm x 0.25 μm, Hewlett – Packard, Palo Alto, California, USA).

Στις μεθόδους Folin – Ciocalteu και DPPH, οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο αναδευτήρας vortex (Zx³, Velp) και το φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Hitachi U29000 (Εικόνα 4.6). Το φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιήθηκε και στη μέτρηση του αριθμού p-ανισιδίνης.



Εικόνα 4.6 - Φασματοφωτόμετρο Hitachi.

4.3 Πειραματική διαδικασία

4.3.1 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

Ξεκινώντας με την εκχύλιση του δίκταμου το οποίο δεν έχει υποστεί απόσταξη, ποσότητα περίπου ίση με 20 g αλέστηκε σε οικιακό πολυκόφτη. Το αλεσμένο δίκταμο πέρασε από κόσκινο 850 μm , ώστε να μείνει στο τέλος μία λεπτόκοκκη σκόνη που θα μπει στον εκχυλιστήρα. Ο λόγος που έγινε αυτό είναι για να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής του στερεού, άρα και να γίνει ευκολότερη η εκχύλιση των συστατικών του. Στην περίπτωση της εκχύλισης του απεσταγμένου δίκταμου, από την άλλη, στη στήλη τοποθετήθηκε μικρότερη ποσότητα φυτού (της τάξης των 15g). Αυτή η διαφοροποίηση ως προς την πρώτη ύλη οφείλεται στην πρότερη αφαίρεση του αιθερίου ελαίου από το φυτό, γεγονός που οδήγησε στη διόγκωση των κόκκων του.

Μετά την προετοιμασία του υλικού, το δίκταμο τοποθετήθηκε στην εκχυλιστική στήλη, στην οποία και πακτώθηκε. Στο άνω και κάτω άκρο της στήλης τοποθετήθηκε βαμβάκι, το οποίο λειτούργησε σαν φίλτρο για το υλικό. Στη συνέχεια, ο κάτω σωλήνας της στήλης συνδέθηκε με την περισταλτική αντλία, η οποία με τη σειρά της αντλούσε ακετόνη από το άλλο άκρο και τη διοχέτευε στον εκχυλιστήρα.

Η χρονομέτρηση της εκχύλισης ξεκίνησε μόλις παραλήφθηκε η πρώτη σταγόνα εκχυλίσματος. Το εκχύλισμα είχε έντονο πράσινο χρώμα στην αρχή ενώ, στο τέλος της εκχύλισης, το εξερχόμενο από τη φύσιγγα υγρό είχε αποχρωματιστεί πλήρως. Ο

αποχρωματισμός, αποτέλεσε μια ποιοτική ένδειξη για την ολοκλήρωση της εκχύλισης, καθώς αποκαλύπτει ότι έχει εκχυλιστεί το μεγαλύτερο μέρος των συστατικών του φυτού. Στην περίπτωση της κινητικής μελέτης της εκχύλισης, ανά τακτά και προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγμα εκχυλίσματος, όγκου 1 mL, από την εκροή του εκχυλιστήρα, σε σωλήνες Eppendorf (Εικόνα 4.7). Συγκεκριμένα, οι χρόνοι στους οποίους λαμβανόταν δείγμα από το εκχύλιμα ήταν: 0, 1.5, 3, 5, 9, 15, 25 και 30 min.



Εικόνα 4.7 - Εκχύλιμα ακετόνης από την αρχή μέχρι το τέλος της εκχύλισης.

Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το ακετονικό εκχύλιμα από τη στήλη, ενώ η περισταλτική αντλία συνδέθηκε με νερό, προκειμένου να διοχετευθεί στη στήλη. Η εκχύλιση με νερό είχε την ίδια πορεία με προηγουμένως, ενώ έλαβε τέλος όταν επήλθε αποχρωματισμός του εκχυλίσματος (Εικόνα 4.8). Τα πειράματα εκχύλισεων έγιναν εις διπλούν. Τα ακετονικά εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο, ενώ τα υδατικά στην κατάψυξη.

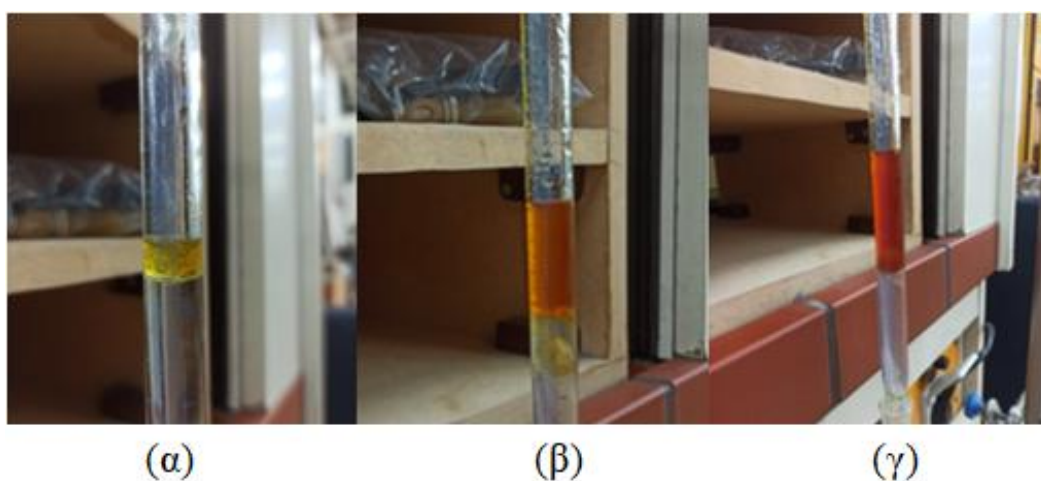


Εικόνα 4.8 - Εκχύλιμα νερού από την αρχή μέχρι το τέλος της εκχύλισης.

4.3.2 Απόσταξη με υδρατμούς

Για την απομάκρυνση του αιθερίου ελαίου του δίκταμου μέσω υδρο-ατμοαπόσταξης, το φυτό δεν υπέστη προεπεξεργασία. Τοποθετήθηκαν στον αποστακτήρα 4L απιονισμένου νερού. Πάνω από το νερό τοποθετήθηκε μεταλλικό πλέγμα, το οποίο το διαχώριζε από το φυτό. Πάνω στο πλέγμα τοποθετήθηκαν 321g δίκταμου, σχετικά αραιά, προκειμένου να διέρχεται με ευκολία ο παραγόμενος ατμός. Μέσω της εσωτερικής αντίστασης της διάταξης, άρχισε να θερμαίνεται το νερό και οι ατμοί ξεκίνησαν να συμπαρασύρουν τα πτητικά συστατικά του φυτού. Η μέση ροή των υδρατμών ήταν ίση με 5.4 mL/min.

Στη συνέχεια, το απόσταγμα, το οποίο περιλάμβανε το αιθέριο έλαιο και ανθόνερο, συμπυκνωνόταν και κατέληγε σε βαθμονομημένη στήλη, στην οποία και διαχωρίζονταν λόγω διαφοράς βάρους. Το έλαιο, στα πρώτα στάδια της παραλαβής του, είχε ένα ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα, το οποίο σκούραινε με την πάροδο του χρόνου, δηλαδή όσο αυξανόταν η εκχύλιση της καρβακρόλης από το φυτό. Η εν λόγω οπτική αλλαγή απεικονίζεται στην Εικόνα 4.9. Ο ρυθμός παραλαβής του αιθερίου ελαίου ήταν 0.07 mL/min. Η διεργασία της παραλαβής αιθερίου ελαίου διακόπηκε όταν παρατηρήθηκε οπτικά σταθεροποίηση του όγκου του αιθερίου ελαίου. Η διεργασία διήρκεσε 2 h.



Εικόνα 4.9 - Αιθέριο έλαιο (α) στην αρχή (β) στην πάροδο και (γ) στο τέλος της απόσταξης.

4.3.3 Ενσωμάτωση εκχυλισμάτων σε ελαιόλαδο

Για τη διενέργεια των πειραμάτων επιταχυνόμενης οξείδωσης, κατασκευάστηκαν ελαιοδιαλύματα εμπλουτισμένα με τα βιοδραστικά συστατικά των ακετονικών εκχυλισμάτων.

Αρχικά, κατασκευάστηκε το δείγμα μάρτυρα (C) ως εξής: Ζυγίστηκαν 250g καθαρού ελαιολάδου. Ογκομετρήθηκαν 45mL ακετόνης, τα οποία προστέθηκαν στο ελαιόλαδο. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε μέσω μαγνητικού αναδευτήρα και, στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 40 °C, έτσι ώστε να εξατμιστεί πλήρως η ακετόνη.

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε διάλυμα καθαρής θυμοκινόνης σε ακετόνη συγκέντρωσης 50 ppm (t50): 125 mg θυμοκινόνης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με ακετόνη. Από αυτό το συγκεκριμένο stock διάλυμα, ογκομετρήθηκαν 10mL και ενσωματώθηκαν σε 250g ελαιολάδου, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. Έτσι, προέκυψε ελαιοδιάλυμα με καθαρή θυμοκινόνη 50 ppm (AC_{t50}).

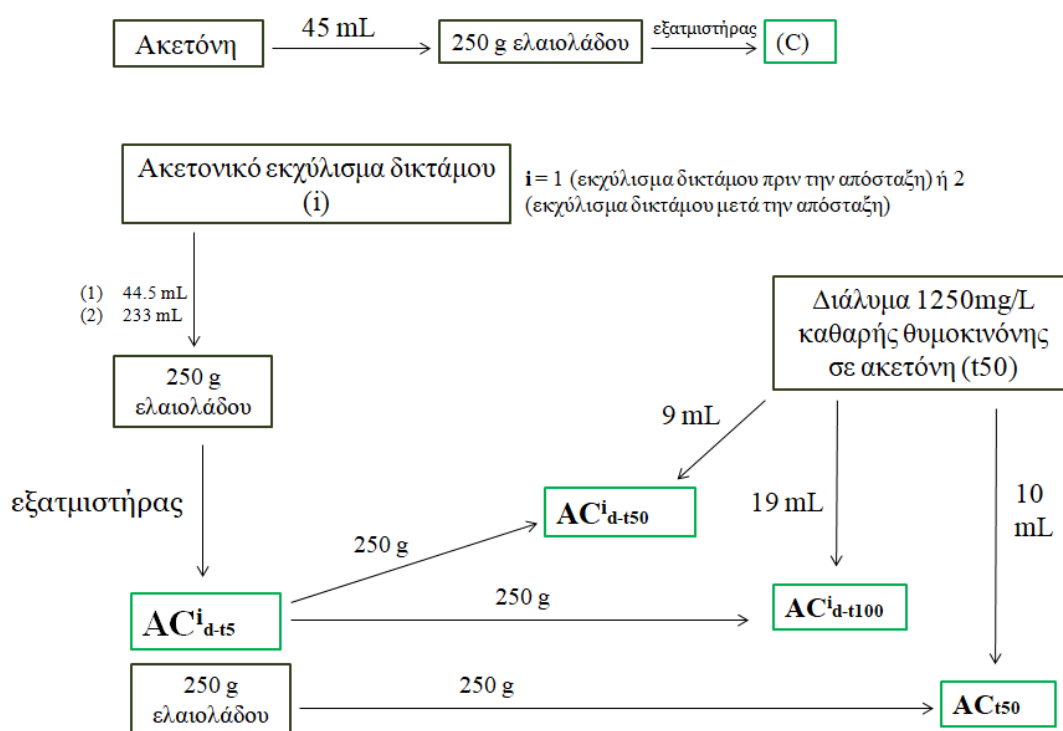
Τα επόμενα ελαιοδιαλύματα που κατασκευάστηκαν είναι αυτά με συγκέντρωση θυμοκινόνης 5 ppm, χρησιμοποιώντας ακετονικό εκχύλισμα μη απεσταγμένου (AC¹_{d-15}) και απεσταγμένου (AC²_{d-15}) δίκταμου. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- Για το AC¹_{d-15}: Ενσωματώθηκαν 44.5 mL ακετονικού εκχυλίσματος μη απεσταγμένου δίκταμου (περιεκτικότητας σε ολικά στερεά 4.6 g/L, και σε θυμοκινόνη 84 mg/L) σε 750 g καθαρού ελαιολάδου. Η ακετόνη απομακρύνθηκε με τον περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, οπότε επιτεύχθηκε συγκέντρωση ολικών στερεών ακετονικού εκχυλίσματος δίκταμου 273.5 ppm, εκ των οποίων 5 ppm θυμοκινόνης.
- Για το AC²_{d-15}: Ενσωματώθηκαν 233 mL ακετονικού εκχυλίσματος απεσταγμένου δίκταμου (περιεκτικότητας σε ολικά στερεά 3.1 g/L, και σε θυμοκινόνη 16.1 mg/L) σε 750 g καθαρού ελαιολάδου. Η ακετόνη απομακρύνθηκε με τον περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, οπότε επιτεύχθηκε συγκέντρωση ολικών στερεών ακετονικού εκχυλίσματος δίκταμου 963 ppm, εκ των οποίων 5 ppm

θυμοκινόνης. Στη συνέχεια, με βάση τα ελαιοδιαλύματα συγκέντρωσης θυμοκινόνης 5 ppm (AC^i_{d-t5}), καθώς και το πρότυπο διάλυμα θυμοκινόνης (t50), προέκυψαν ελαιοδιαλύματα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 50 ppm (AC^i_{d-t50}) και 100 ppm (AC^i_{d-t100}) με τον ακόλουθο τρόπο:

- Για το AC^1_{d-t50} : Ενσωματώθηκαν 9 mL από το διάλυμα t50 σε 250g διαλύματος AC^1_{d-t5} , και η ακετόνη απομακρύνθηκε μέσω του εξατμιστήρα.
- Για το AC^2_{d-t50} : Ενσωματώθηκαν 9 mL από το διάλυμα t50 σε 250g διαλύματος AC^2_{d-t5} , και η ακετόνη απομακρύνθηκε μέσω του εξατμιστήρα.
- Για το AC^1_{d-t100} : Ενσωματώθηκαν 19 mL από το διάλυμα t50 σε 250g διαλύματος AC^1_{d-t5} , και η ακετόνη απομακρύνθηκε μέσω του εξατμιστήρα.
- Για το AC^2_{d-t100} : Ενσωματώθηκαν 19 mL από το διάλυμα t50 σε 250g διαλύματος AC^2_{d-t5} , και η ακετόνη απομακρύνθηκε μέσω του εξατμιστήρα.

Η διαδικασία απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα ροής:



Διάγραμμα 4.2 - Διάγραμμα ροής της διαδικασίας παρασκευής ελαιοδιαλυμάτων με εκχυλίσματα ακετόνης.

4.3.4 Θερμική & Φωτοχημική οξείδωση

Τα ελαιοδιαλύματα που κατασκευάστηκαν προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης. Για το πείραμα της θερμικής οξείδωσης, σε γυάλινα φιαλίδια τοποθετήθηκαν 12 δείγματα των 8 γραμμαρίων από το κάθε ελαιοδιάλυμα (C, AC_{t50}, ACⁱ_{d-t5}, ACⁱ_{d-t50}, ACⁱ_{d-t100}) σε φούρνο Binder σε θερμοκρασία 70 °C, ενώ λαμβανόταν δείγμα από το κάθε ελαιοδιάλυμα ανά μία ή και περισσότερες ημέρες.

Για το πείραμα της φωτοχημικής οξείδωσης, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία. Χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα των 8g από τα διαλύματα C, AC_{t50} και AC¹_{d-t5}, 12 δείγματα των 10g από τα AC²_{d-t5}, AC²_{d-t50} και AC²_{d-t100} και 5 δείγματα των 10g από τα AC¹_{d-t50} και AC¹_{d-t100}. Τα ανωτέρω δείγματα τοποθετήθηκαν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας, από την οποία η δειγματοληψία γινόταν σε διάστημα ωρών.

4.4 Αναλυτικές μέθοδοι

4.4.1 Μέτρηση υγρασίας δείγματος

Για τη μέτρηση της υπολειμματικής υγρασίας του δίκταμου, σε 2 ποτήρια ζέσεως τοποθετήθηκαν από 5 g δίκταμου, με ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό. Τα δείγματα μπήκαν σε φούρνο στους 100 °C για 24 ώρες και, την επόμενη μέρα, ζυγίστηκε το τελικό μικτό βάρος τους χωρίς την υγρασία.

4.4.2 Μέτρηση στερεού υπολείμματος εκχυλίσματος

Λήφθηκαν 7 mL από το κάθε εκχύλισμα με το αντίστοιχο σιφώνιο πλήρωσης, τα οποία τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα πλαστικά φιαλίδια (βλ. Εικόνα 4.10). Τα δείγματα του υδατικού εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν κατευθείαν στο φούρνο των 100 °C, ενώ στα δείγματα του ακετονικού εκχυλίσματος διαβιβάστηκε πρώτα ζεστός αέρας, για να εξατμιστεί μεγάλο μέρος του διαλύτη, και, ύστερα, μπήκαν στο φούρνο.

Την επόμενη μέρα, ζυγίστηκαν τα φιαλίδια και, μέσω της διαφοράς βάρους, υπολογίστηκαν τα περιεχόμενα στερεά σε κάθε δείγμα.



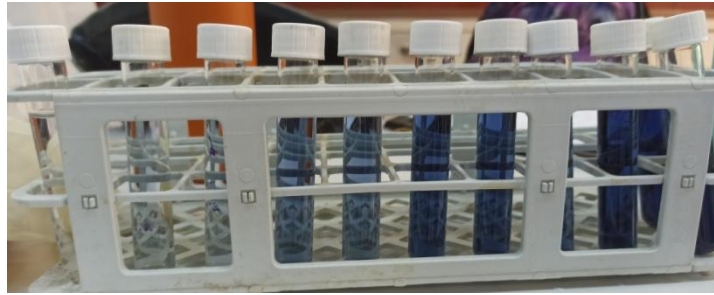
Εικόνα 4.10 - Φιαλίδια μέτρησης στερεού υπολείμματος.

4.4.3 Εύρεση ολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω Folin – Ciocalteu

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu είναι μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου σε ένα υλικό. Πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική τεχνική, η οποία βασίζεται στην αντίδραση οξείδωσης μεταξύ των φαινολικών ουσιών και, πιο συγκεκριμένα των υδροξυλομάδων (-OH) τους, και του αντιδραστήριου Folin. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο είναι ένα μίγμα φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος, η δομή των οποίων είναι η εξής:



Σε αλκαλικό περιβάλλον, το αντιδραστήριο ανάγεται σε οξείδιο του μολυβδενίου και του βολφραμίου, δηλαδή μόρια, τα οποία έχουν έντονο μπλε χρώμα (Εικόνα 4.11). Το δείγμα φωτομετρείται στα 765 nm.



Εικόνα 4.11 - Δείγματα της αντίδρασης Folin - Ciocalteu. Δείγματα χωρίς (αριστερά) και με (δεξιά) φαινολικό περιεχόμενο.

Αρχικά, παρασκευάστηκε κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3), το οποίο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία αλκαλικού περιβάλλοντος, διαλύοντας 200g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 800 mL νερού. Το διάλυμα θερμάνθηκε και τοποθετήθηκε στο ψυγείο για μία μέρα. Την επόμενη μέρα, το προκύπτον διάλυμα διηθήθηκε, ενώ το διήθημα χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, που θα συσχετίζει την απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm με τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη φαινόλη το γαλλικό οξύ. Ζυγίστηκαν 0.1025g άνυδρου γαλλικού οξέος, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Προστέθηκαν 10 mL οιοπνεύματος, το μίγμα ανακινήθηκε μέχρι πλήρους διάλυσης του γαλλικού οξέος και στη συνέχεια προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή, δημιουργώντας έτσι διάλυμα συγκέντρωσης 1025 ppm (C) (Διάλυμα 1). Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την κατασκευή των αραιώσεων με συγκεντρώσεις 0.7C (Διάλυμα 2), 0.5C (Διάλυμα 3), 0.3C (Διάλυμα 4) και 0.1C (Διάλυμα 5), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Αφού δημιουργήθηκαν οι απαραίτητες αραιώσεις, προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 7.9 mL απιονισμένου νερού με σιφώνιο μέτρησης των 10 mL, 100 μL από το Διάλυμα 1 με αυτόματη πιπέτα των 200 μL και 500 μL αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu με αυτόματη πιπέτα των 1000 μL . Ο σωλήνας τέθηκε υπό ανάδευση σε Vortex, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 1.5 mL διαλύματος Na_2CO_3 . Ο σωλήνας επανατέθηκε υπό ανάδευση. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το Διάλυμα 1, ενώ έγινε και για τα Διαλύματα 2-5, προσθέτοντας κάθε φορά 100 μL από το διάλυμα με την αντίστοιχη αραιώση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος

για 2 h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ μετά μετρήθηκε η απορρόφησή τους σε φασματοφωτόμετρο στα 765 nm.

Για την εύρεση του φαινολικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αραιώσεις που έγιναν για το κάθε εκχύλισμα:

Πίνακας 4.1 - Αραιώσεις για την αντίδραση Folin - Ciocalteu.

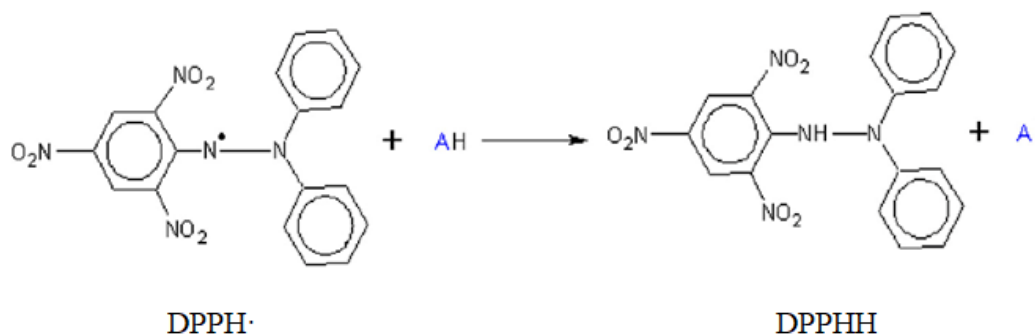
Διάλυμα	Εκχύλισμα	Συνθήκη	Αραίωση
6	Ακετόνης	Πριν την απόσταξη	1:1
7	Νερού	Πριν την απόσταξη	1:10
8	Ακετόνης	Μετά την απόσταξη	1:1
9	Νερού	Μετά την απόσταξη	1:25
10	Ακετόνης	Πριν την απόσταξη, κινητική μελέτη	1:5 και 1:10
11	Νερού	Πριν την απόσταξη, κινητική μελέτη	1:50 και 1:100
12	Ακετόνης	Μετά την απόσταξη, κινητική μελέτη	1:1 και 1:5
13	Νερού	Μετά την απόσταξη, κινητική μελέτη	1:10 και 1:20

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 7.9 mL απιονισμένου νερού, 100 μ L από το εκάστοτε διάλυμα (6-13) και 500 μ L αντιδραστηρίου Folin και ο σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex. Έπειτα, προστέθηκε σε αυτόν 1.5 mL διαλύματος Na_2CO_3 και αναδεύτηκε ξανά. Ο σωλήνας τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 2 h, μετά από τις οποίες φωτομετρήθηκε στα 765 nm. Η διαδικασία έγινε εις διπλούν για το κάθε εκχύλισμα. Όσον αφορά τα δείγματα από την κινητική μελέτη του κάθε εκχυλίσματος, η κάθε αραιώση για την αντίδραση Folin – Ciocalteu πραγματοποιούνταν λαμβάνοντας δείγμα από το κάθε σωληνάκι Eppendorf για όλους τους χρόνους στους οποίους έγινε δειγματοληψία.

Για τη μέτρηση των φαινολικών του αιθερίου ελαίου, δημιουργήθηκε ένα διάλυμα αιθερίου ελαίου 1530 ppm, ζυγίζοντας 153 mg ελαίου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με ισοπροπανόλη, ενώ για την αντίδραση Folin – Ciocalteu, δε χρησιμοποιήθηκε αραιώση του διαλύματος.

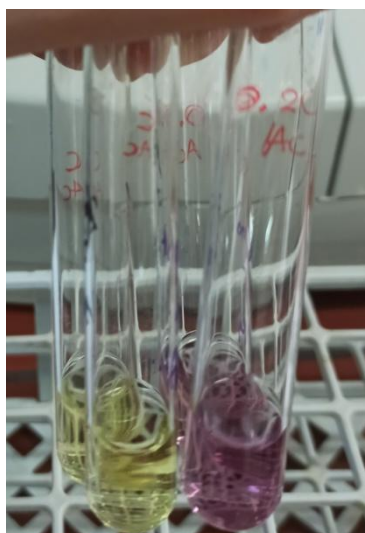
4.4.4 Εύρεση αντιριζικής ικανότητας μέσω DPPH

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, από τη σκοπιά της δέσμευσης ελευθέρων ριζών, μετρήθηκε μέσω της μεθόδου DPPH. Συγκεκριμένα, το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) είναι μία σταθερή ρίζα αζώτου, η οποία χρησιμοποιείται από το 1958 για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης ορισμένων ουσιών. Πιο αναλυτικά, θεωρείται σταθερή ρίζα λόγω του ελεύθερου ηλεκτρονίου που διαθέτει στο μόριό της, το οποίο μπορεί να μετακινείται σε αυτό χωρίς να διμερίζεται. Το μόριο DPPH, όταν βρεθεί μαζί με μια ένωση με αντιοξειδωτικό χαρακτήρα (AH), δηλαδή μια ουσία που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, ανάγεται και δημιουργείται μία ελεύθερη ρίζα A[•] (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12 - Δράση της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Η αλλαγή αυτή γίνεται αντιληπτή οπτικά. Η ελεύθερη ρίζα DPPH εμφανίζει ένα ιώδες χρώμα, ενώ η ανηγμένη της μορφή έχει ένα χαρακτηριστικό ανοιχτό κίτρινο χρώμα (Εικόνα 4.13). Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτή η μέθοδος για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων είναι γιατί προσομοιάζει τις υπεροξειδικές ρίζες που δημιουργούνται σε ένα οξειδούμενο λιπιδικό σύστημα, και οι οποίες αποτελούν τις ρίζες-στόχους των αντιοξειδωτικών ουσιών.



Εικόνα 4.13 - (αριστερά) Διάλυμα με πλήρως ανηγμένη τη ρίζα DPPH, (δεξιά) διάλυμα με τη ρίζα στην ελεύθερή της μορφή.

Για το παρόν πείραμα, κατασκευάστηκε διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 25 ppm, ζυγίζοντας 0.0025 g άνυδρης σκόνης DPPH, η οποία τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία προστέθηκε μεθανόλη (CH_3OH) έως τη χαραγή, ενώ ακολούθησε έντονη ανάδευση (Διάλυμα 1). Το πρότυπο διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την καμπύλη αναφοράς ήταν διάλυμα Trolox 204 ppm (C) σε μεθανόλη. Ζυγίστηκαν 0.0204 g σκόνης Trolox, η οποία τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία προστέθηκε μεθανόλη έως τη χαραγή, και ακολούθησε ανάδευση (Διάλυμα 2). Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την κατασκευή των αραιώσεων με συγκεντρώσεις 0.7C (Διάλυμα 3), 0.5C (Διάλυμα 4), 0.3C (Διάλυμα 5) και 0.1C (Διάλυμα 6), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Αφού δημιουργήθηκαν οι παραπάνω αραιώσεις, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3.9 mL διαλύματος DPPH (Διάλυμα 1) και 100 μL από το διάλυμα Trolox (Διάλυμα 2). Ο δοκιμαστικός σωλήνας τέθηκε υπό ανάδευση σε Vortex και τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min. Αντίστοιχα, η ανωτέρω διαδικασία επαναλήφθηκε, προσθέτοντας κάθε φορά σε δοκιμαστικό σωλήνα 3.9 mL από το Διάλυμα 1 και 100 μL από τα Διαλύματα 3-6 αντίστοιχα. Κατασκευάστηκε και το τυφλό δείγμα, στο οποίο προστίθενται 3.9 mL Διαλύματος 1 και 100 μL καθαρής μεθανόλης.

Μετρήθηκε η απορρόφησή τους σε φασματοφωτόμετρο στα 515 nm, καθώς εκεί έχει μέγιστη απορρόφηση η ελεύθερη ρίζα DPPH. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με καθαρή μεθανόλη, ενώ στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση του τυφλού δείγματος που κατασκευάστηκε. Έπειτα, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων με τις εκάστοτε αραιώσεις, ενώ το τελικό αποτέλεσμα εκφράστηκε ως η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του τυφλού και της απορρόφησης του κάθε δείγματος.

Για την εύρεση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα εκχυλίσματα, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αραιώσεις που έγιναν για το κάθε εκχύλισμα:

Πίνακας 4.2 - Αραιώσεις για την αντίδραση DPPH.

Διάλυμα	Εκχύλισμα	Συνθήκη	Αραίωση
7	Ακετόνης	Πριν την απόσταξη	1:5
8	Νερού	Πριν την απόσταξη	1:50 και 1:100
9	Ακετόνης	Μετά την απόσταξη	1:5
10	Νερού	Μετά την απόσταξη	1:100

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3.9 mL διαλύματος DPPH (Διάλυμα 1) και 100 μ L από το κάθε διάλυμα (7-10), και ο σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex. Μετά από 30 min παραμονής του σωλήνα σε σκοτεινό μέρος, φωτομετρήθηκε στα 515 nm. Η διαδικασία έγινε εις διπλούν για το κάθε εκχύλισμα.

4.4.5 Ανάλυση HPLC στα εκχυλίσματα

Η εύρεση των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα ακετόνης και νερού έγινε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, σύμφωνα με τις μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί στο EXTT. Τα δείγματα ενσωματώθηκαν μετά τη διήθηση (0.45 μ m, φίλτρα σύριγγας PVDF, Teknokroma, Βαρκελώνη, Ισπανία) σε μία στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil C18 (ODS 5 μ m, 250 \times 4.6 mm, AZ Analysentechnik, Mainz, Germany).

Ως όγκος έγχυσης (injection volume) ορίστηκαν τα 20 μ L. Η ροή του διαλύτη στη στήλη ήταν ίση με 1 mL/min. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη

ανάλυση ήταν: Νερό ποιότητας HPLC οξιμισμένο 0.2% με TFA (Διαλύτης A), μεθανόλη ποιότητας HPLC οξιμισμένη 0.2% με TFA (Διαλύτης B) και ακετονιτρίλιο ποιότητας HPLC οξιμισμένο 0.2% με TFA (Διαλύτης C). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται καθαρή βουτανόλη για τον καθαρισμό της στήλης έπειτα από κάθε έγχυση (Διαλύτης D). η αρχική σύσταση των διαλυτών ήταν 90% A, 6% B και 4% C. Στα εκχυλίσματα ακετόνης εντοπίστηκαν ως κύριες κορυφές η καρβακρόλη, η οποία ποσοτικοποιήθηκε μέσω υπάρχουσας καμπύλης αναφοράς στα 280 nm, και η θυμοκινόνη, για την οποία κατασκευάστηκε εκ νέου καμπύλη αναφοράς στα 257 nm. Τα καροτενοειδή προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης στα 445 nm.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της θυμοκινόνης, αρχικά δημιουργήθηκε πρότυπο διάλυμα θυμοκινόνης 270 ppm (συγκέντρωσης C). Ζυγίστηκαν 27 mg καθαρής θυμοκινόνης, τα οποία προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία μετά προστέθηκε ακετόνη μέχρι τη χαραγή. Ύστερα, το διάλυμα αναφοράς αναδεύτηκε έντονα.

Συνεχίζοντας με τα εκχυλίσματα του νερού, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος χωρίς το στάδιο της πλύσης της στήλης με 1-βουτανόλη. Η ανάλυση έγινε με καταγραφή στα 280, 320, 360 nm, ενώ οι διαλύτες ήταν ίδιοι με προηγουμένως, δηλαδή νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο στην ίδια αναλογία. Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων που εντοπίστηκαν σε αυτή την περίπτωση, έγινε μέσω υπαρχουσών καμπυλών αναφοράς.

4.4.6 Ανάλυση GC-MS στο αιθέριο έλαιο

Για την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας στο αιθέριο έλαιο, χρησιμοποιήθηκε σύστημα GC HP 6890 συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας HP 5973 (Hewlett – Packard, Palo Alto, California, USA). Τα συστατικά του αιθερίου ελαίου διαχωρίστηκαν μέσω στήλης MS HP – 5 (30m x 320 μm x 0.25 μm, Hewlett – Packard, Palo Alto, California, USA). Το διάλυμα που τοποθετήθηκε στην GC – MS ήταν αιθέριο έλαιο δίκταμου διαλυμένο σε εξάνιο 200 ppm , το οποίο έγινε βάζοντας 2 μL αιθερίου ελαίου, μέσω αυτόματης πιπέτας των 10 μL, σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώνοντάς το με εξάνιο μέχρι τη χαραγή. Ως φέρον αέριο στη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ήλιο, με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα

που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: Η αρχική θερμοκρασία ήταν 50 °C. Ύστερα, με ρυθμό 10 °C/min, η θερμοκρασία στο φούρνο ανέβηκε στους 110 °C. Έπειτα, με ρυθμό 15 °C/min, η θερμοκρασία έφτασε τους 220 °C, όπου και παρέμεινε για 7 min. Οι ουσίες που εντοπίστηκαν στο διάλυμα ταυτοποιήθηκαν μέσω δεδομένων από τη βιβλιοθήκη φασμάτων του συστήματος. Η συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση:

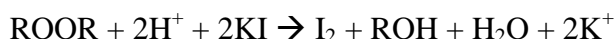
$$C_i = \frac{E_i}{\sum E_i}$$

όπου E_i το εμβαδό της κάθε κορυφής.

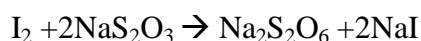
4.4.7 Μέτρηση αριθμού υπεροξειδίων στα ελαιοδιαλύματα

Αναφορικά με τη μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης των ελαιοδιαλυμάτων, με τη μέτρηση του αριθμού των υπεροξειδίων (δείκτης PV), προσδιορίζονται τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης, δηλαδή τα υδροϋπεροξείδια. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ιωδομετρική.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ υδροϋπεροξειδίων (ROOR), δηλαδή πρωτογενών προϊόντων της οξείδωσης του ελαίου, και ιόντων ιωδίου (I^-). Τα ιόντα ιωδίου παράγονται από τη διάσπαση του άλατος του ιωδιούχου καλίου (KI). Η παραπάνω αντίδραση είναι η ακόλουθη:



Στο διάλυμα που έχει προκύψει, το οποίο περιέχει ιώδιο (I_2), προστίθεται δείκτης αμύλου πατάτας και τιτλοδοτείται μεθειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$), προς παραγωγή υποθειώδους νατρίου ($Na_2S_2O_6$). Η τιτλοδότηση σταματάει όταν το διάλυμα, από σκούρο μπλε που ήταν μετά την προσθήκη του αμύλου, γίνει ανοιχτό κίτρινο ή ακόμα και άσπρο (Εικόνα 4.14). Η αντίδραση που περιγράφει την παραπάνω μεταβολή είναι η ακόλουθη (Τσαγκάρη, 2021):





(1)

(2)

(3)

Εικόνα 4.14 – Ελαιοδιάλυμα (1), διάλυμα με ιώδιο και δείκτη αμύλου (2) πριν την τιτλοδότηση και (3) μετά την τιτλοδότηση με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Στον παρόν πείραμα, η διαδικασία εύρεσης των υπεροξειδίων ήταν η ακόλουθη:

Ποσότητα ελαιοδιαλύματος, της τάξης των 1-2 g, τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 100 mL. Σε αυτήν προστέθηκαν 20 mL μίγματος διαλυτών οξικού οξέος – χλωροφορμίου ($\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CHCl}_3$) σε αναλογία 3:2 με ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL, για τη διαλυτοποίηση του ελαίου. Προστέθηκαν 500 μL κορεσμένου υδατικού διαλύματος ιωδιούχου καλίου (KI) με αυτόματη πιπέτα των 1000 μL και, το διάλυμα αναδεύτηκε έντονα για 1 min. Σε αυτό προστέθηκαν 20 mL απιονισμένου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο των 50 mL και, μετά, προστέθηκαν 500 μL υδατικού διαλύματος αμύλου 1% w/w με αυτόματη πιπέτα των 1000 μL . Το διάλυμα τιτλοδοτήθηκε με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό του.

Η σχέση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των υπεροξειδίων ήταν η ακόλουθη:

$$PV = \frac{(S - B) \cdot 1000 \cdot N_{\text{Na}_2\text{SO}_3}}{m}$$

όπου:

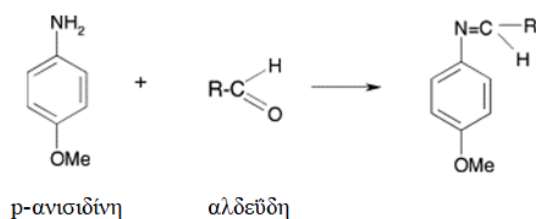
- S ο όγκος του καταναλωθέντος Na_2SO_3 στην τιτλοδότηση του δείγματος (mL).
- B ο όγκος του καταναλωθέντος Na_2SO_3 στην τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος (εδώ του καθαρού ελαιολάδου) (mL).
- $N_{\text{Na}_2\text{SO}_3}$ η κανονικότητα του διαλύματος Na_2SO_3 (N).
- m η μάζα του ελαιολάδου στην κάθε μέτρηση (g).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το B ισούται με το 0. Επίσης, η κανονικότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου ισούται με 0.01N. Συνεπώς, μετά από αυτά, η ανωτέρω σχέση γίνεται:

$$PV = \frac{10 \cdot S}{m} \quad [IV]$$

4.4.8 Μέτρηση αριθμού p-ανισιδίνης στα ελαιοδιαλύματα

Η μέτρηση του αριθμού της p-ανισιδίνης δίνει μία σαφή εικόνα για την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης του λιπιδικού συστήματος, και πιο συγκεκριμένα για τις καρβονυλικές ενώσεις (κυρίως αλδεΐδες) που περιέχονται στο έλαιο μετά την θερμική ή φωτοχημική καταπόνηση. Με την προσθήκη καθαρής p-ανισιδίνης στο διάλυμα, οι αλδεΐδες αντιδρούν με αυτή για την παραγωγή ενός μορίου που απορροφά στα 350 nm (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15 - Αντίδραση της p-ανισιδίνης με αλδεΐδη.

Η διαδικασία εύρεσης του αριθμού της p-ανισιδίνης ήταν η ακόλουθη:

Αρχικά, κατασκευάστηκε το πρότυπο διάλυμα ανισιδίνης 2.5 g/L (Διάλυμα 1). Ζυγίστηκαν 0.2499g ανακρυσταλλωμένης ανισιδίνης και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, στην οποία αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με οξικό οξύ. Έπειτα, σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, τοποθετήθηκε ποσότητα ελαιοδιαλύματος ($m_{\text{ελαιίου}}$) περίπου ίση με 0.5g, ενώ προστέθηκε στη φιάλη ισοοκτάνιο μέχρι τη χαραγή (Διάλυμα 2). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 1 mL από το Διάλυμα 1 και 5 mL από το Διάλυμα 2, με τα αντίστοιχα σιφόνια πλήρωσης (Διάλυμα 3). Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex και τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 10 min. Φωτομετρήθηκαν στα 350 nm τα Διαλύματα 2 (A_b) και 3 (A_s).

Ο αριθμός της p-ανισιδίνης υπολογίζεται μέσω της ακόλουθης σχέσης:

$$p - AV = \frac{25 \cdot (1.2 \cdot A_S - A_b)}{m_{\text{ελαίου}}} [V]$$

5. Αποτελέσματα – Σχολιασμός

5.1 Αποτελέσματα εκχυλίσεων δίκταμου πριν την απόσταξη του φυτού

Αρχικά, μετρήθηκε η υγρασία του δίκταμου, ξηραίνοντάς 2 δείγματα των 5g στους 100 °C για μία ημέρα. Η περιεχόμενη υγρασία του είναι ίση με 11.106 ± 0.003 % (ή 0.111 ± 0.003 g νερού/ g δίκταμου). Πραγματοποιήθηκε διπλή εκχύλιση στο δίκταμο, προτού αυτό υποστεί θερμική καταπόνηση. Πρώτα, εκχυλίστηκε με ακετόνη, δηλαδή με έναν χαμηλής πολικότητας, μη πρωτικό διαλύτη, και στη συνέχεια με νερό. Πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις, 2 επαναλήψεις της συνολικής εκχύλισης και 2 επαναλήψεις του κινητικού πειράματος της εκχύλισης. Στο παρόν κεφάλαιο, τα αποτελέσματα αφορούν τα συνολικά πειράματα.

Και στις 2 περιπτώσεις ογκομετρήθηκε το εκχύλισμα, ενώ μέσω του στερεού υπολείμματος βρέθηκε η απόδοση της εκχύλισης. Στη συνέχεια, και στις 2 περιπτώσεις υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) μέσω Folin – Ciocalteu, η αντιριζική τους ικανότητα, μέσω δοκιμής DPPH, ενώ σε αυτά πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ορισμένων συστατικών τους.

5.1.1 Απόδοση σε ολικά στερεά (TS)

Αρχικά, καταγράφηκε ο όγκος του κάθε εκχυλίσματος, καθώς και τα ολικά στερεά που αυτό απέδωσε, τόσο στην περίπτωση της ακετονικής, όσο και της υδατικής εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δεδομένα για τη ροή του

διαλύτη (mL/min), καθώς και την απόδοσή του σε ολικά στερεά (TS), ως mg/g δίκταμου.

Πίνακας 5.1 - Αποτελέσματα όγκου εκχυλίσματος (ακετόνης και νερού) και απόδοσης σε ολικά στερεά.

Διαλύτης	Ροή διαλύτη (mL/min)	Απόδοση σε ολικά στερεά (mg/g δίκταμου)
Ακετόνη	4.3 ± 0.6	84.2 ± 0.9
Νερό	5*	285 ± 33

*Η μέτρηση της ροής έγινε στη μία από τις 2 επαναλήψεις.

Η μέση ροή του διαλύτη υπολογίστηκε μέσω καταγραφής του όγκου του εκχυλίσματος ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Τα δεδομένα όγκου – χρόνου απεικονίστηκαν διαγραμματικά, ενώ σε αυτά εφαρμόστηκε γραμμή τάσης για να βρεθεί η μέση ροή, μέσω της κλίσης (βλ. Παράρτημα Π1). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι με το νερό εκχυλίζονται τα τριπλάσια ολικά στερεά σε σχέση με την ακετόνη, γεγονός που μαρτυρά την μεγαλύτερη απόδοσή του σε εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών.

5.1.2 Ολικά φαινολικά συστατικά (TPC) και αντιριζική ικανότητα εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη παραλαβής TPC

Δύο από τις πιο σημαντικές παραμέτρους που εξετάστηκαν στα 2 εκχυλίσματα είναι οι φαινολικές ουσίες που περιέχονταν σε αυτά, οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της μεθόδου Folin – Ciocalteu (Total Phenolic Content, TPC), καθώς και η αντιοξειδωτική ικανότητά τους, η οποία μετρήθηκε μέσω της χρήσης μίας ελεύθερης σταθερής ρίζας, του DPPH (Trolox Equivalent Antiradical Capacity, TEAC). Τα 2 αυτά μεγέθη είναι αλληλένδετα καθώς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι φαινολικές ουσίες αποδεδειγμένα διαθέτουν σημαντικό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα.

Αρχικά, υπολογίστηκε η συγκέντρωση TPC και αντιοξειδωτικών αντίστοιχα, εκφρασμένη σε mg/L, μέσω των προτύπων καμπυλών που βρίσκονται στο Παράρτημα Π3. Τα αποτελέσματα των φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράστηκαν χρησιμοποιώντας 2 τρόπους:

- Μέσω της ποσότητας των βιοδραστικών ουσιών ανά μονάδα μάζας ξηρού εκχυλίσματος (ή ολικών εκχυλισμένων στερεών, TS), μέγεθος που εκφράζει ουσιαστικά την εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Στα TPC, η εκλεκτικότητα εκφράστηκε ως προς mg GAE/g TS, ενώ στη δοκιμή DPPH (TEAC) σε mg Trolox/g TS. Η εκλεκτικότητα υπολογίστηκε μέσω της ακόλουθης σχέσης:

$$C \left(\frac{\text{mg}}{\text{g TS}} \right) = \frac{C \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{C_{\text{TS}} \left(\frac{\text{g TS}}{\text{L}} \right)} \quad [\text{I}] \quad (\text{όπου } C_{\text{TS}} \text{ η συγκέντρωση των ολικών στερεών, εκφρασμένη σε g/L}).$$

- Μέσω της ποσότητας των βιοδραστικών ουσιών που ανακτήθηκαν ανά μονάδα μάζας ξηρού φυτού (έχει αφαιρεθεί το ποσοστό της υγρασίας του δίκταμου που υπολογίστηκε προηγουμένως), μέγεθος που ουσιαστικά εκφράζει την απόδοση σε συγκεκριμένη ομάδα βιοδραστικών συστατικών. Στα ολικά φαινολικά συστατικά, η κατά βάρος συγκέντρωση εκφράζεται ως mg GAE/g ξηρού φυτού, ενώ, αντίστοιχα, στη δοκιμή DPPH (TEAC) ως mg Trolox/g ξηρού φυτού. Η εκάστοτε

$$\text{συγκέντρωση υπολογίστηκε ως εξής: } C \left(\frac{\text{mg}}{\text{g ξ.β.φυτού}} \right) = \frac{C \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{εκχυλίσματος}} (\text{L})}{W_{\text{φυτού}} (\text{g})} \quad [\text{II}]$$

(όπου $V_{\text{εκχυλίσματος}}$ ο όγκος του εκχυλίσματος και $W_{\text{φυτού}}$ το ξηρό βάρος του δίκταμου).

Τα αποτελέσματα για τα φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2, ενώ τα αντίστοιχα για την αντιριζική ικανότητα στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.2 - Ολικά φαινολικά συστατικά των εκχυλισμάτων.

Διαλύτης	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE / g TS)	Επί φυτού (mg GAE / g φυτού)
Ακετόνη	265 ± 2	22.3 ± 0.1
Νερό	370 ± 144	103 ± 29

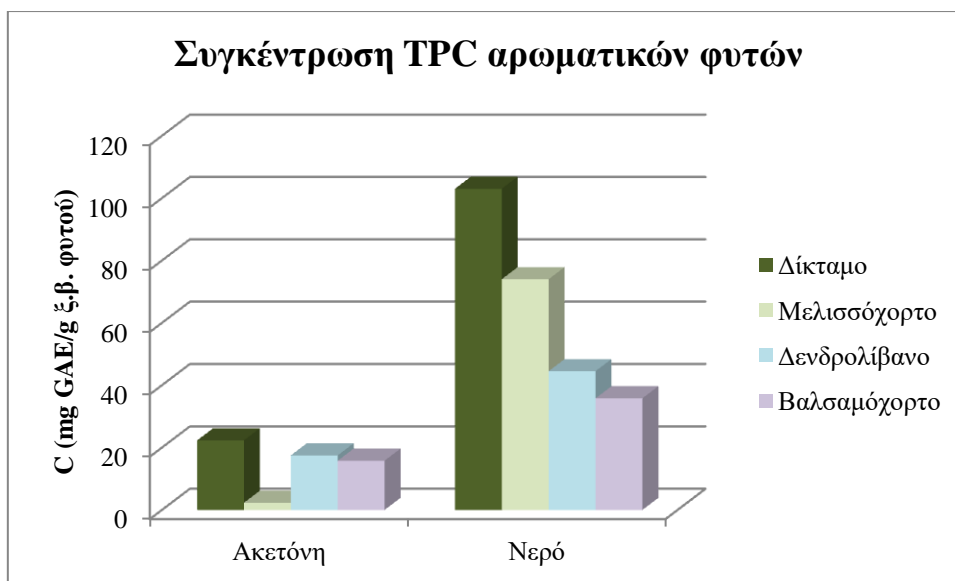
Πίνακας 5.3 - Αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

Διαλύτης	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg Trolox / g TS)	Επί φυτού (mg Trolox / g φυτού)
Ακετόνη	192 ± 9	16 ± 1
Νερό	578 ± 171	162 ± 30

Τόσο στην περίπτωση του ακετονικού, όσο και του υδατικού εκχυλίσματος, παραλαμβάνεται σημαντική ποσότητα φαινόλων. Από τη σκοπιά της εκλεκτικότητας, προκύπτει ότι και στις 2 περιπτώσεις, το στερεό εκχύλισμα αποτελείται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από φαινόλες (26.5% στην περίπτωση της ακετόνης και 37% στην περίπτωση του νερού). Εδώ βλέπουμε ότι, παρά τη διαφορά πολικότητων μεταξύ των διαλυτών, τα στερεά που εκχυλίζονται έχουν σημαντικό φαινολικό περιεχόμενο.

Αντίθετη συμπεριφορά παρουσιάζεται, εάν δούμε τη συγκέντρωση ανά ξηρή μάζα φυτού. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος ακετόνης βλέπουμε ότι η συγκέντρωση είναι της τάξης του 2% κατά βάρος ξηρού δίκταμου, ο αριθμός αυτός πενταπλασιάζεται στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος. Αυτή η μεταβολή σημαίνει ότι, οι πολικές φαινόλες βρίσκονται σε πενταπλάσια συγκέντρωση από τις χαμηλής πολικότητας επί ξηρής βάσης φυτού.

Συμπεραίνεται από τα παραπάνω ότι, το δίκταμο εμφανίζει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, και στα 2 εκχυλίσματά του, συγκριτικά με άλλα αρωματικά φυτά. Στο παρακάτω διάγραμμα βλέπουμε συγκριτικά τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών (TPC), εκφρασμένη σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού για τα εκχυλίσματα από το δίκταμο και από το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο και το βαλσαμόχορτο, με βάση προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων στο παρελθόν (Κανακίδη, 2020· Στίνη, 2022· Φωστέρης, 2021). Η εκχυλιστική διαδικασία ήταν η ίδια σε όλες τις περιπτώσεις, δηλαδή υπήρξε διπλή διαδοχική εκχύλιση, πρώτα με ακετόνη και ύστερα με νερό. Τα δεδομένα με βάση τα οποία κατασκευάστηκε το διάγραμμα μπορούν να βρεθούν στο Παράρτημα Π2.

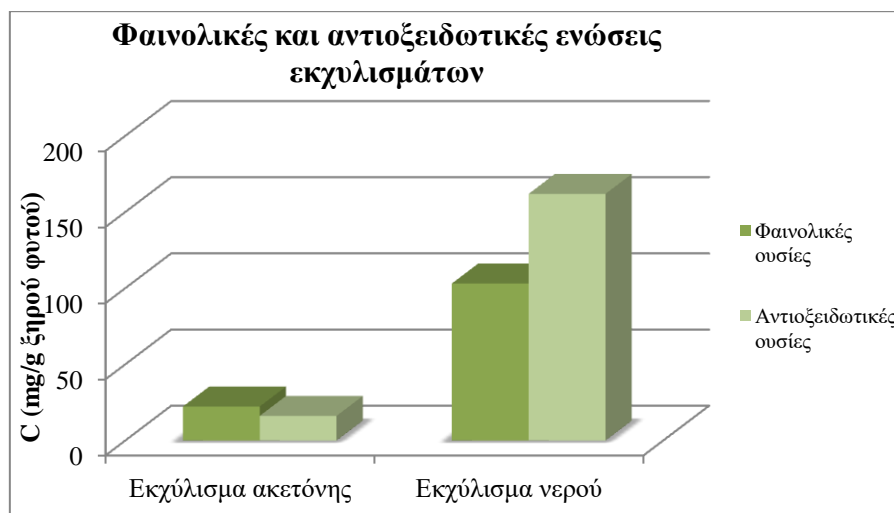


Διάγραμμα 5.1 - Συγκριτικά αποτελέσματα για συγκέντρωση TPC σε δίκτημο, μελισσόχορτο, δενδρολίβανο και βαλσαμόχορτο.

Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται αντιληπτό ότι το δίκτημο αποτελεί εξαιρετική πηγή παραλαβής φαινολών, συγκριτικά με άλλα φυτά, καθώς η συγκέντρωση των TPC είναι η υψηλότερη. Φαίνεται, επιπλέον, ότι τα TPC υπερέχουν και στην περίπτωση του εκχυλίσματος ακετόνης και στην περίπτωση του νερού, επομένως μπορεί κανείς να εξάγει φαινολικά συστατικά από το δίκτημο χρησιμοποιώντας διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Άρα, τα 2 εκχυλίσματα του δίκτημου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη φαινολική ενίσχυση διαφόρων συστημάτων τροφίμων ή καλλυντικών, ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος στο οποίο ενσωματώνονται.

Τόσο το εκχύλισμα ακετόνης, όσο και το εκχύλισμα νερού, εμφανίζουν σημαντική περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Η επί ξηρού εκχυλίσματος περιεκτικότητα στην περίπτωση της ακετόνης είναι 19.2% και 57.8% στην περίπτωση του εκχυλίσματος του νερού. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκέντρωση ανά ξηρή μάζα φυτού, καθώς παρατηρείται ένας δεκαπλασιασμός στο ποσοστό αντιοξειδωτικών ουσιών στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος, συγκριτικά με την περίπτωση του εκχυλίσματος ακετόνης. Δεδομένου, βέβαια, ότι, όπως φάνηκε παραπάνω, το νερό μπορεί να εκχυλίσει τις φαινολικές ουσίες του δίκτημου με μεγαλύτερη επιτυχία, αυτή η αύξηση στο ποσοστό είναι απολύτως λογική. Μένει μόνο να διερευνηθεί εάν υπάρχει αναλογική σχέση μεταξύ του ποσοστού των φαινολικών ουσιών και της αντιριζικής ικανότητας στο φυτό.

Στο Διάγραμμα 5.2 οπτικοποιείται η αναλογία μεταξύ φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.



Διάγραμμα 5.2 - Συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων εκχυλισμάτων.

Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι η αντιοξειδωτική δράση, καθώς και η συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, στο εκχύλισμα νερού είναι σαφώς μεγαλύτερη. Παρόλα αυτά, ενώ στο εκχύλισμα ακετόνης φαίνεται ότι η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών είναι ελαφρώς μικρότερη από εκείνη των φαινολικών ενώσεων, στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος οι αντιοξειδωτικές ουσίες ποσοτικοποιούνται σημαντικά παραπάνω από τις φαινολικές, ξεκάθαρη ένδειξη ότι το υδατικό εκχύλισμα έχει ισχυρότερα φαινολικά αντιοξειδωτικά από το ακετονικό.

Κινητική μελέτη παραλαβής φαινολικών ουσιών

Έπειτα από τις 2 επαναλήψεις των συνολικών εκχυλίσεων, πραγματοποιήθηκε διπλό κινητικό πείραμα εκχύλισης με ακετόνη και, στη συνέχεια, με νερό. Ο λόγος που μελετήθηκε χρονικά η παραλαβή των TPC είναι για να βρεθεί σε ποιο σημείο εξαντλούνται τα περισσότερα φαινολικά συστατικά, άρα και για πόσο χρονικό διάστημα η εκχύλιση θεωρείται αποδοτική.

Η διαδικασία παρέμεινε η ίδια, δηλαδή πακτώθηκε ο εκχυλιστήρας με 20 g δίκταμου και, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με ακετόνη, λαμβανόταν δείγμα εκχυλίσματος από το ακροφύσιο της στήλης μέσω Eppendorf. Ακολούθησε η εκχύλιση με νερό, όπου έγινε η ίδια διαδικασία δειγματοληψίας. Η διαδικασία τελείωνε όταν το δείγμα

που λαμβανόταν είχε αποχρωματιστεί πλήρως, κάτι που συνέβη στην κάθε περίπτωση περίπου σε χρόνο 25 – 30 λεπτών.

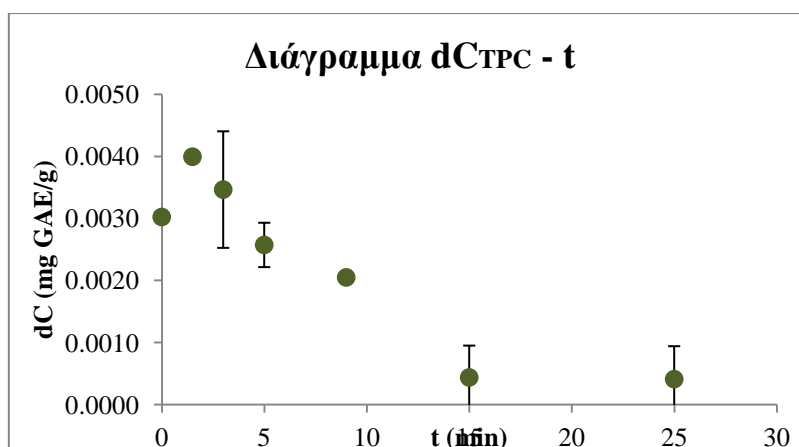
Για την εύρεση της συγκέντρωσης των εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση Folin – Ciocalteu, με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, σε δείγμα που λαμβανόταν από το εκάστοτε Eppendorf.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται η μέση ροή του εκάστοτε διαλύτη κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης, καθώς και η απόδοση σε ολικά στερεά (TS) επί τοις εκατό. Ο υπολογισμός της ροής βασίζεται σε δεδομένα που παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π1.

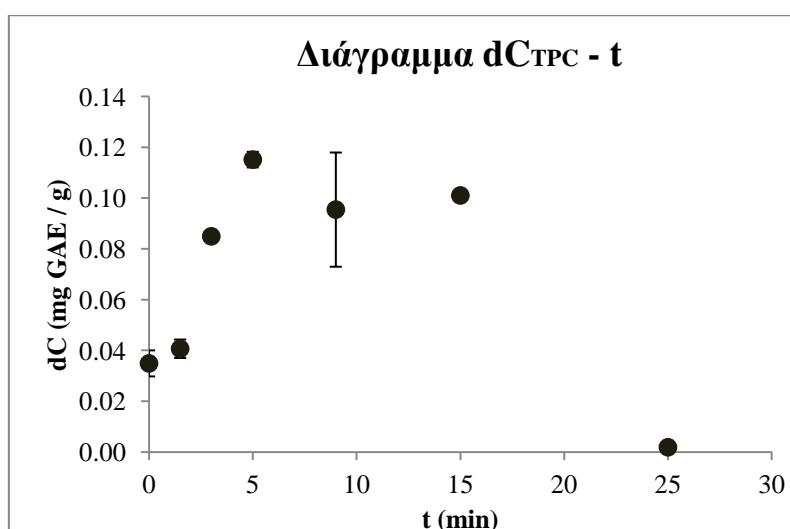
Πίνακας 5.4 - Αποτελέσματα όγκου εκχυλίσματος (ακετόνης και νερού) και απόδοσης σε ολικά στερεά για τα κινητικά πειράματα εκχύλισεων.

Διαλύτης	Ροή διαλύτη (mL/min)	Απόδοση σε ολικά στερεά (mg/g δίκταμου)
Ακετόνη	9 ± 1	63 ± 5
Νερό	2.6 ± 0.3	230 ± 49

Υπολογίστηκε η διαφορική συγκέντρωση TPC στο κάθε δείγμα, εκφρασμένη ως προς mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού (dC_i). Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Π4. Τα αποτελέσματα για τις διαφορικές συγκεντρώσεις στα δείγματα εκχυλισμάτων ακετόνης και νερού παρουσιάζονται στους Πίνακες XII και XIII του Παραρτήματος, ενώ στα Διαγράμματα 5.3 και 5.4 απεικονίζεται η χρονική εξέλιξη αυτής της συγκέντρωσης για τα 2 εκχυλίσματα.



Διάγραμμα 5.3 - Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης συγκέντρωσης εκχυλιζόμενων TPC για την ακετονική εκχύλιση σε μη απεσταγμένο δίκταμο.



Διάγραμμα 5.4 - Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης συγκέντρωσης εκχυλιζόμενων TPC για την υδατική εκχύλιση σε μη απεσταγμένο δίκταμο.

Ξεκινώντας με το διάγραμμα 5.3, παρατηρείται πως τα φαινολικά συστατικά εξαντλούνται ταχύτατα από το φυτό. Στην αρχή της διεργασίας, οι φαινόλες εκχυλίζονται ταχύτατα, ενώ έπειτα ο ρυθμός εκχύλισής τους φθίνει. Αυτό συμβαίνει διότι, κατά τη διάρκεια της διεργασίας, μειώνεται η διαφορά συγκέντρωσης TPC μεταξύ διαλύτη και φυτού, η οποία είναι και η κινητήριος δύναμη της εκχύλισής τους. Σε χρόνο 15 min, έχει εξαντληθεί από το δίκταμο ποσότητα φαινολών μεγαλύτερη του 80% της συνολικής. Η ακετόνη είναι ένας ισχυρός διαλύτης, που μπορεί με μεγάλη ευκολία να εισχωρήσει στη μικροδομή του φυτού και να εκχύλισει από αυτήν τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχει. Αυτό σημαίνει ότι, σε βιομηχανικό επίπεδο, η εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου φαινολικών ουσιών από το δίκταμο χρησιμοποιώντας ακετόνη είναι μία συμφέρουσα διαδικασία, καθώς είναι γρήγορη, απλή και οικονομική.

Στην περίπτωση της εκχύλισης των TPC από το νερό, η συμπεριφορά είναι εξαιρετικά ασταθής, όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα. Παρατηρείται μία αύξηση των φαινολικών ουσιών στο φυτό μέχρι τα 9 λεπτά, ενώ στη συνέχεια πέφτει και αυξάνεται ξανά. Το νερό διεισδύοντας στη μικροδομή του δίκταμου, προκαλεί διόγκωση των κόκκων του υλικού, και ανομοιομορφία στη διαβροχή οπότε διερχόταν δια μέσου της κλίνης από συγκεκριμένα κανάλια και δεν ερχόταν σε επαφή με όλο το υλικό. Για τον παραπάνω λόγο η χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής κρίθηκε ακατάλληλη. Χρειάζεται ειδική διερεύνηση των συνθηκών ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης διαβροχή του υλικού, γεγονός που είναι πέρα της στόχευσης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας οπότε δε συνεχίστηκε η κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης

Μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ακετονικής εκχύλισης

Όσον αφορά τη μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, βασίστηκε στο 2^ο νόμο του Fick. Πιο συγκεκριμένα, μέσω αυτής της σχέσης, μελετώνται τα φαινόμενα διάχυσης που λαμβάνουν χώρα στο φυτό κατά την εκχύλιση. Η σχέση είναι η ακόλουθη:

$$\ln(C_{inf} - C_t) = \ln(C_{inf} - C_0) - k \cdot t \quad [III]$$

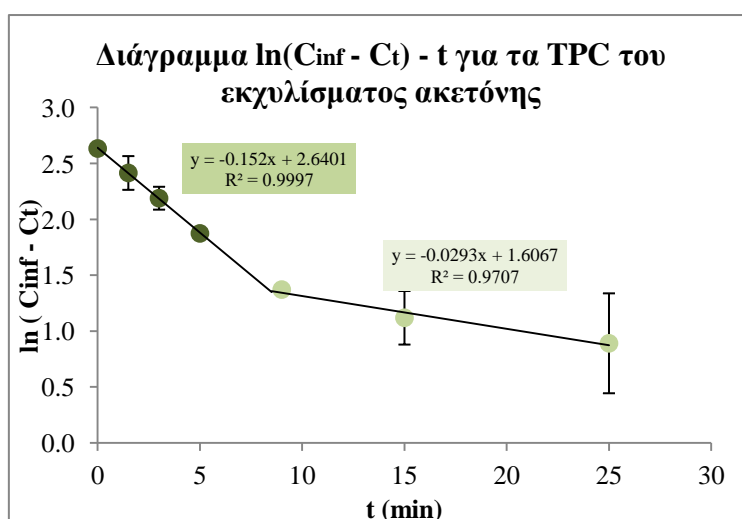
όπου:

- C_{inf} είναι η ολική συγκέντρωση των TPC του φυτού που έχουν προσδιοριστεί με βάση την εξαντλητική εκχύλιση και εκφράζονται σε mg GAE/g φυτού.
- C_t είναι η συγκέντρωση των TPC που έχει ανακτηθεί από το φυτό έως τη χρονική στιγμή t και είναι εκφρασμένη σε mg GAE/g φυτού.
- C_0 είναι η συγκέντρωση των TPC που έχει ανακτηθεί από το φυτό στην έναρξη της εκχύλισης ($t=0$) και είναι εκφρασμένη σε mg GAE/g φυτού.
- k είναι η σταθερά ρυθμού, η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με το συντελεστή διάχυσης και τα εκχυλιζόμενα σωματίδια.

Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, η εκχύλιση χωρίζεται σε 2 στάδια: στο 1^ο στάδιο, δηλαδή το στάδιο της έκπλυσης, και στο 2^ο, δηλαδή στο στάδιο της διάχυσης. Στην έκπλυση, ουσιαστικά εκχυλίζονται τα βιοδραστικά συστατικά που βρίσκονται στον εξωτερικό φλοιό του κόκκου, επομένως είναι και το πιο γρήγορο στάδιο, με ρυθμό k_1 .

Αντίθετα, στο στάδιο της διάχυσης, το οποίο είναι το αργό στάδιο της διαδικασίας, ο διαλύτης εκχυλίζει τα ανάλογα συστατικά από το εσωτερικό του κόκκου του φυτού. Ο ρυθμός της διάχυσης συμβολίζεται με k_2 .

Ο όρος C_t δεν πρέπει να συγχέεται με τη διαφορική συγκέντρωση (dC_i) που υπολογίστηκε προηγουμένως, καθώς πρόκειται για τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο συνολικό διάλυμα διαλύτη – εκχυλιζόμενων συστατικών. Ο τρόπος υπολογισμού του C_t παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα Π4. Ως C_{inf} χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των TPC του συνολικού εκχυλίσματος της κινητικής μελέτης σε κάθε περίπτωση. Στον αντίστοιχο πίνακα του παραρτήματος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τον όρο $\ln(C_{inf} - C_t)$ για τα 2 εκχυλίσματα, ενώ στα διαγράμματα που ακολουθούν βλέπουμε την προσαρμογή των ανωτέρω δεδομένων στο 2^ο νόμο του Fick.



Διάγραμμα 5.5 - Διάγραμμα $\ln(C_{inf} - C_t) - t$ για το εκχύλισμα ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

Αναφορικά με την κινητική μελέτη της εκχύλισης με ακετόνη, οι 2 παράγοντες που εξετάζονται, μετά την προσαρμογή των δεδομένων στο 2^ο νόμο του Fick για τη διάχυση, καθώς και την εφαρμογή γραμμών τάσης στα δεδομένα του Πίνακα 5.5, είναι η χρονική διάρκεια της έκπλυσης και ο λόγος των ρυθμών των 2 σταδίων (k_1/k_2). Η διάρκεια της έκπλυσης εντοπίζεται στο σημείο τομής των 2 ευθειών, ενώ ο λόγος των ρυθμών των 2 σταδίων είναι το πηλίκο των κλίσεων των 2 ευθειών. Στην περίπτωση της ακετόνης, όπου είναι εμφανή τα 2 στάδια διάχυσης, το k_1 ισούται με -0.152 min^{-1} , ενώ το k_2 ισούται με -0.0293 min^{-1} . Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο

χρόνος της έκπλυσης είναι ίσος με 8.5 min, ενώ ο λόγος k_1/k_2 ισούται με 5.2. Οι συγκεκριμένες παράμετροι εξετάζονται, καθώς με την ποσοτικοποίησή τους, εξάγονται σημαντικά συμπεράσματα για τη χρονική εξέλιξη της εκχύλισης των βιοδραστικών συστατικών από το φυτό. Η διάρκεια της έκπλυσης δείχνει προσεγγιστικά το χρόνο που χρειάζεται για να παραληφθεί η πλειοψηφία των ουσιών ενδιαφέροντος.

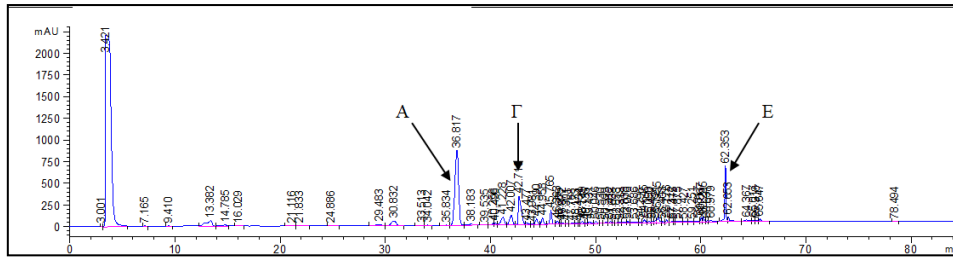
5.1.3 Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ακετόνης

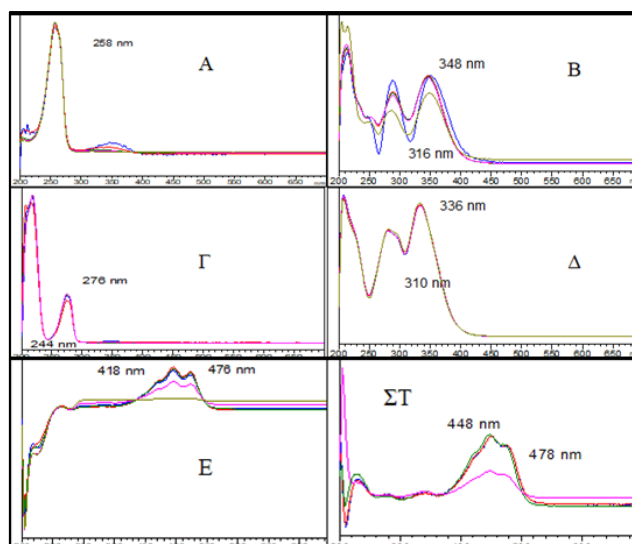
Ανάλυση HPLC του εκχυλίσματος ακετόνης.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα της ακετόνης, στα παρακάτω Σχήματα παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων στα 280 nm, καθώς και οι κορυφές των κύριων ουσιών που ταυτοποιήθηκαν.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας σε 4 μήκη κύματος: στα 257 στα 280 nm, 445 nm και 664 nm. Το πρώτο μήκος κύματος ανταποκρίνεται στο μέγιστο του φάσματος UV της θυμοκινόνης, τα 280 nm αποτελούν ένα μήκος κύματος στο οποίο ανιχνεύονται όλα τα φαινολικά συστατικά, ενώ στα 445 και τα 664 nm εντοπίζονται καλύτερα τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες αντίστοιχα. Τα 2 καροτενοειδή που βρίσκονται σε πλειοψηφία στο δίκταμο, δηλαδή η λουτεΐνη και το β-καροτένιο, εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 446 και στα 452 nm αντίστοιχα (Craft et. al., 1992).

Στα παρακάτω σχήματα διακρίνουμε τα χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα του εκχυλίσματος ακετόνης στα 257, 280 και 445 nm, καθώς και τις κυριότερες κορυφές που εντοπίζονται σε αυτά.





Σχήμα 5.4 - Οι 6 κύριες κορυφές που εντοπίστηκαν στα χρωματογραφήματα των 2 ακετονικών εκχυλίσμάτων του μη απεσταγμένου φυτού.

Έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση, οι 6 ενώσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.4, και που εντοπίζονται στο χρωματογράφημα που φαίνεται παραπάνω, ταυτοποιήθηκαν ως εξής (Λεμονής, 2017· Τσιμογιάννης, 2008):

Πίνακας 5.5 - Χαρακτηρισμός κορυφών του χρωματογραφήματος του ακετονικού εκχυλίσματος, χρόνος έκλουσης και δομή των ουσιών.

Κορυφή	Χρόνος έκλουσης (min)		Ουσία	Δομή
	1 ^η επανάληψη	2 ^η επανάληψη		
A	39.936	39.238	Θυμοκινόνη	
B	43.229	42.826	Φλαβονοειδές	
Γ	45.039	44.673	Καρβακρόλη	
Δ	47.118	46.812	Αιθυλαιθέρας της επιροσμανόλης	
E	62.246	61.966	Λουτεΐνη	
ΣΤ	75.413	73.996	β-καροτένιο	

Στην παρούσα εργασία, οι κύριες ουσίες ενδιαφέροντος είναι η θυμοκινόνη και η καρβακρόλη, ενώ υπολογίστηκε και η συγκέντρωση των καροτενοειδών, ως ισοδύναμα β-καροτένιου. Όπως και στην περίπτωση υπολογισμού των TPC, τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων ουσιών εκφράζονται μέσω της εκλεκτικότητας (mg/g TS) και της συγκέντρωσης κατά βάρος φυτού (mg/g ξ.β. φυτού). Σε αυτή την περίπτωση, η συγκέντρωση της θυμοκινόνης, εκφρασμένη σε mg/L υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς που βρίσκεται στο Παράρτημα Π3, ενώ η συγκέντρωση της καρβακρόλης υπολογίστηκε από την ακόλουθη σχέση:

$$E_{280 \text{ nm}} = 12.67906 \cdot C + 111.577228$$

Η συγκέντρωση των καροτενοειδών (λουτεΐνης και β-καροτένιου) υπολογίστηκε ως εξής:

$$E_{445 \text{ nm}} = 9.1531 \cdot C + 98.5852$$

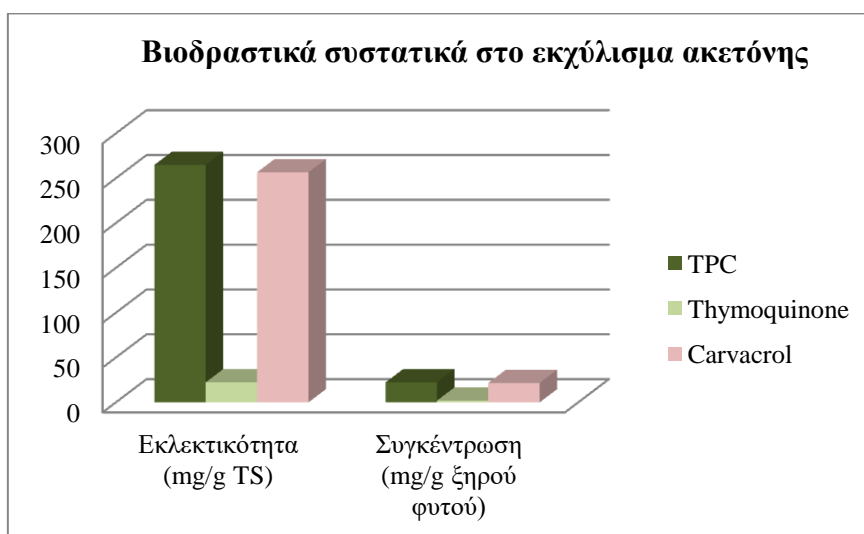
Τα αποτελέσματα των παραπάνω υπολογισμών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 5.6 – Συγκέντρωση θυμοκινόνης και καρβακρόλης στο ακετονικό εκχύλισμα του μη απεσταγμένου φυτού.

Ουσία	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg / g TS)	Επί φυτού (mg / g φυτού)
Θυμοκινόνη	22 ± 2	1.9 ± 0.2
Καρβακρόλη	257 ± 16	22 ± 1
Καροτενοειδή	21.3 ± 0.5	1.80 ± 0.02

Κοιτώντας τον Πίνακα 5.6, παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα της καρβακρόλης στο ξηρό εκχύλισμα είναι περίπου δεκαπλάσια από αυτή της θυμοκινόνης. Η καρβακρόλη συνιστά το 25.7% της μάζας του ξηρού ακετονικού εκχυλίσματος, ενώ η θυμοκινόνη μόλις το 2.2%. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και στη συγκέντρωση των 2 ουσιών επί ξηρού φυτού. Μάλιστα, εάν δει κανείς συγκριτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC του εκχυλίσματος με τα συνολικά φαινολικά συστατικά που αυτό περιέχει (Διάγραμμα 5.8), γίνεται αντιληπτό ότι η καρβακρόλη αποτελεί το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό που εκχυλίζεται με διαλύτη την ακετόνη. Αυτή η συμπεριφορά ήταν αναμενόμενη, καθώς, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες,

στα εκχυλίσματα δίκταμου με μη πολικούς διαλύτες, όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας ή το εξάνιο, η καρβακρόλη αποτελεί το συστατικό που βρίσκεται σε πλειοψηφία (Kougi et. al., 2007· Δαούσης, 2013).



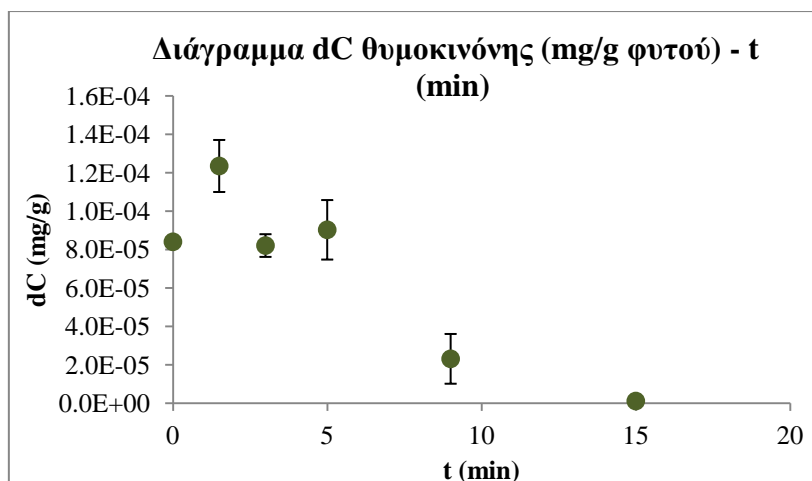
Διάγραμμα 5.6 – Βιοδραστικά συστατικά στο εκχύλισμα ακετόνης του μη απεσταγμένου δίκταμου.

Τέλος, στο ακετονικό εκχύλισμα συναντάται σημαντική ποσότητα καροτενοειδών, περίπου ίση με αυτή της θυμοκινόνης.

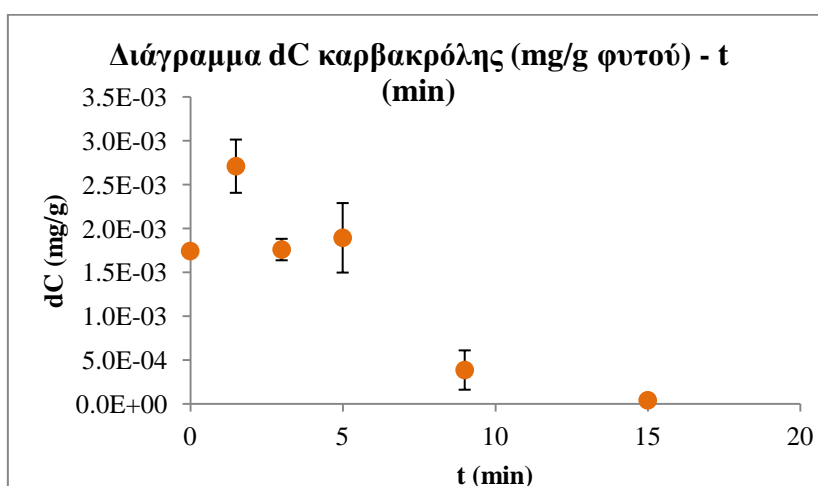
Ανάλυση HPLC στο κινητικό πείραμα εκχύλισης με ακετόνη

Για την εύρεση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC στα δείγματα που λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με Eppendorf.

Υπολογίστηκε η διαφορική συγκέντρωση των 2 ουσιών στο κάθε δείγμα, εκφρασμένη ως προς mg/g ξηρού βάρους φυτού (dC_i). Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Π4. Τα αποτελέσματα για τις διαφορικές συγκεντρώσεις στα δείγματα εκχυλισμάτων ακετόνης παρουσιάζονται σε πίνακες του ίδιου παραρτήματος. Στα παρακάτω διαγράμματα, παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή της διαφορικής συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης στο φυτό.



Διάγραμμα 5.7 - Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της εκχύλισης της θυμοκινόνης από το μη απειλωμένο φυτό.

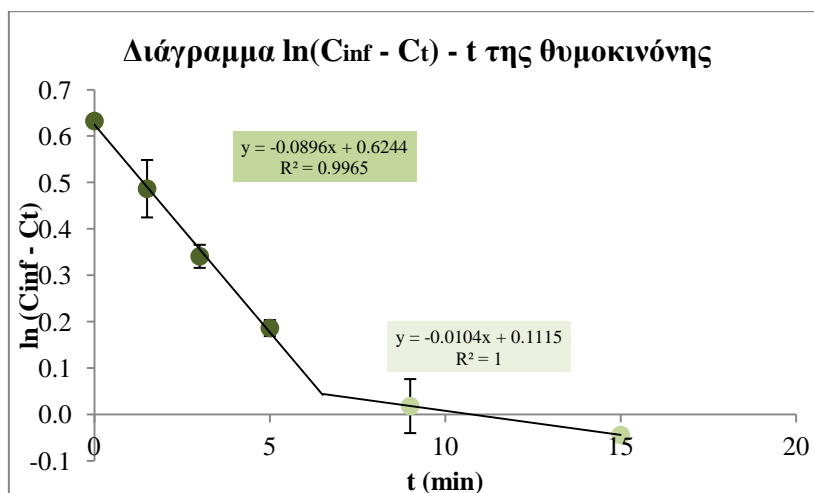


Διάγραμμα 5.8 - Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της εκχύλισης της καρβακρόλης από το μη απειλωμένο φυτό.

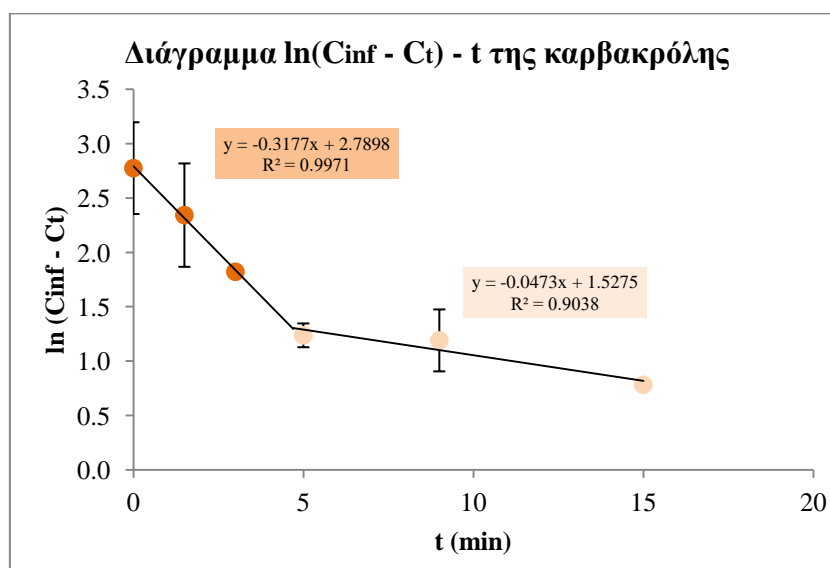
Είναι σαφές ότι, τόσο στην περίπτωση της θυμοκινόνης, όσο και στην περίπτωση της καρβακρόλης, παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά γρήγορης εξάντλησης των ουσιών από τη φυτόμαζα. Μάλιστα, όλη η διαθέσιμη ποσότητα των 2 ουσιών εκχυλίζεται σε μόλις 15 λεπτά. Είναι σαφές πλέον ότι η ακετονική εκχύλιση του δίκταμου, μετά τα 15 λεπτά, μπορεί να λαμβάνει τέλος. Άλλο ένα σημείο που αξίζει να τονιστεί είναι η αύξηση που υφίσταται η συγκέντρωση της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης στην αρχή της διεργασίας. Αυτή η τάση είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση της εκχύλισης φαινολικών ουσιών, οπότε υπάρχει συμφωνία με βάση διαφορετικές μεθόδους καταγραφής της εκχύλισης.

Συνεχίζοντας με τη μαθηματική επεξεργασία και την προσαρμογή των δεδομένων συγκέντρωσης στο 2^ο νόμο του Fick, στους αντίστοιχους πίνακες του παραρτήματος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τον όρο $\ln(C_{inf} - C_t)$ της

Σχέσης III για την περίπτωση της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, ενώ στα παρακάτω διαγράμματα αποτυπώνεται η εν λόγω σχέση διαγραμματικά.



Διάγραμμα 5.9 - Διάγραμμα $\ln(C_{inf} - C_t) - t$ για την εξέλιξη της θυμοκινόνης του εκχυλίσματος ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.



Διάγραμμα 5.10- Διάγραμμα $\ln(C_{inf} - C_t) - t$ για την εξέλιξη της καρβακρόλης του εκχυλίσματος ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

Όπως φαίνεται και στα παραπάνω διαγράμματα, τόσο στην περίπτωση της θυμοκινόνης, όσο και στην περίπτωση της καρβακρόλης, η μεταφορά μάζας πράγματι διαχωρίζεται σε 2 στάδια, στο γρήγορο (έκπλυση) και στο πιο αργό (διάχυση). Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται η διάρκεια έκπλυσης και ο λόγος $k_1:k_2$ για τις 2 ουσίες.

Πίνακας 5.7 – Διάρκεια και ρυθμός έκπλυσης, ρυθμός διάχυσης και λόγος ρυθμών για τη θυμοκινόνη και την καρβακρόλη.

	Διάρκεια έκπλυσης (min)	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	$k_1:k_2$
Θυμοκινόνη	6.5	-0.0896	-0.0104	8.6
Καρβακρόλη	4.7	-0.3177	-0.0473	6.7

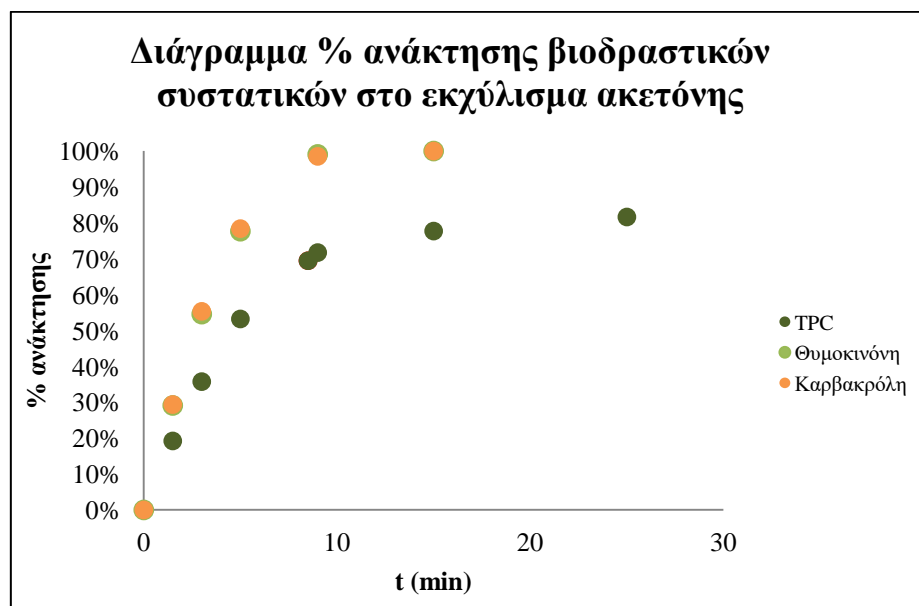
Τόσο στην περίπτωση της θυμοκινόνης, όσο και στην περίπτωση της καρβακρόλης, ο χρόνος που διαρκεί η έκπλυση είναι μικρός, ενώ είναι και στις 2 περιπτώσεις μικρότερος από τον αντίστοιχο χρόνο έκπλυσης των φαινολικών ουσιών (8.5 min). Άρα, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης φαινολών από τον εξωτερικό φλοιό του κόκκου του δίκταμου, όλη η διαθέσιμη ποσότητα θυμοκινόνης και καρβακρόλης έχει περάσει στο εκχύλισμα. Μάλιστα, η καρβακρόλη έχει πολύ μικρότερο χρόνο έκπλυσης, κάτι το οποίο ερμηνεύεται με βάση την κατανομή της επιφανειακά στα φύλλα του φυτού, εντός των ελαϊκών αδένων (Tsimogiannis et. al., 2018). Η κατάτμηση του φυτού οδηγεί στην πλήρη διάνοιξη των αδένων οπότε όλα τα συστατικά του αιθέριου ελαίου βρίσκονται στην επιφάνεια των κόκκων του υλικού. Άρα σχεδόν όλη η ποσότητα του αιθέριου ελαίου, και συνεπώς και της καρβακρόλης, είναι διαθέσιμη για την πρωταρχική έκπλυση από το διαλύτη. Πέρα από μικρότερο χρόνο έκπλυσης, η καρβακρόλη εμφανίζει υπερτριπλάσιο ρυθμό έκπλυσης και διάχυσης αντίστοιχα, συγκριτικά με τη θυμοκινόνη, ενώ και στις 2 ουσίες, ο λόγος των ρυθμών των 2 σταδίων είναι υψηλός.

Παρουσιάζεται παρακάτω η ποσοστιαία αύξηση της θυμοκινόνης, και της καρβακρόλης, στο εκχύλισμα ακετόνης με την πάροδο του χρόνου, καθώς και η διαγραμματική της απεικόνιση (Πίνακας 5.8, Διάγραμμα 5.11), όπου η % αύξηση υπολογίστηκε ως εξής: $\% \text{ αύξηση} = \frac{C_t}{C_{inf}} \cdot 100\%$.

Πίνακας 5.8 – Αύξηση της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης στο ακετονικό εκχύλισμα δίκταμου, με την πάροδο του χρόνου.

t (min)	% αύξηση συγκέντρωσης θυμοκινόνης	% αύξηση συγκέντρωσης καρβακρόλης
0	0.0%	0.0%
1.5	29.1%	29.4%
3	54.6%	55.3%
4.7	-	74.9%*
5	77.7%	78.4%
6.5	98.7%*	-
9	99.1%	98.5%
15	100.0%	100.0%

* Η αναμενόμενη αύξηση της συγκέντρωσης στο εκχύλισμα, κατά τη μετάβαση από την έκπλυση στη διάχυση. Υπολογίστηκε μέσω γραμμικής παρεμβολής (εντολή FORECAST του Excel).



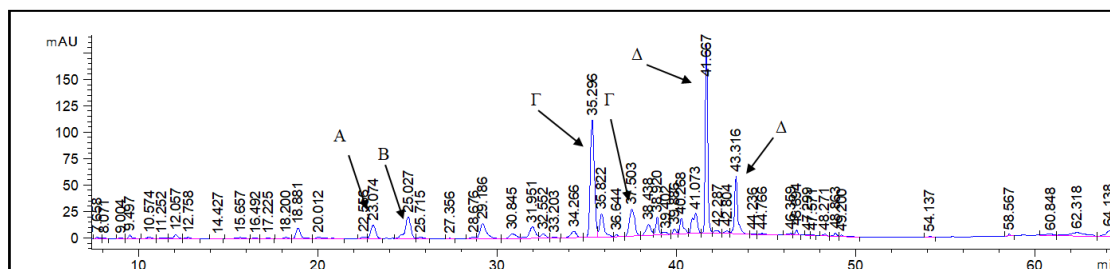
Διάγραμμα 5.11 – Ποσοστό ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών στο εκχύλισμα ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

Κοιτώντας τα παραπάνω, διαπιστώνεται ότι, στη διάρκεια του σταδίου της έκπλυσης, έχει παραληφθεί από το δίκταμο το μεγαλύτερο ποσό των διαθέσιμων βιοδραστικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση της θυμοκινόνης, στα 6.5 min έχει εκχυλιστεί σχεδόν όλη η ποσότητα, ενώ στην περίπτωση της καρβακρόλης, σε χρόνο 4.7 min έχει περάσει στο εκχύλισμα το 74.9% της συνολικής ποσότητας που περιέχεται στο φυτό. Μάλιστα, εάν κοιτάξει κανείς το διάγραμμα 5.13, παρατηρείται ότι οι βιοδραστικές ουσίες που μελετώνται φτάνουν στην εκχύλιση όλης της ποσότητάς τους σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το

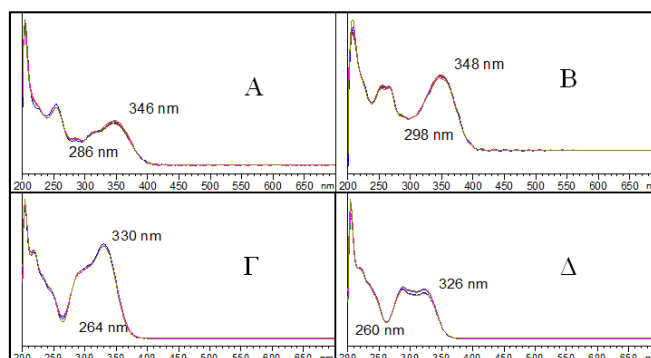
γεγονός ότι οι 2 ουσίες έχουν ταυτόσημη πορεία χρονικά, υπό το πρίσμα της ποσοστιαίας περιεκτικότητάς τους στο λαμβανόμενο εκχύλισμα.

Ανάλυση HPLC του εκχυλίσματος νερού.

Αναφορικά με το υδατικό εκχύλισμα, η ανάλυση HPLC έγινε σε ένα μήκος κύματος στα 280 nm. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των 280 nm του εκχυλίσματος, καθώς και οι κύριες κορυφές που ξεχωρίζουν.



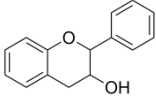
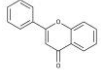
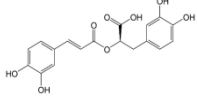
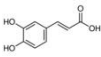
Σχήμα 5.5 - Χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος του μη απεσταγμένου φυτού στα 280 nm.



Σχήμα 5.6 - Οι 4 κύριες κορυφές που εντοπίστηκαν στα χρωματογραφήματα των 2 υδατικών εκχυλισμάτων του μη απεσταγμένου φυτού.

Έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση, οι 4 ενώσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.6, και που εντοπίζονται στο χρωματογράφημα που φαίνεται παραπάνω, ταυτοποιήθηκαν ως εξής (Chen et. al., 2005· Τσιμογιάννης, 2008):

Πίνακας 5.9 - Χαρακτηρισμός κορυφών του χρωματογραφήματος του υδατικού εκχυλίσματος, χρόνος έκλυσης και δομή των ουσιών.

Κορυφή	Χρόνος έκλυσης (min)		Ουσία	Δομή
	1 ^η επανάληψη	2 ^η επανάληψη		
A	23.220	21.854	Φλαβαν-3-όλη	
B	25.166	23.562	Φλαβόνη	
Γ	35.404	33.978	Ροσμαρινικό οξύ	
Δ	41.699	41.160	Παράγωγο καφεϊκού οξέος	

Τα χρωματογραφήματα για την κάθε ανάλυση ξεχωριστά παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π5. Στην παρούσα εργασία, αναζητείται η διαθέσιμη ποσότητα παραγώγων του καφεϊκού οξέος, μεταξύ των οποίων ροσμαρινικό οξύ, και των συνολικών φλαβονοειδών ως ισοδύναμα κερκετίνης. Μέσω των Σχέσεων I και II υπολογίστηκαν οι εκλεκτικότητες των παραπάνω ουσιών, εκφρασμένες ως προς mg/g TS, αλλά και οι συγκεντρώσεις, εκφρασμένες ως προς mg/g ξ.β. φυτού (Πίνακας 5.10). Η συγκέντρωση της κάθε ουσίας, εκφρασμένη ως προς mg/L, υπολογίστηκε μέσω των ακολούθων καμπυλών αναφοράς:

- $E_{280} = 30.708 \cdot C + 5.4717$ (για το ροσμαρινικό οξύ).
- $E_{280} = 24.949 \cdot C + 25.34$ (για τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος).
- $E_{280} = 20.344 \cdot C - 98.183$ (για τα φλαβονοειδή, ως ισοδύναμα κερκετίνης).

Πίνακας 5.10 – Εκλεκτικότητα & συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος, παραγώγων του καφεϊκού οξέος και φλαβονοειδών στο υδατικό εκχύλισμα του μη απειλωμένου δίκταμου.

Ουσία	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg / g TS)	Επί φυτού (mg / g φυτού)
Ροσμαρινικό οξύ	27 ± 19	8 ± 6

Παράγωγα καφεϊκού οξέος	46 ± 22	14 ± 8
Φλαβονοειδή	86 ± 1	24 ± 3

Από τα παραπάνω παρατηρούμε ότι, μεγάλο ποσοστό των βιοδραστικών ενώσεων του φυτού είναι τα φλαβονοειδή. Το δίκταμο, επιπλέον, περιέχει μεγάλη ποσότητα παραγώγων του καφεϊκού οξέος, όπως για παράδειγμα το σαλβιανολικό ή το λιθοσπερμικό οξύ. Τέλος, με το νερό εκχυλίζεται σημαντική ποσότητα ροσμαρινικού οξέος από το φυτό.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, με τη χρήση άλλων διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας, όπως ο διαιθυλαιθέρας (DE), ο οξικός αιθυλεστέρας (EAc) ή η αιθανόλη (EtOH), επιτυγχάνεται εκχύλιση των ίδιων συστατικών, με διαφορετικές όμως περιεκτικότητες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της εκχύλισης του δίκταμου με τους παραπάνω διαλύτες, και με το νερό (H₂O), σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι περιεκτικότητες του ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος, καθώς και της απιγενίνης, εκφράζονται ως % επί του συνολικού εμβαδού των κορυφών του χρωματογραφήματος που προέκυψε ύστερα από ανάλυση HPLC του εκχυλίσματος (Kougi et. al., 2007).

Πίνακας 5.11 – Δεδομένα εκχύλισης ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος από το δίκταμο με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας

Διαλύτης	% ροσμαρινικού οξέος	% καφεϊκού οξέος
DE	2.6%	-*
EAc	13.4%	-*
EtOH	30.8%	1.4%
H₂O	16.8%	16.4%

*: Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την αναγνώριση του καφεϊκού οξέος στο εκχύλισμα.

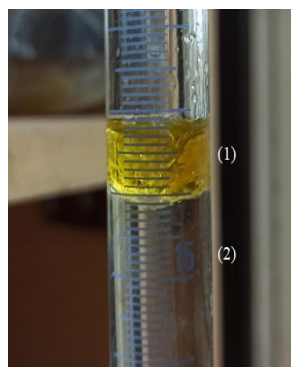
Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα, εξάγονται διάφορα συμπεράσματα. Όσον αφορά το ροσμαρινικό οξύ, η μέγιστη ποσότητα εξάγεται με τη χρήση αιθανόλης (EtOH), ενώ ακολουθούν το νερό (H₂O), ο οξικός αιθυλεστέρας (EAc) και, τέλος, ο διαιθυλαιθέρας (DE), μέσω του οποίου εκχυλίζεται πολύ μικρή ποσότητα. Το νερό είναι ο καταλληλότερος διαλύτης για την παραλαβή καφεϊκού οξέος καθώς, όπως είδαμε και παραπάνω, παραλαμβάνεται σημαντική ποσότητα.

Τα παραπάνω εξηγούνται με βάση την πολικότητα, τόσο των ενώσεων, όσο και των διαλυτών. Κοιτώντας τη δομή των 3 αυτών ουσιών (βλ. Πίνακας 5.9), εξάγεται το συμπέρασμα ότι το ροσμαρινικό οξύ, δηλαδή η ουσία που διαθέτει τα περισσότερα υδροξύλια (-OH) και καρβοξύλια (-COOH), είναι η ουσία με τη μέγιστη πολικότητα, άρα και υδροφιλία, ενώ ακολουθεί και το καφεϊκό οξύ. Αντίστοιχα, η σειρά πολικότητας των 4 διαλυτών είναι η ακόλουθη (παρατίθενται με σειρά φθίνουσας πολικότητας): $H_2O > EtOH > EAc > DE$. Συνεπώς, με τη χρήση του νερού, που είναι ο πολικότερος διαλύτης όλων, επιτυγχάνεται εκχύλιση μεγάλης ποσότητας ροσμαρινικού οξέος και άλλων πολικών ενώσεων, ενώ, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης έναν με χαμηλότερη πολικότητα, συμπαρασύρονται περισσότερες ενώσεις με λιγότερες πολικές ομάδες (π.χ. υδροξυλομάδες) στο μόριό τους (Galanakis et. al., 2013).

5.2 Αποτελέσματα υδρο-ατμοαπόσταξης

Μέσω της απόσταξης με υδρατμούς, παρελήφθη από το δίκταμο το αιθέριο έλαιό του. Τοποθετήθηκαν 321g δίκταμου μαζί με 4L νερού σε εργαστηριακή διάταξη απόσταξης. Έπειτα, οι παραγόμενοι υδρατμοί συμπαρέσυραν τα πτητικά συστατικά του δίκταμου, ενώ το μίγμα ατμών – αιθερίου ελαίου συμπυκνώθηκε σε βαθμονομημένη στήλη, στην οποία και διαχωρίστηκαν οι 2 φάσεις, δηλαδή το αιθέριο έλαιο και το ανθόνερο (Εικόνα 5.1).

Ορισμένοι ατμοί δεν πέρασαν στη στήλη, και επανασυμπυκνώθηκαν στο δοχείο με το νερό και το δίκταμο. Έτσι, έγινε μία μικρότερης κλίμακας εκχύλιση με τους συμπυκνωμένους ατμούς να διαβρέχουν το φυτό, και τα εκχυλιζόμενα συστατικά να καταλήγουν στο υπόλειμμα.

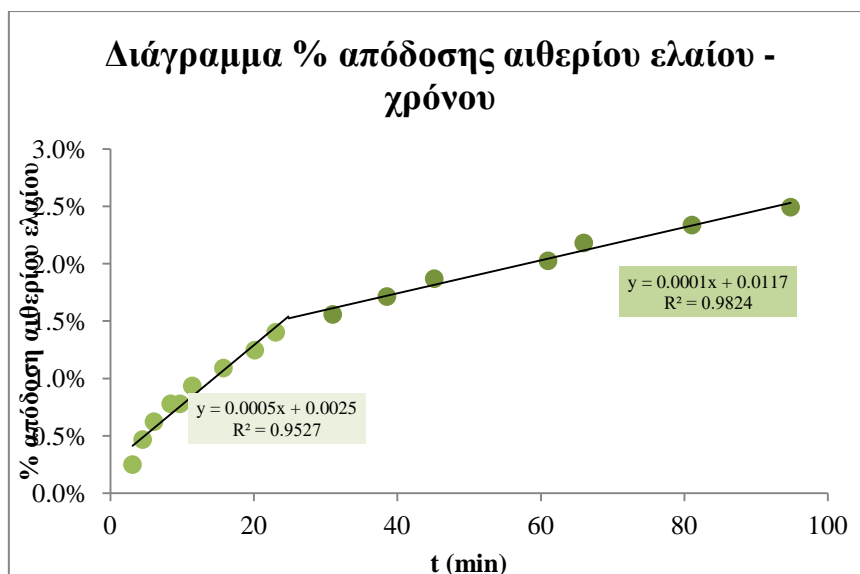


Εικόνα 5.1 – (1) Αιθέριο έλαιο, (2) Ανθόνερο.

Στον Πίνακα XXV του Παραρτήματος Π6, παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά στοιχεία για την απόσταξη, δηλαδή η μάζα του δίκταμου πριν και μετά την ήπια ξήρανση που υπέστη στο τέλος της απόσταξης, ο όγκος του ανθόνερου και του υπολείμματος της απόσταξης, τα ολικά στερεά (TS) που βρίσκονται στο υπόλειμμα, καθώς ο όγκος και η απόδοση του αιθερίου ελαίου. Η απόδοση της διεργασίας σε αιθέριο έλαιο ισούται με 2.5%, ποσοστό μεγαλύτερο από το αναμενόμενο, εάν αναλογιστεί κανείς ότι η μέση απόδοση είναι περίπου ίση με 1.1%.

5.2.1 Αιθέριο έλαιο

Σύμφωνα με τα στοιχεία που εντοπίζονται στο Παράρτημα Π6, τα οποία αφορούν την απόδοση επί τοις εκατό για το αιθέριο έλαιο, κατασκευάζεται το παρακάτω διάγραμμα, στο οποίο οπτικοποιείται η χρονική εξέλιξή της.



Διάγραμμα 5.12 – Διάγραμμα απόδοσης – χρόνου για το αιθέριο έλαιο.

Μέχρι περίπου τα 25 min, η απόδοση του αιθερίου ελαίου αυξάνεται ταχύτατα, ενώ μετά ο ρυθμός παραλαβής του, αρχίζει να μειώνεται. Εάν, μάλιστα, εφαρμοστεί γραμμική τάσης στις 2 περιόδους της παραλαβής του ελαίου, δηλαδή πριν και μετά τα 25 min, γίνεται σαφές από τις κλίσεις των 2 ευθειών ότι, ο ρυθμός με τον οποίο παραλαμβάνεται το αιθέριο έλαιο το πρώτο χρονικό διάστημα είναι πενταπλάσιος (0.0005 min^{-1}) από το ρυθμό παραλαβής μετά τα 25 min (0.0001 min^{-1}). Στα 25 λεπτά υπολογίζεται ότι έχουν παραληφθεί 4.9 mL ελαίου, δηλαδή πάνω από το 60% του συνολικού.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο αιθέριο έλαιο βρίσκονται τα πτητικά συστατικά του φυτού. Στο αιθέριο έλαιο του συγκεκριμένου πειράματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση GC-MS, προκειμένου να εντοπιστούν τα συστατικά του. Η % περιεκτικότητα της κάθε ουσίας υπολογίστηκε ως εξής: % περιεκτικότητα =

$$\frac{E_{\text{ουσίας}}}{\Sigma \text{Εμβαδών}} \cdot 100\%.$$

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.12 – Ανάλυση GC-MS στο αιθέριο έλαιο.

Ένωση	Χρόνος έκλουσης (min)	Εμβαδό ουσίας	% περιεκτικότητα ουσίας στο αιθέριο έλαιο
alpha-thujene	4.153	39684	1.8
alpha-pinene	4.153	38602	1.7
beta-myrcene	4.997	39100	1.8
alpha-terpinene	5.395	58777	2.7
p-cymene	5.508	351613	15.9
gamma-terpinene	5.962	321656	14.5
thymoquinone	8.302	16032	0.7
carvacrol	8.851	1246742	56.4
a-copaene	9.541	44221	2.0
trans-caryophyllene	9.978	54860	2.5
Σύνολο:		2211287	-

Κοιτώντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, φαίνεται πως η ουσία που βρίσκεται σε πλειοψηφία στο αιθέριο έλαιο του δίκταμου είναι η καρβακρόλη, σε ποσοστό 56.4%. Ακολουθεί το p-κυμένιο, με ποσοστό 15.9% και το γ-τερπινένιο, σε ποσοστό 14.5%, ενώ η θυμοκινόνη βρίσκεται σε ίχνη στο αιθέριο έλαιο (0.7%). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες σχετικά με το αιθέριο έλαιο του δίκταμου, καθώς και τη μεγάλη περιεκτικότητά του σε καρβακρόλη, p-κυμένιο, γ-τερπινένιο κ.ά. (Mitropoulou et. al., 2015).

5.2.2 Υπόλειμμα απόσταξης με υδρατμούς

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ορισμένοι υδρατμοί δεν παρέλαβαν αιθέριο έλαιο, επομένως επέστρεψαν στο δοχείο που περιείχε το νερό που έβραζε και το φυτό, όπου και συμπυκνώθηκαν. Εάν μάλιστα ληφθεί υπ' όψιν και το γεγονός ότι, κατά την απόσταξη, η μικροδομή του δίκταμου υπέστη ενυδάτωση και διόγκωση, είναι λογικό να διεξήχθη μία μικρότερης κλίμακας υδατική εκχύλιση και τα εκχυλιζόμενα συστατικά να καταλήγουν στο υπόλειμμα. Πραγματοποιήθηκε, πρώτα από όλα, δοκιμή Folin – Ciocalteu στο υπόλειμμα, ενώ στη συνέχεια έγινε δοκιμή

DPPH και ανάλυση HPLC, για τον πλήρη χαρακτηρισμό του. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραπάνω αναλύσεων:

Πίνακας 5.13 – Αποτελέσματα αναλύσεων στο υπόλειμμα της απόσταξης του δίκταμου.

Ουσία / ομάδα ουσιών:	Συγκέντρωση (mg / g TS)	Συγκέντρωση (mg / g φυτού)
Φαινολικά συστατικά	306 ± 20	5.0 ± 0.3
Αντιοξειδωτικές ουσίες	286 ± 30	4.6 ± 0.5
Ροσμαρινικό οξύ	51.7	0.8
Καφεϊκό οξύ	33.7	0.5
Φλαβονοειδή	39.5	0.6

Από τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι το υπόλειμμα της εκχύλισης περιέχει μία, όχι και τόσο αμελητέα, ποσότητα βιοδραστικών συστατικών. Τα παραπάνω στοιχεία, όπως θα δούμε παρακάτω, αποκαλύπτουν την καταστροφή ή όχι των βιοδραστικών συστατικών κατά τη θερμική επεξεργασία, καθώς δικαιολογούν εν μέρει τη μεταβολή στη σύσταση των εκχυλισμάτων πριν και μετά την απόσταξη.

5.3 Αποτελέσματα εκχυλίσεων δίκταμου μετά την απόσταξη – Συγκριτική μελέτη

Έπειτα από την απόσταξη του φυτού, το δίκταμο ξηράνθηκε σε θερμοκρασία 40 °C, ενώ στη συνέχεια κονιοποιήθηκε και υπέστη διπλή εκχύλιση, πρώτα με ακετόνη και, στη συνέχεια, με νερό, ακολουθώντας παρόμοια διαδικασία με προηγούμενως. Κατά την άλεση η σκόνη δίκταμου που προέκυπτε ήταν τόσο λεπτόκοκκη που περνούσε εξ' ολοκλήρου το κόσκινο των 850 μm. Επιπλέον, ενώ το αλεσμένο φυτό τοποθετήθηκε και πακτώθηκε στον εκχυλιστήρα με τον ίδιο τρόπο όπως και προηγούμενως, στην πραγματικότητα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα μικρότερη από αυτή της εκχύλισης του μη απειλαιωμένου φυτού, δηλαδή περίπου 15g δίκταμου. Δηλαδή το υλικό ήταν πιο

εύκολα κονιοποιήσιμο και χαμηλότερου ειδικού βάρους, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί αφενός με την ενυδάτωση και διόγκωση του υλικού μέσω του ατμού κατά την απόσταξη και αφετέρου την απώλεια του αιθέριου ελαίου.

Και στις 2 διεργασίες εκχύλισης, μετρήθηκε ο όγκος του εκχυλίσματος, ενώ μέσω του στερεού υπολείμματος βρέθηκε η απόδοση της εκχύλισης. Υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) των εκχυλισμάτων μέσω Folin – Ciocalteu, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, μέσω δοκιμής DPPH, ενώ, σε αυτά πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ορισμένων συστατικών τους.

5.3.1 Απόδοση σε ολικά στερεά (TS)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δεδομένα για την απόδοσή του σε ολικά στερεά (TS), εκφρασμένη σε mg/g δίκταμου.

Πίνακας 5.14 - Αποτελέσματα ακετονικών και υδατικών εκχυλίσεων σε σκόνη απειλωμένου δίκταμου ως προς την απόδοση σε ολικά στερεά.

Διαλύτης	Απόδοση σε ολικά στερεά (mg/g δίκταμου)
Ακετόνη	42 ± 13
Νερό	211 ± 1

Στη συγκεκριμένη διεργασία, η διαφορά μεταξύ των ολικών στερεών που εκχυλίζονται με το νερό και με την ακετόνη έχει αμβλυνθεί. Η απόδοση της ακετονικής εκχύλισης έχει μειωθεί άνω του 52.5%, γεγονός που εξηγείται με βάση την αφαίρεση του αιθέριου ελαίου, άρα και των συστατικών που, υπό άλλες συνθήκες, θα εκχύλιζε η ακετόνη. Η απόδοση της υδατικής εκχύλισης είναι επίσης μειωμένη αλλά κατά 26%.

5.3.2 Ολικά φαινολικά συστατικά (TPC) και αντιριζική ικανότητα εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη παραλαβής TPC

Στα εκχυλίσματα του απειαιωμένου δίκταμου, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές Folin – Ciocalteu και DPPH, για να βρεθεί το φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική ικανότητά τους. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα για το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων ακετόνης και νερού.

Πίνακας 5.15 – Αποτελέσματα φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος ακετόνης, πριν και μετά την απόσταξη, καθώς και του αιθέριου ελαίου.

	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/ g TS)	Επί φυτού (mg GAE/ g φυτού)
<u>Πριν</u> την απόσταξη	265 ± 2	22.3 ± 0.1
Αιθέριο έλαιο	327.5*	-
<u>Μετά</u> την απόσταξη	154 ± 14	7 ± 3

*Επί αιθέριου ελαίου (mg/g αιθέριου ελαίου)

Πίνακας 5.16 - Αποτελέσματα φαινολικού περιεχομένου του εκχυλίσματος νερού, πριν και μετά την απόσταξη, καθώς και του υπολείμματος απόσταξης.

	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg GAE/ g TS)	Επί φυτού (mg GAE/ g φυτού)
<u>Πριν</u> την απόσταξη	370 ± 144	103 ± 29
<u>Υπόλειμμα</u> απόσταξης	306 ± 20	5.0 ± 0.3
<u>Μετά</u> την απόσταξη	250 ± 71	53 ± 15

Από τα αποτελέσματα του εκχυλίσματος του απειαιωμένου φυτού φαίνεται ότι οι αποδόσεις εκχύλισης φαινολικών συστατικών είναι πολύ χαμηλές. Στο ακετονικό εκχύλισμα, βλέπουμε μια απόδοση της τάξης των 7 mg GAE/g δίκταμου ενώ στο υδατικό 5.3 mg GAE/g δίκταμου. Οι αντίστοιχες αποδόσεις στο μη απειαιωμένο ήταν 22.3 και 103 mg GAE/g δίκταμου. Η σημαντική μείωση σε ολικές φαινόλες στο ακετονικό εκχύλισμα εξηγείται από την απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο περιέχει την μονοφαινόλη καρβακρόλη, η οποία αποκρίνεται στη

μέθοδο Folin-Ciocalteu. Έπειτα από μέτρηση των ολικών φαινολών επί του αιθερίου ελαίου, προέκυψε μία, διόλου αμελητέα, ποσότητα TPC, δηλαδή 327.5 mg GAE/g αιθερίου ελαίου (περίπου το 30% της ποσότητας του ελαίου είναι φαινόλες ισοδύναμες με γαλλικό οξύ).

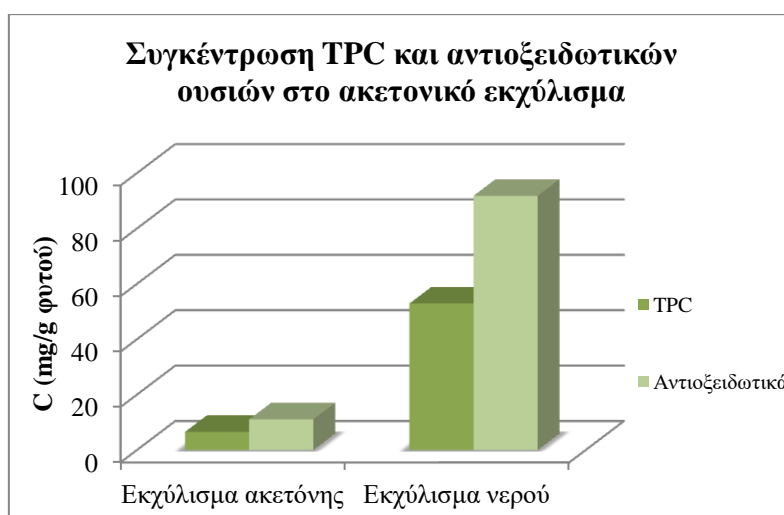
Αναφορικά με τα TPC του υδατικού εκχυλίσματος, εάν υποτεθεί το σενάριο ότι όλα τα φαινολικά κατά την απόσταξη παρέμειναν στο φυτό, και μικρή ποσότητα από αυτά πέρασε στο υπόλειμμα λόγω της εκχύλισης που πραγματοποιήθηκε εκεί, θα έπρεπε η συγκέντρωση των TPC στο νερό πριν την απόσταξη να είναι ίση με αυτήν μετά την απόσταξη αθροισμένη με τα TPC του υπολείμματος. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τις ανωτέρω συγκεντρώσεις, κάτι τέτοιο δεν ισχύει. Συνεπώς, μεγάλο μέρος των διαθέσιμων φαινολικών συστατικών στο δίκταμο καταστρέφεται σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Άλλωστε, στην απόσταξη, για τη δημιουργία ατμών, στο δοχείο που περιέχει το νερό και το φυτό επικρατεί θερμοκρασία της τάξης των 100 °C.

Η αλλαγή του φαινολικού περιεχομένου λόγω επιβολής θερμότητας δεν είναι πάντα αρνητική. Έχει αποδειχθεί ότι, σε άλλα αρωματικά φυτά, με την απόσταξη στο φυτό αυξάνεται η ικανότητα του νερού να εκχυλίσει μετέπειτα πολυφαινόλες. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του μελισσόχορτου (Στίνη, 2022), μέσω της απόσταξης με υδρατμούς, η δομή του φυτού διογκώθηκε, επομένως τα φαινολικά συστατικά εκχυλίστηκαν μετέπειτα με μεγαλύτερη ευκολία.

Επί ξηρών εκχυλισμάτων οι συγκεντρώσεις φαινολικών είναι επίσης χαμηλότερες. Ενώ χωρίς απόσταξη οι συγκεντρώσεις ολικών φαινολών προσδιορίστηκαν 265 και 370 mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος, στα εκχυλίσματα απειαιωμένου δίκταμου οι αντίστοιχες τιμές είναι 154 και 250 mg GAE/g ξηρού εκχυλίσματος. Παρά ταύτα, η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων είναι σημαντική, και στις 2 περιπτώσεις. Το ξηρό ακετονικό εκχύλισμα έχει υψηλότερη αντιριζική δράση αφού από 192 mg Trolox/g TS ανήλθε στα 289 mg Trolox/g TS. Η αύξηση αυτή είναι λογική καθώς μέσω της απόσταξης έχει απομακρυνθεί το αιθέριο έλαιο που έχει χαμηλή αντιοξειδωτική δράση. Η καρβακρόλη μάλιστα που αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου, έχει αποδειχτεί στο παρελθόν ότι μπορεί να έχει αντεργιστική δράση σε μίγματα αντιοξειδωτικών ουσιών (Tsimogiannis et. al., 2017). Ωστόσο το υδατικό εκχύλισμα φαίνεται ότι απώλεσε μέρος των ισχυρών του

αντιοξειδωτικών καθώς τα ισοδύναμα Trolox που περιέχει ανά μονάδα μάζας ξηρού εκχυλίσματος μειώθηκαν από 578 σε 435. Παρολαυτά εξακολουθεί να χαρακτηρίζεται ως υψηλής περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικά συστατικά.

Οπτικοποιείται σε διάγραμμα παρακάτω η αναλογία μεταξύ φαινολικών ουσιών και αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (Διάγραμμα 5.16). Αν συγκριθεί μάλιστα με το αντίστοιχο διάγραμμα που αφορά το μη απεσταγμένο δίκταμο (Διάγραμμα 5.2), μπορεί να παρατηρηθεί η αναστροφή στη συμπεριφορά του ακετονικού εκχυλίσματος.



Διάγραμμα 5.16 - Συγκέντρωση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων εκχυλισμάτων του απελαιωμένου δίκταμου.

Σε αυτή την περίπτωση, είναι ξεκάθαρο πως, και στα 2 εκχυλίσματα, η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών ξεπερνά αυτή των φαινολικών.

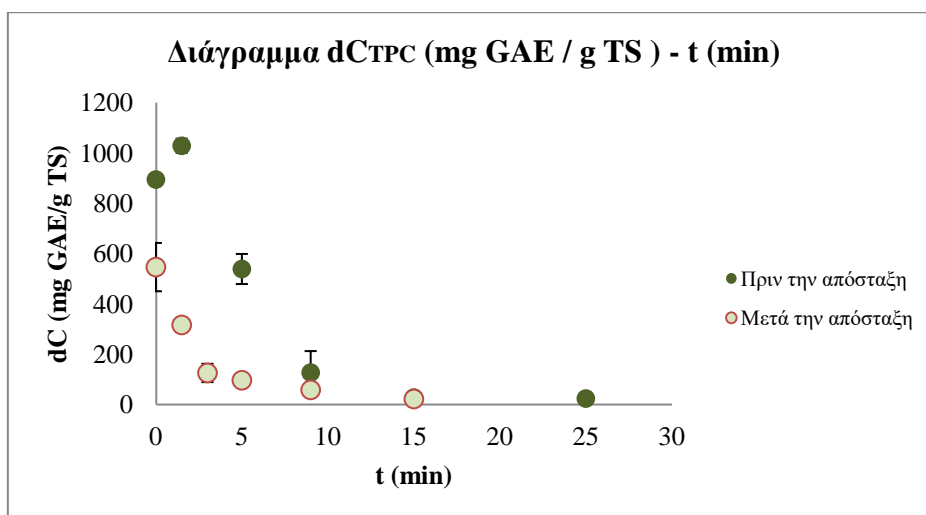
Κινητική μελέτη παραλαβής φαινολικών ουσιών

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται η μέση ροή του εκάστοτε διαλύτη κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης, καθώς και η απόδοση σε ολικά στερεά (TS) επί τοις εκατό. Ο υπολογισμός της ροής βασίζεται σε δεδομένα που παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π1.

Πίνακας 5.17 - Αποτελέσματα όγκου εκχυλίσματος (ακετόνης και νερού) και απόδοσης σε ολικά στερεά για τα κινητικά πειράματα εκχυλίσεων του απελαιωμένου φυτού.

Διαλύτης	Ροή διαλύτη (mL/min)	Απόδοση σε ολικά στερεά (mg/g δίκταμου)
Ακετόνη	6 ± 3	42 ± 10
Νερό	4 ± 2	181 ± 8

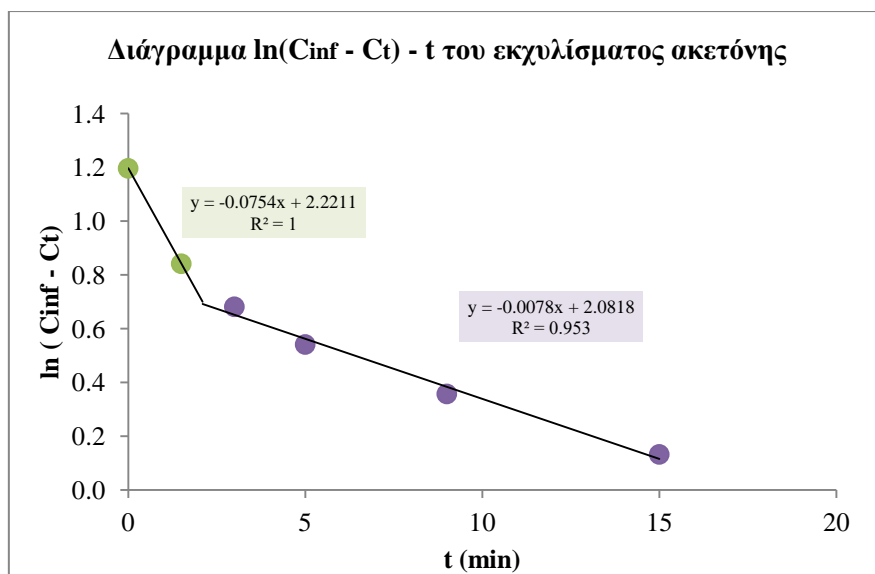
Αναφορικά με τα αποτελέσματα από την κινητική μελέτη της παραλαβής των φαινολικών ουσιών από τα 2 εκχυλίσματα, πριν και μετά την απόσταξη της φυτόμαζας, στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή της υπολειμματικής συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών στο δίκταμο κατά την εκχύλισή του με ακετόνη.



Διάγραμμα 5.17 – Διάγραμμα συγκέντρωσης TPC στο ακετονικό εκχύλισμα πριν και μετά την απόσταξη.

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι μετά την απόσταξη, δεν χρειάζεται χρόνο η ακετόνη για να εισχωρήσει στον κόκκο. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι έχει ήδη εισχωρήσει υδρατμός, επομένως η ακετόνη εκχυλίζει ευκολότερα συστατικά από αυτόν.

Συνεχίζοντας με τη μαθηματική επεξεργασία και την προσαρμογή των δεδομένων συγκέντρωσης στο 2^ο νόμο του Fick, στο Παράρτημα Π4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τον όρο $\ln(C_{inf} - C_t)$ της Σχέσης III για το εκχύλισμα του απεσταγμένου φυτού. Στο Διάγραμμα 5.18 παρουσιάζεται η εν λόγω σχέση.



Διάγραμμα 5.18 – Διάγραμμα $\ln(C_{inf} - C_t)$ για τα TPC του ακετονικού εκχυλίσματος του απειλαιωμένου φυτού.

Όπως και προηγουμένως, έτσι και στη μελέτη των φαινολών στο απεσταγμένο φυτό, κατά την εκχύλισή τους με ακετόνη, διακρίνονται 2 στάδια, η έκπλυση και η διάχυση. Προκύπτει από τα παραπάνω ότι η διάρκεια έκπλυσης στην εκχύλιση είναι ίση με 2 min. Ο χρόνος αυτός είναι σημαντικά μικρότερος, συγκριτικά με τον αντίστοιχο του μη απεσταγμένου φυτού (8.5 min), καθώς, με την αφαίρεση του αιθερίου ελαίου, τα περισσότερα άπολα συστατικά έχουν φύγει από το φυτό. Συνεπώς, οι ουσίες που εκχυλίζει η ακετόνη από τον εξωτερικό φλοιό των κόκκων του δίκταμου μετά την απόσταξή του είναι λιγότερες. Ο λόγος των ρυθμών των 2 σταδίων σε αυτή την περίπτωση (k_1/k_2) είναι ίσος με 9.7, όμως δεν είναι απόλυτα αντιπροσωπευτικός, καθώς τα σημεία που χαρακτηρίζουν το πρώτο στάδιο είναι 2, επομένως χρειάζονται πιο συχνές δειγματοληψίες στα πρώτα λεπτά.

Παρακάτω παρουσιάζονται η διάρκεια του 1^{ου} σταδίου διάχυσης, δηλαδή της έκπλυσης, και ο λόγος των ρυθμών των 2 σταδίων για την εκχύλιση.

Πίνακας 5.18 – Διάρκεια έκπλυσης και λόγος ρυθμών των 2 σταδίων για την εκχύλιση με ακετόνη.

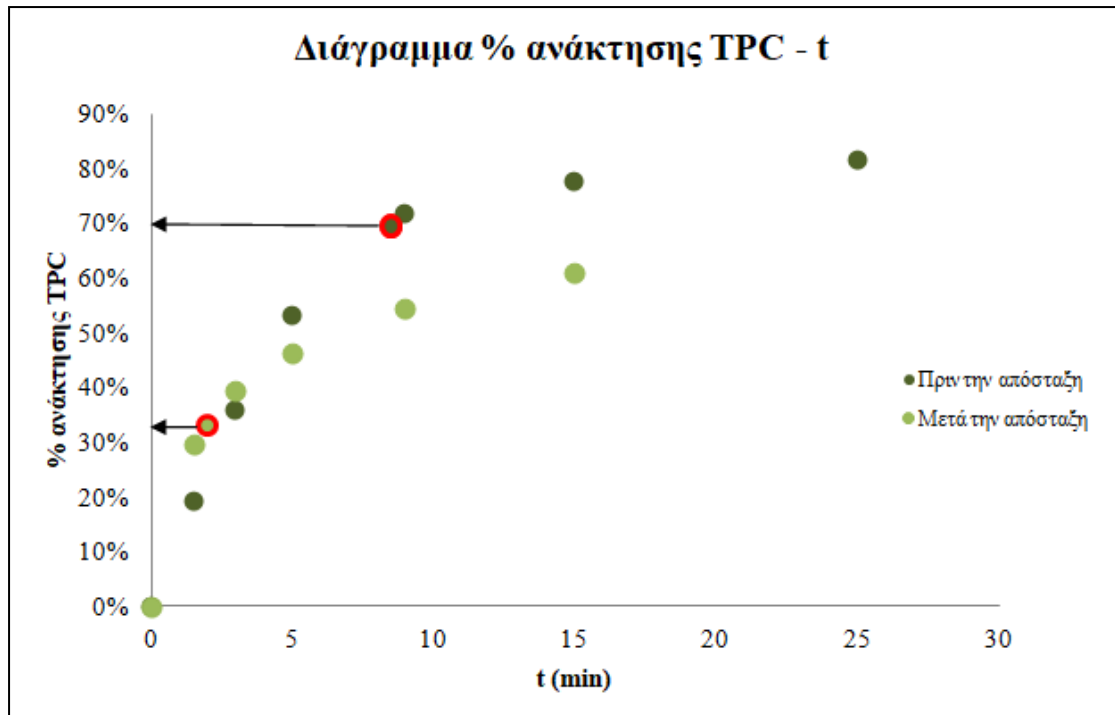
	Διάρκεια έκπλυσης (min)	Λόγος ρυθμών 2 σταδίων
Πριν την απόσταξη	8.5	8.6
Μετά την απόσταξη	2	9.7

Η μεγαλύτερη αλλαγή που υπέστη το εκχύλισμα είναι στη διάρκεια της έκπλυσης. Μάλιστα, από τα 8.5 min που διαρκούσε πριν την απόσταξη, πλέον απαιτούνται μόνο 2 min για την έκπλυση των επιφανειακών φαινολικών ουσιών. Εφόσον έχει γίνει απελαίωση, τα συστατικά του κόκκου του δίκταμου που βρίσκονται στην εξωτερική του επιφάνεια έχουν φύγει από αυτόν, άρα και απαιτείται μικρότερο χρονικό διάστημα για την απομάκρυνσή τους.

Στον Πίνακα 5.19 παρουσιάζεται η επί τοις % αύξηση της συγκέντρωσης των TPC στα 2 εκχυλίσματα ακετόνης με την πάροδο του χρόνου, όπου υπολογίζεται ως εξής: $\% \text{ αύξηση} = \frac{C_t}{C_{inf}} \cdot 100\%$. Στο Διάγραμμα 5.19 η εν λόγω αύξηση οπτικοποιείται, ενώ με κόκκινο περίγραμμα παρουσιάζεται το σημείο που τελειώνει η έκπλυση, και στις 2 περιπτώσεις.

Πίνακας 5.19 - Ποσοστιαία αύξηση των φαινολών στο εκχύλισμα ακετόνης, για τα πρώτα 15 λεπτά της εκχύλισης.

t (min)	% αύξηση TPC	
	Πριν την απόσταξη	Μετά την απόσταξη
0	0%	0%
1.5	19%	30%
3	36%	39%
5	53%	46%
9	72%	54%
15	78%	61%



Διάγραμμα 5.19 - Διάγραμμα ανάκτησης φαινολικών συστατικών, στο εκχύλισμα ακετόνης του απεσταγμένου φυτού, με το χρόνο.

Διαπιστώνεται ότι, με τη διακοπή της ακετονικής εκχύλισης του μη απεσταγμένου φυτού στα 15 min, μπορεί να παραληφθεί περίπου το 80% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, σε αντίθεση με το μη απελαιωμένο δείγμα, όπου γίνεται λόγος για 61% των διαθέσιμων φαινολικών, καθώς μεγάλο μέρος τους έχει καταστραφεί. Στο σημείο έκπλυσης, στην περίπτωση του μη απεσταγμένου δίκταμου, παραλαμβάνεται το 70% της διαθέσιμης ποσότητας φαινολικών, σε αντίθεση με το δείγμα του απεσταγμένου φυτού, όπου μόλις το 33% των ολικών φαινολικών έχει περάσει στο εκχύλισμα.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που εξετάζεται η επίδραση ή όχι της θερμικής διεργασίας σε αυτόν, είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων του δίκταμου. Παρακάτω παρατίθενται τα κατάλληλα δεδομένα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών στα εκχυλίσματα ακετόνης και νερού, μαζί με τα αντίστοιχα στοιχεία του υπολείμματος.

Πίνακας 5.20 - Αποτελέσματα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών του εκχυλίσματος ακετόνης, πριν και μετά την απόσταξη, καθώς και του υπολείμματος απόσταξης.

	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg Trolox/g TS)	Επί φυτού (mg Trolox/ g φυτού)
<u>Πριν</u> την απόσταξη	192 ± 9	16 ± 1
<u>Μετά</u> την απόσταξη	289 ± 162	11 ± 3

Πίνακας 5.21 - Αποτελέσματα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών του εκχυλίσματος νερού, πριν και μετά την απόσταξη, καθώς και του υδατικού υπολείμματος της απόσταξης.

	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg Trolox/g TS)	Επί φυτού (mg Trolox/g φυτού)
<u>Πριν</u> την απόσταξη	578 ± 171	162 ± 30
<u>Υπόλειμμα</u> απόσταξης	286 ± 30	4.6 ± 0.5
<u>Μετά</u> την απόσταξη	435 ± 43	92 ± 10

Στην περίπτωση της αντιριζικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, δεν φαίνεται σημαντική μεταβολή. Στο εκχύλισμα ακετόνης, η εκλεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά φαίνεται να έχει αυξηθεί, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στην απομάκρυνση του χαμηλής αντιριζικής δράσης αιθέριου ελαίου. Αντίθετα, στο υδατικό εκχύλισμα σημειώνεται μεγαλύτερη μεταβολή στην αντιριζική ικανότητα. Λόγω της απόσταξης, το εκχύλισμα νερού έχασε το 43% των αντιριζικών ουσιών του. Η απώλεια αυτή είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με το εκχύλισμα ακετόνης, όπου εμφανίζει μείωση 31%.

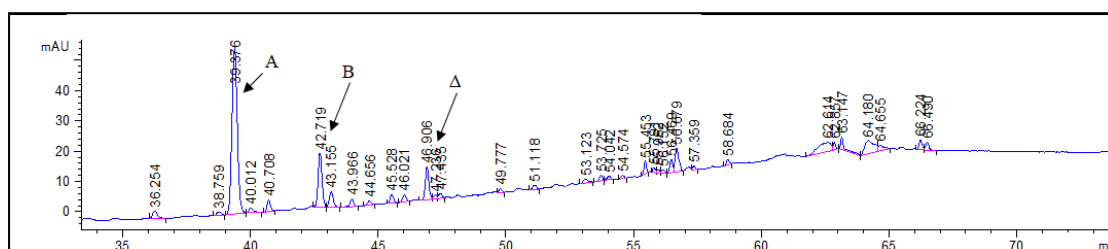
Από τα παραπάνω, και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα φαινολικά συστατικά των 2 εκχυλισμάτων, συνεπάγεται ότι το εκχύλισμα νερού υποβαθμίστηκε, καθώς και οι πολικές ουσίες που αυτό συμπεριλαμβάνει, υπέστησαν τη μεγαλύτερη αλλαγή λόγω της επιβολής θερμότητας στην πρώτη ύλη της εκχύλισης. Η επικρατέστερη εξήγηση σε αυτό είναι ότι, οι ουσίες που εκχυλίζονται με διαλύτη την ακετόνη, όπως για παράδειγμα η θυμοκινόνη και η καρβακρόλη, είναι περισσότερο ανθεκτικές στη θερμότητα, σε σύγκριση με τις πολικές ενώσεις του υδατικού εκχυλίσματος (π.χ. παράγωγα καφεϊκού οξέος). Μένει να εξεταστούν ξεχωριστά οι εν λόγω ενώσεις όσον αφορά την επίδραση της υδρο-ατμοαπόσταξης σε αυτές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να διαψευστεί το παραπάνω συμπέρασμα.

5.3.3 Ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων – Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ακετόνης

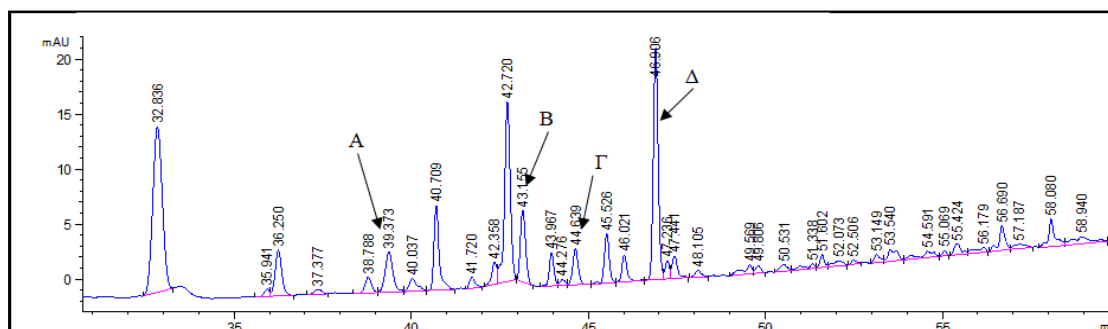
Ανάλυση HPLC του εκχυλίσματος ακετόνης.

Η ανάλυση πραγματοποιείται στα 257 nm, στα 280 και στα 445 nm. Επιπλέον, ενώ εντοπίζονται οι ίδιες ουσίες με προηγούμενως (βλ. Πίνακα 5.7 του κεφαλαίου 5.1.3), στην παρούσα περίπτωση ποσοτικοποιούνται μόνο η θυμοκινόνη και η καρβακρόλη, δηλαδή οι ουσίες ενδιαφέροντος.

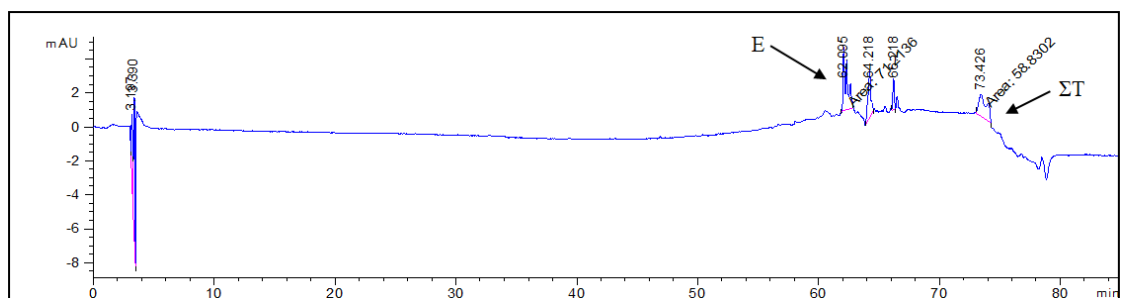
Στα παρακάτω σχήματα φαίνονται 2 χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα, στα 257 nm, στα 280 και στα 445 nm, του εκχυλίσματος ακετόνης. Όλα τα χρωματογραφήματα της διπλής επανάληψης της ακετονικής εκχύλισης του απεσταγμένου φυτού παρατίθενται στο Παράρτημα Π5.



Σχήμα 5.7 - Χρωματογράφημα του ακετονικού εκχυλίσματος του απεσταγμένου φυτού στα 257 nm.



Σχήμα 5.8 - Χρωματογράφημα του ακετονικού εκχυλίσματος του απεσταγμένου φυτού στα 280 nm.



Σχήμα 5.9 - Χρωματογράφημα του ακετονικού εκχυλίσματος του απεσταγμένου φυτού στα 445 nm.

Υπενθυμίζεται ότι οι ουσίες που έχουν ταυτοποιηθεί στα ανωτέρω χρωματογραφήματα είναι (Α) η θυμοκινόνη, (Β) ένα φλαβονοειδές, (Γ) η καρβακρόλη, (Δ) ο αιθυλαιθέρας της επιροσμανόλης, (Ε) η λουτεΐνη και (ΣΤ) το β-καροτένιο.

Οι συγκεντρώσεις της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς, και με τις Σχέσεις I και II, εκφρασμένες σε mg/g TS και mg/g ξηρού φυτού. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.22 – Συγκέντρωση θυμοκινόνης και καρβακρόλης πριν και μετά την απόσταξη του φυτού.

	Θυμοκινόνη		Καρβακρόλη	
	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg/g TS)	Επί φυτού (mg/g)	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg/g TS)	Επί φυτού (mg/g)
Πριν την απόσταξη	22 ± 2	1.9 ± 0.2	257 ± 16	22 ± 1
Μετά την απόσταξη	4 ± 1	0.144 ± 0.007	19 ± 2	0.9 ± 0.2
Καροτενοειδή				
	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg/g TS)	Επί φυτού (mg/g)		
Πριν την απόσταξη	21.3 ± 0.7	1.8 ± 0.2		
Μετά την απόσταξη	10*	0.5*		

*Δεν εντοπίστηκε β-καροτένιο.

Όπως βλέπουμε από τα παραπάνω, η θυμοκινόνη και η καρβακρόλη υπέστησαν σημαντικές αλλαγές. Η συγκέντρωση της πρώτης μειώθηκε κατά 92%, ενώ της δεύτερης κατά 95%. Όσον αφορά την καρβακρόλη, έχει περάσει στο αιθέριο έλαιο, όμως η θυμοκινόνη είτε έχει καταστραφεί λόγω της θερμότητας είτε να έχει επίσης περάσει στο αιθέριο έλαιο. Κοιτώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης GC-MS του αιθερίου ελαίου του δίκταμου (βλ. Πίνακας 5.12 του κεφαλαίου 5.2), φαίνεται ότι, πάνω από το 50% του αιθερίου ελαίου αποτελείται από καρβακρόλη, ενώ η θυμοκινόνη βρίσκεται σε ίχνη (0.7%). Συνεπώς, το πιθανότερο σενάριο για αυτή την αλλαγή είναι ότι η θυμοκινόνη καταστράφηκε κατά την απόσταξη, ενώ η καρβακρόλη παραλήφθηκε εξ' ολοκλήρου από τους υδρατμούς. Αυτή η πληροφορία έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη, σύμφωνα με την οποία η θυμοκινόνη έχει επιδείξει ευαισθησία σε υψηλές θερμοκρασίες (Goyal et. al., 2017). Τέλος, η απόσταξη οδήγησε σε 69% απώλεια των καρποτενοειδών του φυτού.

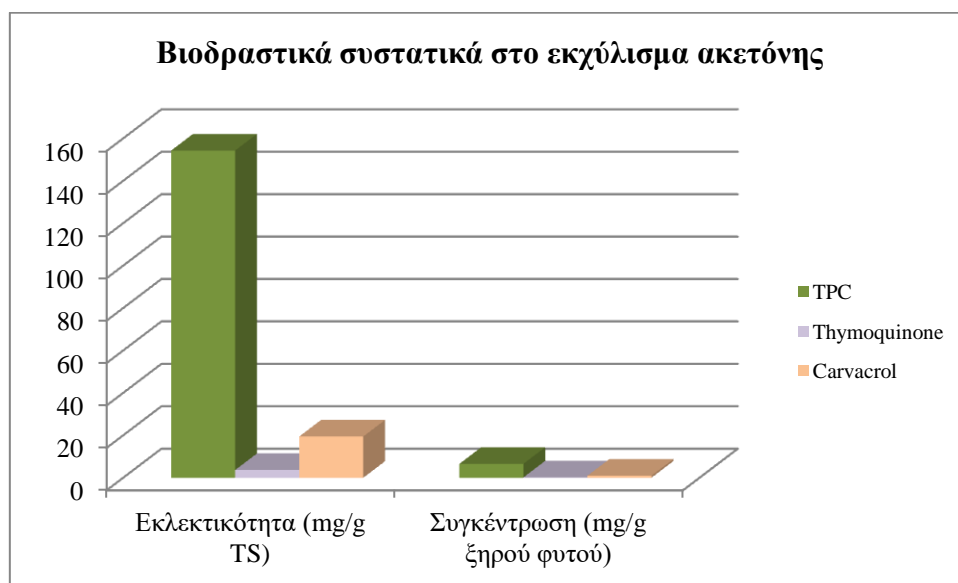
Όπως προκύπτει, η απόσταξη οδήγησε σε σημαντική απώλεια θυμοκινόνης. Η θυμοκινόνη, όπως έχει εξηγηθεί παραπάνω είναι ένα συστατικό υψηλής σημασίας για το παραγόμενο ακετονικό εκχύλισμα, και η απώλειά της, σε αντίθεση με την καρβακρόλη, είναι μη επιθυμητή. Η θυμοκινόνη βρίσκεται σε στερεά κατάσταση σε συνθήκες περιβάλλοντος, ωστόσο το σημείο βρασμού της κυμαίνεται από 230-232°C. Συνεπώς, σε χαμηλή θερμοκρασία η ουσία δεν ανιχνεύεται με την όσφρηση, σε αντίθεση με τα υγρά συστατικά των αιθέριων ελαίων, όπως την καρβακρόλη, παρολαυτά υπάγεται στα πτητικά συστατικά και είναι λογικό να εντοπίζεται μετέπειτα στα συστατικά του παραλαμβανόμενου αιθερίου ελαίου. Η περιεκτικότητα σε θυμοκινόνη επί φυτού έχει μειωθεί κατά 92%, μέσω της απόσταξης, ενώ επί του στερεού εκχυλίσματος κατά 82%.

Ένα ακετονικό εκχύλισμα μη απεσταγμένου δίκταμου θα είναι έντονα οσμηρό, οπότε η χρήση του ενδέχεται να υπάγεται σε περιορισμούς ανάλογα με το προϊόν εφαρμογής. Η απομάκρυνση λοιπόν του αιθερίου ελαίου είναι σημαντική διεργασία για την παραγωγή ενός ήπιου οργανοληπτικά εκχυλίσματος. Η ταυτόχρονη απομάκρυνση όμως και της θυμοκινόνης, μαζί με το αιθέριο έλαιο, αποτελεί ένα πρόβλημα που θα χρειαστεί περαιτέρω διερεύνηση στο μέλλον, καθώς είναι ένα από τα βιοδραστικά συστατικά που θέλουμε να παραμείνει εντός του φυτού, ώστε να παραληφθεί μετέπειτα με ένα διαλύτη χαμηλής πολικότητας.

Υπό το πρίσμα των παραπάνω είναι σημαντικό να απαντηθεί εάν η παρατηρούμενη μείωση της θυμοκινόνης, επί φυτού, από την απόσταξη, ισούται με την ποσότητα θυμοκινόνης εντός του αιθέριου ελαίου ή υπάρχουν και περαιτέρω απώλειες λόγω της θερμικής καταπόνησης του φυτού.

Γενικά η εκλεκτικότητα των ουσιών είναι χαμηλή, επομένως γίνεται αντιληπτό ότι, στα εκχυλιζόμενα στερεά υπάρχουν πολύ μικρές ποσότητες καρβακρόλης και θυμοκινόνης. Παρόλα αυτά, η υπεροχή της καρβακρόλης στο εκχύλισμα συνεχίζει να υπάρχει, καθώς η περιεχόμενη ποσότητά της στα στερεά είναι υπερτετραπλάσια από αυτή της θυμοκινόνης. Η ίδια τάση εμφανίζεται και στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, ως προς το ξηρό βάρος του φυτού.

Στο παρακάτω διάγραμμα, οπτικοποιούνται οι αναλογίες μεταξύ των βιοδραστικών συστατικών στο απεσταγμένο φυτό.



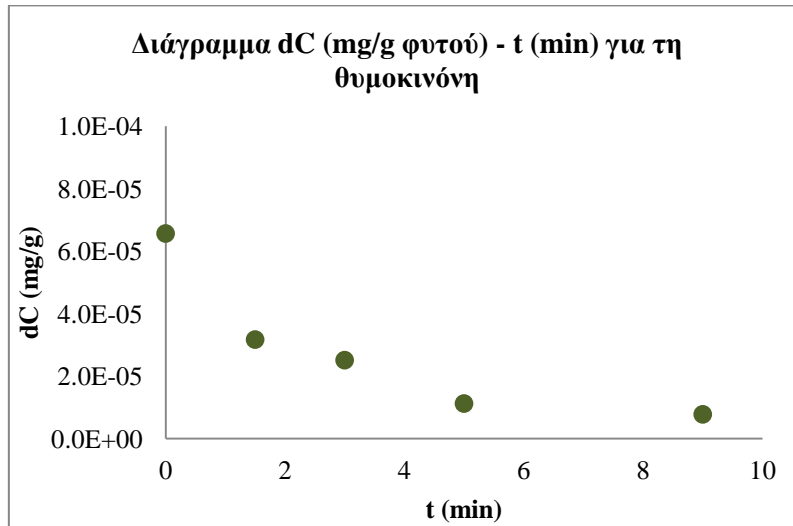
Διάγραμμα 5.20 – Βιοδραστικά συστατικά στο εκχύλισμα ακετόνης του απεσταγμένου φυτού.

Ανάλυση HPLC στο κινητικό πείραμα εκχύλισης με ακετόνη

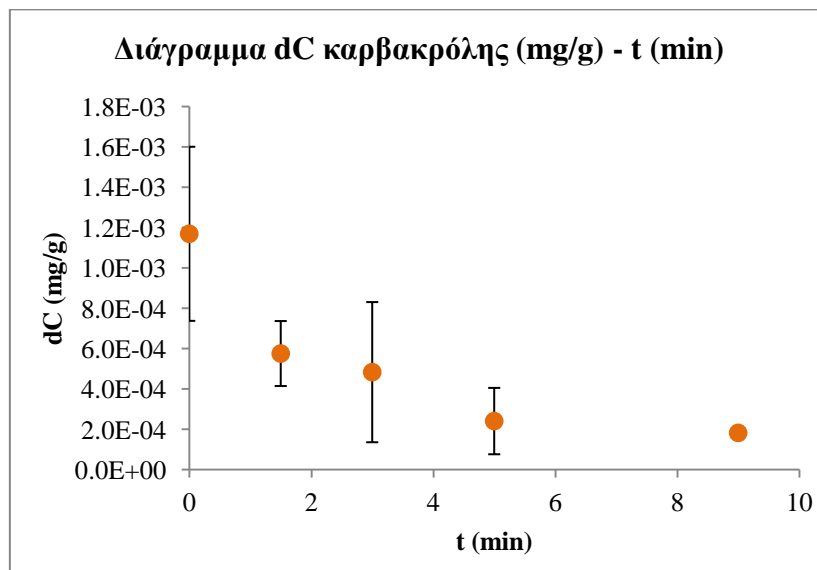
Για την εύρεση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις HPLC στα δείγματα που λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με Erpendorf.

Υπολογίστηκε η διαφορική συγκέντρωση των 2 ουσιών στο κάθε δείγμα, εκφρασμένη ως προς mg/g ξηρού βάρους φυτού (dC_i). Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Π4. Τα αποτελέσματα για τις διαφορικές συγκεντρώσεις στα δείγματα εκχυλισμάτων ακετόνης παρουσιάζονται στους αντίστοιχους του ίδιου

παραρτήματος. Στα παρακάτω διαγράμματα, παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή της διαφορετικής υπολειμματικής συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης στο φυτό.



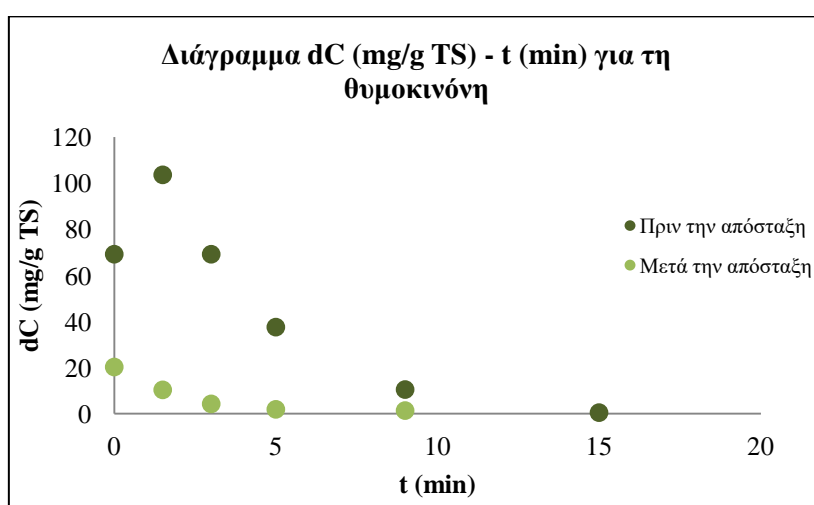
Διάγραμμα 5.21 – Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της υπολειμματικής συγκέντρωσης της θυμοκινόνης στο απεσταγμένο φυτό.



Διάγραμμα 5.22 - Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της υπολειμματικής συγκέντρωσης της καρβακρόλης στο απεσταγμένο φυτό.

Παρατηρείται ότι η συμπεριφορά της εξάντλησης των 2 ουσιών από το δίκταμο είναι ταυτόσημη. Εφόσον οι ιστοί του φυτού έχουν διόγκωθεί από τους διερχόμενους ατμούς της απόσταξης, δεν εμφανίζεται στην αρχή χρόνος υστέρησης κατά την εκχύλιση με ακετόνη, όπως δηλαδή γινόταν στην περίπτωση του μη απεσταγμένου φυτού (βλ. Διαγράμματα 5.9, 5.10). Η πτώση της συγκέντρωσης ξεκινάει απευθείας, ενώ μετά από τα 5 πρώτα λεπτά, βλέπουμε μια σταθεροποίηση της υπολειμματικής ποσότητας των ουσιών, άρα και τον τερματισμό της εκχύλισής τους.

Ας δούμε σε αυτό το σημείο τη χρονική εξέλιξη της εκχυλιζόμενης θυμοκινόνης, πριν και μετά την απόσταξη της φυτόμαζας, στο παρακάτω διάγραμμα.

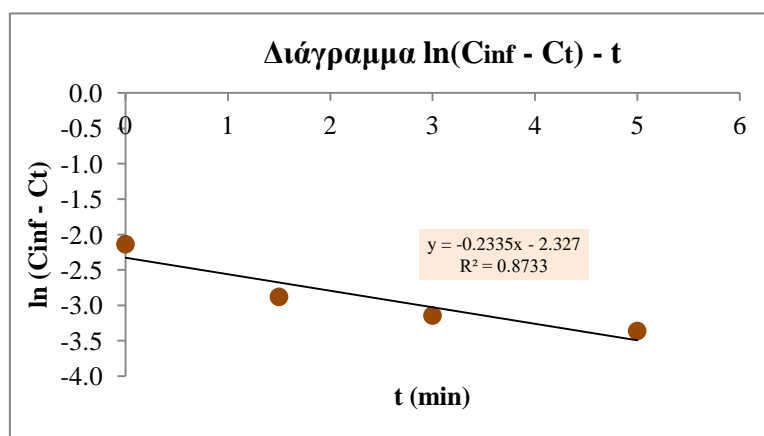


Διάγραμμα 5.23 – Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης της εκχυλιζόμενης θυμοκινόνης, πριν και μετά την απόσταξη του φυτού.

Μετά την εισχώρηση του ατμού στη δομή των ιστών του φυτού, η ακετόνη διέρχεται μέσα από αυτόν ευκολότερα, επομένως ξεκινά απευθείας η εκχύλιση. Το γεγονός αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τη συμπεριφορά των φαινολικών ουσιών, πριν και μετά την απόσταξη. Επιπλέον, η συγκέντρωση της θυμοκινόνης στο απεσταγμένο φυτό στην αρχή της εκχύλισης είναι σαφώς μικρότερη, επομένως εξαντλείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Κοιτώντας το Διάγραμμα 5.25, παρατηρούμε ότι η κινητική εξάντλησης της θυμοκινόνης είναι ενός σταδίου, κάτι το οποίο επιβεβαιώνει την παραπάνω πληροφορία.

Συνεχίζοντας με τη μαθηματική επεξεργασία και την προσαρμογή των δεδομένων συγκέντρωσης στο 2^ο νόμο του Fick, στον αντίστοιχο πίνακα του παραρτήματος Π4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τον όρο $\ln(C_{inf} - C_t)$ της

Σχέσης III για την περίπτωση της θυμοκινόνης, ενώ στα παρακάτω διαγράμματα αποτυπώνεται η εν λόγω σχέση διαγραμματικά.

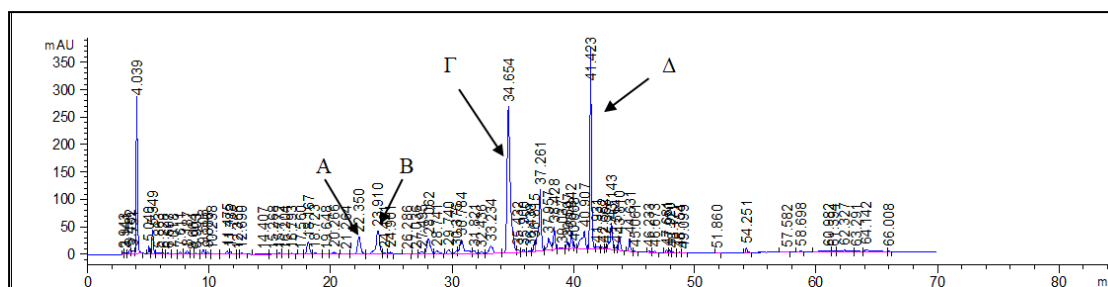


Διάγραμμα 5.24 - Διάγραμμα $\ln(C_{inf} - C_t) - t$ για την εξέλιξη της θυμοκινόνης του εκχυλίσματος ακετόνης του απεσταγμένου φυτού.

Εφόσον έχει προηγηθεί απόσταξη, άρα και αφαίρεση του αιθερίου ελαίου του φυτού, οι κόκκοι του έχουν διογκωθεί. Επομένως, η εκχύλιση της θυμοκινόνης εμφανίζει ενιαία κινητική από την αρχή, όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα. Για την περίπτωση της καρβακρόλης, η μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων κρίθηκε ως μη σκόπιμη, εφόσον η περισσότερη ποσότητά της περιέχεται στο αιθέριο έλαιο.

Ανάλυση HPLC του εκχυλίσματος νερού.

Στο σχήμα που φαίνεται παρακάτω, παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα των 280 nm του απεσταγμένου φυτού, μαζί με τις κορυφές που ταυτοποιούνται. Στο παράρτημα Π5 φαίνονται όλα τα χρωματογραφήματα.



Σχήμα 5.10– Χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος του απεσταγμένου δίκταμου στα 280 nm.

Υπενθυμίζεται ότι, οι 5 κορυφές που αναγνωρίστηκαν είναι: (Α) η φλαβαν-3-όλη, (Β) φλαβόνη, (Γ) το ροσμαρινικό οξύ και (Δ) το καφεϊκό οξύ.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού οξέος, των λοιπών παραγώγων του καφεϊκού οξέος και των φλαβονοειδών ως ισοδύναμα κερκετίνης, ως προς mg/g TS και ως προς mg/g ξηρού βάρους φυτού, για την περίπτωση του απεσταγμένου και του μη απεσταγμένου φυτού.

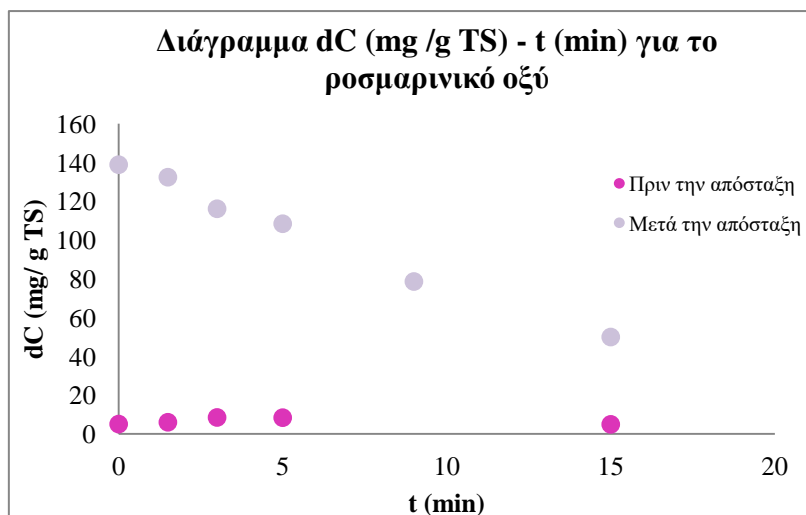
Πίνακας 5.23 – Βιοδραστικά συστατικά στο υδατικό εκχύλισμα του φυτού, πριν και μετά την απόσταξη.

	Ροσμαρινικό οξύ		Παράγωγα καφεϊκού οξέος	
	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg/g TS)	Επί φυτού (mg/g)	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg/g TS)	Επί φυτού (mg/g)
Πριν την απόσταξη	27 ± 19	8 ± 6	46 ± 22	14 ± 8
Υπόλειμμα απόσταξης	51.7	0.8	33.7	0.5
Μετά την απόσταξη	59 ± 10	12 ± 2	52 ± 12	11 ± 1
	Φλαβονοειδή			
	Επί ξηρού εκχυλίσματος (mg querc./g TS)	Επί φυτού (mg querc./g)		
Πριν την απόσταξη	86 ± 1	86 ± 1		
Υπόλειμμα απόσταξης	39.5	39.5		

Μετά την απόσταξη	78 ± 24	78 ± 24
--------------------------	---------	---------

Σε αντίθεση με τα άπολα συστατικά του δίκταμου, όπως φαίνεται παραπάνω, τα πολικά βιοδραστικά συστατικά του δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά. Αντίθετα, η συγκέντρωση ορισμένων συστατικών αυξήθηκε. Η συγκέντρωση και η εκλεκτικότητα του ροσμαρινικού οξέος αυξήθηκε κατά 50% και 103% αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των παραγώγων του καφεϊκού οξέος μειώθηκε κατά 21%, ενώ μικρή ποσότητα αυτού εντοπίζεται στο υπόλειμμα της απόσταξης. Αναφορικά με τα συνολικά φλαβονοειδή, η συγκέντρωσή τους υπέστη μία μικρή μείωση, της τάξης του 30%.

Όσον αφορά το ροσμαρινικό οξύ, η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσής του στο υδατικό εκχύλισμα του απεσταγμένου φυτού οφείλεται στο γεγονός ότι η μικροδομή του διαρρήχθη, άρα εκχυλίστηκε πολύ ευκολότερα, σε σύγκριση με προηγουμένως. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί κοιτώντας το διάγραμμα της συγκέντρωσής του με την πάροδο της εκχύλισης, εκφρασμένη ανά μάζα ολικών στερεών (Διάγραμμα 5.25).



Διάγραμμα 5.25 – Χρονική εξέλιξη της υπολειμματικής συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος, πριν και μετά την απόσταξη του δίκταμου.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, στην περίπτωση του μη απελαιωμένου φυτού, η εκχύλιση της ουσίας γίνεται με πολύ αργούς ρυθμούς και ενδεχομένως είναι ελλιπής. Μετά την απελαίωσή του, παρατηρείται μία σχεδόν γραμμική μείωση της

συγκέντρωσης του οξέος, το οποίο με τη σειρά του σημαίνει ότι η ουσία περνάει στο εκχύλισμα μέσω του νερού.

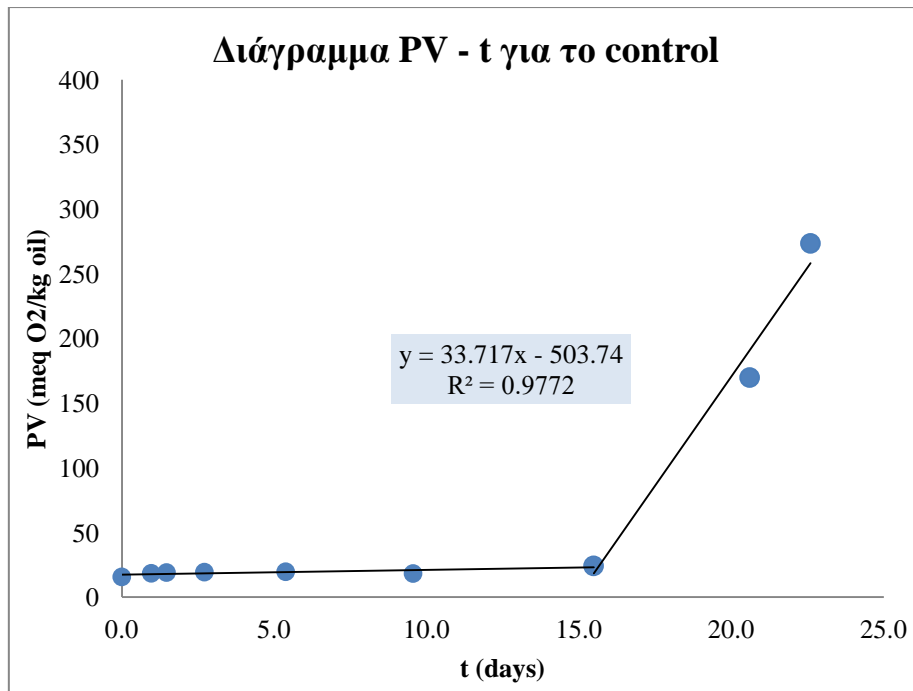
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η περιεκτικότητα του δίκταμου σε φαινολικές ουσίες είναι σημαντική, είτε πριν είτε μετά την απόσταξη του φυτού, ενώ τόσο στο εκχύλισμα ακετόνης, όσο και στο εκχύλισμα νερού, μεταβλήθηκε το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο. Κρίνεται σκόπιμη, επομένως, η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, σε ένα πραγματικό λιπιδικό σύστημα που υφίσταται οξειδωτικό στρες, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση το ελαιόλαδο. Στο παρακάτω κεφάλαιο, αποτυπώνονται με σαφήνεια τα αποτελέσματα από τα πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης που υπέστη το ελαιόλαδο, ενισχυμένο με εκχύλισμα ακετόνης αυξανόμενης συγκέντρωσης θυμοκινόνης, τόσο από το απειλούμενο φυτό όσο και από το μη.

5.4 Αποτελέσματα αυτό-οξείδωσης ελαιοδιαλύματος με εκχύλισμα μη απεσταγμένου δίκταμου

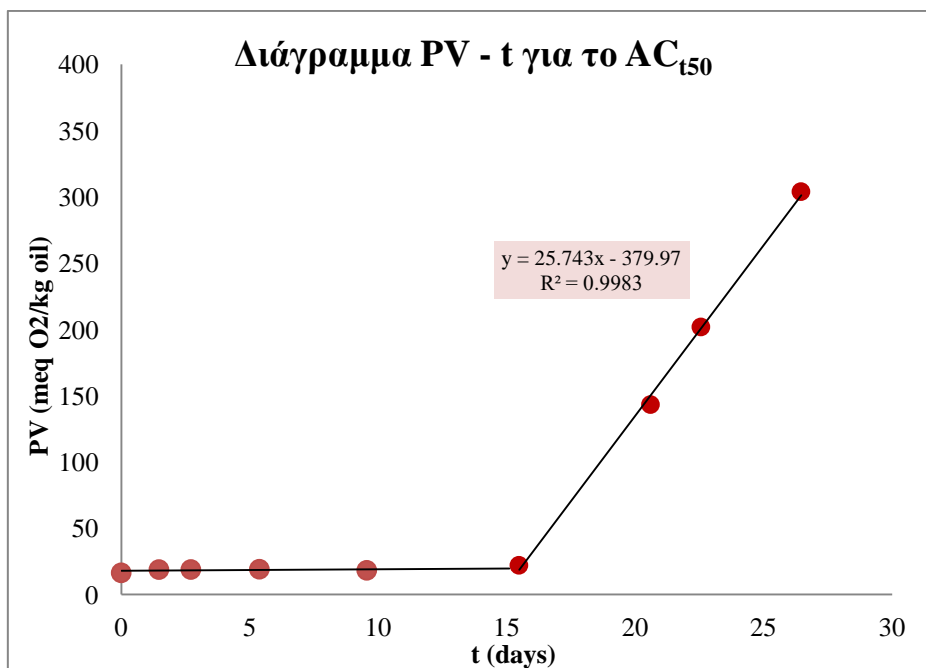
Στο ελαιοδιάλυμα το οποίο περιείχε εκχύλισμα μη απεσταγμένου δίκταμου, έγιναν 2 πειράματα οξείδωσης: θερμική και φωτοχημική οξείδωση. Η πορεία της καθεμίας παρακολουθήθηκε μέσω της μέτρησης του αριθμού των υπεροξειδίων (Peroxide Value – PV), για τον προσδιορισμό της μεταβολής των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης.

5.4.1 Αποτελέσματα της θερμικής οξείδωσης ελαιόλαδου εμπλουτισμένου με εκχύλισμα του μη απεσταγμένου φυτού

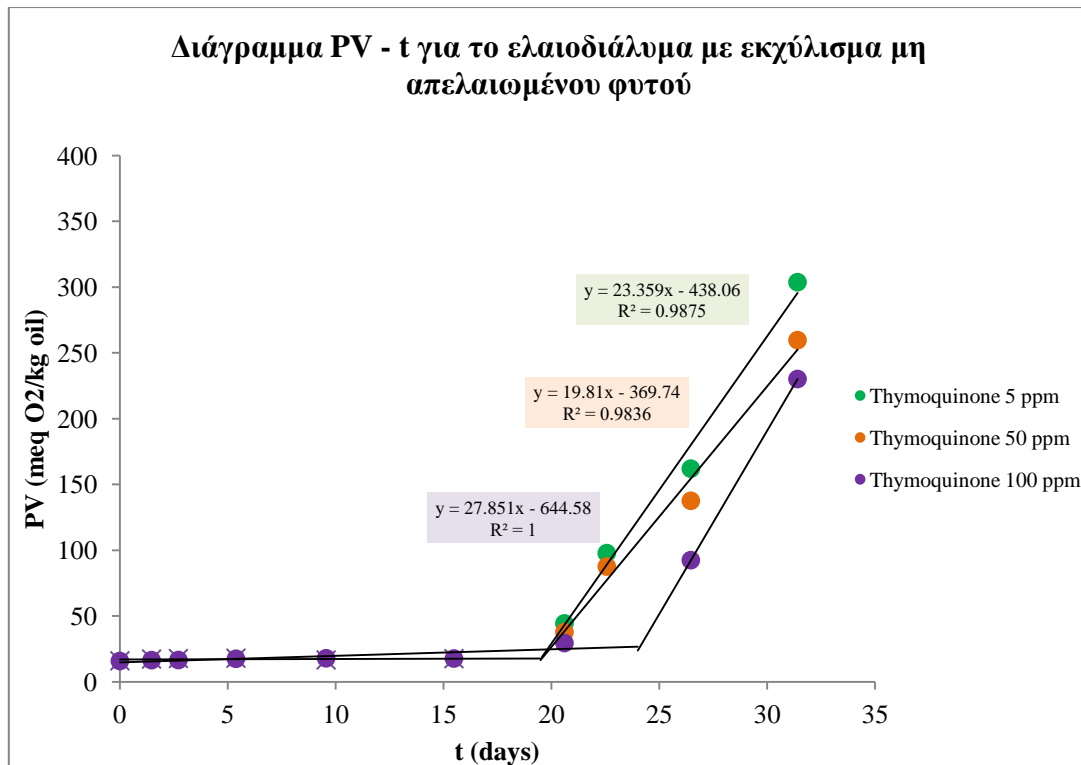
Στο Παράρτημα Π7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αριθμού υπεροξειδίων για τα δείγματα ελαιοδιαλυμάτων (C , AC_{150} , AC_{d-15}^i , AC_{d-150}^i , AC_{d-100}^i). Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται η εξέλιξη του αριθμού των υπεροξειδίων, ανάλογα με το χρόνο οξείδωσης, για το δείγμα μάρτυρα, για το δείγμα με καθαρή θυμοκινόνη και για τα δείγματα με αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης (Διαγράμματα 5.26 – 5.28).



Διάγραμμα 5.26 – Διάγραμμα PV – t για το δείγμα control.



Διάγραμμα 5.27 - Διάγραμμα PV – t για το δείγμα ελαιοδιαλύματος με καθαρή θιμοκινόνη 50 ppm.



Διάγραμμα 5.28 - Διάγραμμα PV – t για τα δείγματα ελαιοδιαλύματος με αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης.

Όπως φαίνεται και από τα εν λόγω διαγράμματα, η πορεία της θερμικής οξείδωσης στα ελαιοδιαλύματα χωρίζεται σε 2 στάδια: στο αρχικό στάδιο, όπου ο αριθμός υπεροξειδίων αυξάνεται με βραδύ ρυθμό, και στο στάδιο της επιταχυνόμενης οξείδωσης. Το χρονικό διάστημα που διαρκεί το πρώτο στάδιο, ονομάζεται περίοδος επώασης (induction period). Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό δείκτη κατά τη μελέτη της πορείας της οξείδωσης ενός λιπιδικού συστήματος, καθώς αντιπροσωπεύει το χρονικό διάστημα που ρυθμός της οξείδωσης του λιπαρού παραμένει χαμηλός, επομένως το τρόφιμο είναι κατάλληλο για χρήση. Συνεπώς, η επέκταση της περιόδου επώασης από ένα εκχύλισμα συνεπάγεται αντιοξειδωτική δράση.

Η μεταβολή των 2 μεγεθών που αναφέρθηκαν προηγουμένως εκφράζεται μέσω της προστασίας (Π), η οποία ορίζεται ως εξής: $\Pi_{I.p.} = \left(1 - \frac{(I.p.)_i}{(I.p.)_{Control}}\right) \cdot 100\%$, στην περίπτωση της περιόδου επώασης, όπου $(I.p.)_i$ η περίοδος επώασης του εκάστοτε δείγματος και $(I.p.)_{Control}$ η περίοδος επώασης του control. Με αυτό το μέγεθος, εκφράζεται η επί τοις εκατό επέκταση του χρόνου επώασης του δείγματος σε σχέση με το τυφλό. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της περιόδου

επώασης (days), της Προστασίας και των ρυθμών οξειδωσης κατά την περίοδο επώασης και στο σταδιο της επιταχυνόμενης οξειδωσης ($PV \cdot days^{-1}$).

Πίνακας 5.24 – Περίοδος επώασης, ρυθμός οξειδωσης και προστασία για τα δείγματα C, AC_{t50}, AC¹_{d-15}, AC¹_{d-150} και AC¹_{d-100}.

Δείγμα	Περίοδος επώασης (days)	Π _{I,p}	Ρυθμός οξειδωσης ($PV \cdot days^{-1}$)
C	15.5	0%	22.3
AC _{t50}	15.5	0%	25.7
AC ¹ _{d-15}	19.6	26%	23.4
AC ¹ _{d-150}	19.5	26%	19.8
AC ¹ _{d-100}	24.0	55%	27.9

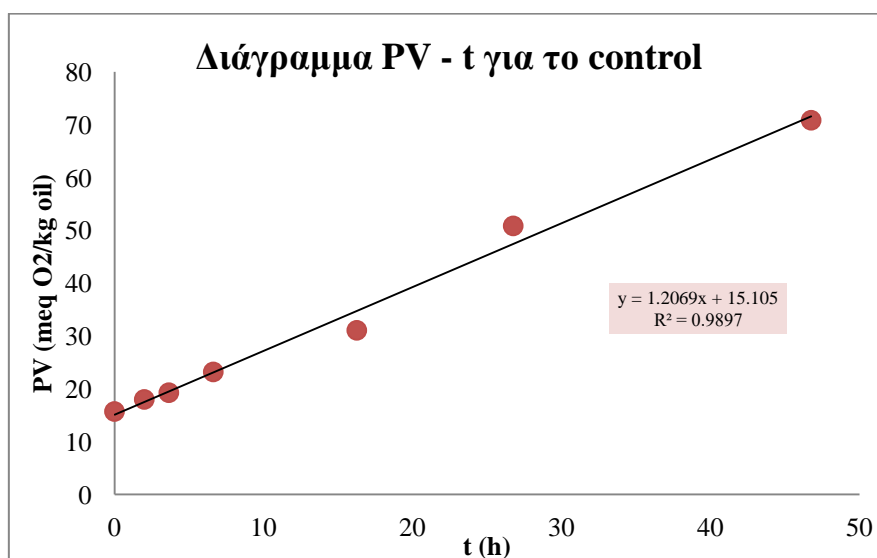
Ξεκινώντας με την περίοδο επώασης, ενώ στο τυφλό δείγμα είναι 15.5 ημέρες, με την προσθήκη εκχυλισμάτων φτάνει μέχρι και τις 24 ημέρες. Με την προσθήκη καθαρής θυμοκινόνης στο ελαιόλαδο, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία αντιοξειδωτική δράση. Ο χρόνος επώασης είναι προσεγγιστικά ίδιος με του control, και οι ρυθμοί οξειδωσης παρόμοιοι. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι δεν πραγματοποιείται αναγέννηση της διυδροθυμοκινόνης από τη θυμοκινόνη οπότε η καθαρή ουσία δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην οξειδωση του ελαιόλαδου

Με την ενσωμάτωση στο ελαιόλαδο 273.5 ppm ακετονικού εκχυλίσματος μη απελαιωμένου δίκταμου με περιεχόμενη θυμοκινόνη 5 ppm, παρατηρείται επέκταση του χρόνου επώασης κατά 26%. Επειδή το ακετονικό εκχύλισμα περιέχει και άλλα συστατικά που θα μπορούσαν να έχουν αντιοξειδωτική δράση, γι αυτό το λόγο στην υπάρχουσα περιεκτικότητα εκχυλίσματος-θυμοκινόνης προστέθηκαν επιπλέον 45 και 95 ppm καθαρής θυμοκινόνης, ώστε να διατηρηθούν σταθερά τα λοιπά συστατικά του εκχυλίσματος και να επιτευχθούν δύο νέες συγκεντρώσεις θυμοκινόνης 50 και 100 ppm. Εάν η θυμοκινόνη είναι η ουσία-κλειδί της αντιοξειδωτικής δράσης που παρατηρήθηκε παραπάνω, τότε η αύξησή της θα έπρεπε να επιφέρει μεταβολές στην αντιοξειδωτική δράση.. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης, στα 50 ppm προέκυψε παρόμοια αντιοξειδωτική δράση (επέκταση περιόδου επώασης κατά 26%), ενώ με την αύξηση της θυμοκινόνης στα 100 ppm, η επέκταση του χρόνου ζωής του ελαιόλαδου αγγίζει το +55%. Αυτό σημαίνει ότι η αύξηση της περιόδου επώασης του λιπιδικού συστήματος ελαιόλαδου – εκχυλίσματος εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της θυμοκινόνης, όμως παρουσία και των

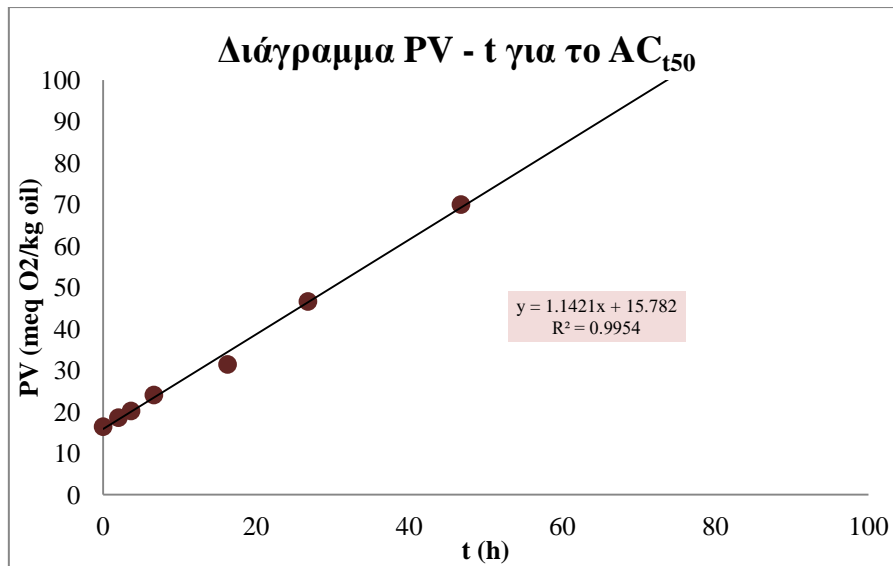
υπόλοιπων συστατικών του εκχυλίσματος, γιατί όπως προκύπτει, κάποιο από αυτά συντελεί στη μετατροπή της αδρανούς θυμοκινόνης σε δραστικό αντιοξειδωτικό, κατά πάσα πιθανότητα στην διυδροθυμοκινόνη.

5.4.2 Αποτελέσματα της φωτοχημικής οξείδωσης των δειγμάτων του μη απεσταγμένου φυτού

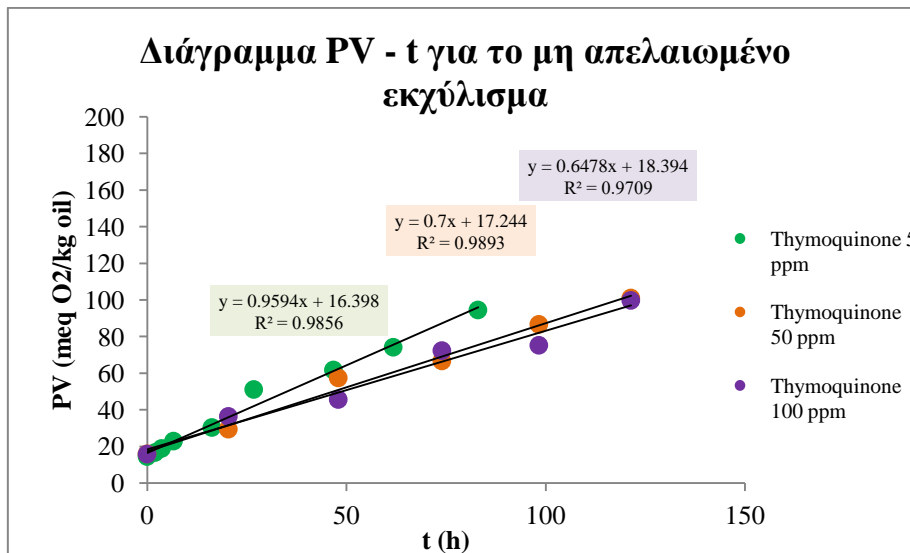
Παρομοίως με προηγουμένως, στο παράρτημα Π7 παρατίθενται τα στοιχεία για τον υπολογισμό του αριθμού υπεροξειδίων για τα δείγματα που υπέστησαν φωτοχημική οξείδωση. Ομοίως με παραπάνω, στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η χρονική εξέλιξη των υπεροξειδίων στα δείγματα.



Διάγραμμα 5.29 – Διάγραμμα αριθμού υπεροξειδίων – χρόνου για το δείγμα control, ύστερα από φωτοχημική οξείδωση.



Διάγραμμα 5.30 - Διάγραμμα αριθμού υπεροξειδίων – χρόνου για το δείγμα AC₁₅₀, ύστερα από φωτοχημική οξείδωση.



Διάγραμμα 5.31 – Διάγραμμα PV - t για τα δείγματα ελαιοδιαλύματος με αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης, ύστερα από φωτοχημική οξείδωση.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ξεκάθαρα ότι η πορεία της φωτοχημικής οξείδωσης των δειγμάτων διαφέρει από την αντίστοιχη της θερμικής, δεν παρατηρούνται δύο στάδια (επάωση, επιταχυνόμενη οξείδωση), αλλά ένα στάδιο κατά το οποίο ακολουθείται γραμμική αύξηση του PV σε όλες τις περιπτώσεις. Στην περίπτωση λοιπόν της φωτοχημικής οξείδωσης, ο παράγοντας που λαμβάνεται υπ' όψιν για το χαρακτηρισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων δεν είναι η περίοδος επάωσης, καθώς όπως φαίνεται δεν εμφανίζεται διαχωρισμός των 2 σταδίων, αλλά η κλίση των ευθειών, διότι είναι ένδειξη της ταχύτητας της αυτοοξείδωσης. Ο αριθμός υπεροξειδίων αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο, σύμφωνα

με την ακόλουθη σχέση: $PV = PV_0 - k_i \cdot t$, όπου PV_0 ο αριθμός των υπεροξειδίων στην αρχή της επιταχυνόμενης οξείδωσης και k_i ο ρυθμός.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δεδομένα της κλίσης των εκάστοτε ευθειών, καθώς και η προστασία για το ρυθμό (Π_{ki}), η οποία ορίζεται ως εξής: $\Pi_{ki} = \left(1 - \frac{k_i}{k_{Control}}\right) \cdot 100\%$, όπου k_i ο ρυθμός οξείδωσης του εκάστοτε δείγματος και $k_{Control}$ ο ρυθμός οξείδωσης του control, δηλαδή πόσο επιταχύνεται/επιβραδύνεται ο ρυθμός οξείδωσης του δείγματος συγκριτικά με το τυφλό.

Πίνακας 5.25 – Ρυθμός φωτο-οξείδωσης και προστασία για τα δείγματα C, AC_{t50}, AC¹_{d-t5}, AC¹_{d-t50} και AC¹_{d-t100}.

Δείγμα	Ρυθμός οξείδωσης (PV·h ⁻¹)	Π_{ki}
C	1.2069	0%
AC _{t50}	1.1421	5%
AC ¹ _{d-t5}	0.9594	21%
AC ¹ _{d-t50}	0.7000	42%
AC ¹ _{d-t100}	0.6478	46%

Από τα παραπάνω, καταλαβαίνουμε ότι δεν υπάρχει τόσο έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων, όπως στην περίπτωση της θερμικής οξείδωσης, αφού η μέγιστη μείωση του ρυθμού οξείδωσης που παρατηρείται στα αποτελέσματα είναι της τάξης του 46%.

Όμοια και με την περίπτωση της θερμικής οξείδωσης, φαίνεται ότι η καθαρή θυμοκινόνη δεν έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του ρυθμού αύξησης των PV κατά 5%. Χρησιμοποιώντας όμως ως βάση τα 273,5 ppm εκχυλίσματος μη απελαιωμένου δίκταμου επί τελικού ελαιοδιαλύματος με περιεχόμενη θυμοκινόνη 5 ppm και εμπλουτίζοντας στη συνέχεια με 45 ppm και 95 ppm όπως ακριβώς και στη θερμική, προέκυψε αντιοξειδωτική δράση. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.25 η αύξηση της θυμοκινόνης από τα 5 στα 50 και τελικά στα 100 ppm οδήγησε σε μείωση του ρυθμού οξείδωσης αντίστοιχα κατά 21%, 42, και 46% αντίστοιχα. Άρα και στην περίπτωση της φωτοοξείδωσης η θυμοκινόνη με την υποβοήθηση από άλλα συστατικά του εκχυλίσματος περιορίζει το ρυθμό οξείδωσης του ελαιόλαδου.

Από τις παραπάνω αναλύσεις, εξάγονται βασικά συμπεράσματα για τη δράση των εκχυλισμάτων έναντι της οξείδωσης του ελαιολάδου. Αρχικά, η σημαντική δράση των ακετονικών εκχυλισμάτων του δίκταμου πραγματοποιείται ενάντια στην υποβάθμιση λόγω υψηλών θερμοκρασιών, καθώς η προστασία ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι ήπια. Επιπλέον, κατέστη σαφές ότι, στην περίπτωση που το εκχύλισμα προέρχεται από μη απεσταγμένο δίκταμο, η αύξηση στη συγκέντρωση της θυμοκινόνης οδηγεί σε υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά, η καθαρή θυμοκινόνη δεν παρουσιάζει κάποια δράση ενάντια στην οξείδωση του ελαιολάδου, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Δεδομένου ότι ο λιπιδικός φορέας είναι το ελαιόλαδο, το οποίο περιέχει πλήθος φαινολικών ενώσεων εκ φύσεως, υπάρχει η πιθανότητα η θυμοκινόνη αυτούσια να παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση με κάποια από αυτές ή απλά να μην αναγεννάται από τα συγκεκριμένα ενδογενή αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου. Ένα πιθανό σενάριο είναι η θυμοκινόνη να εμφανίζει συνέργεια με κάποια από τις ουσίες που υπάρχουν στο εκχύλισμα, όπως για παράδειγμα τα καροτενοειδή, ενώ με τα συστατικά του αιθέριου ελαίου, όπως η καρβακρόλη ή το p-κυμένιο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αναμένεται μάλλον αντεργιστική δράση.

Για να αποτυπωθεί μία πιο ξεκάθαρη εικόνα σχετικά με τα παραπάνω, παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ίδιων αναλύσεων, αυτή τη φορά για το εκχύλισμα του απεσταγμένου δίκταμου.

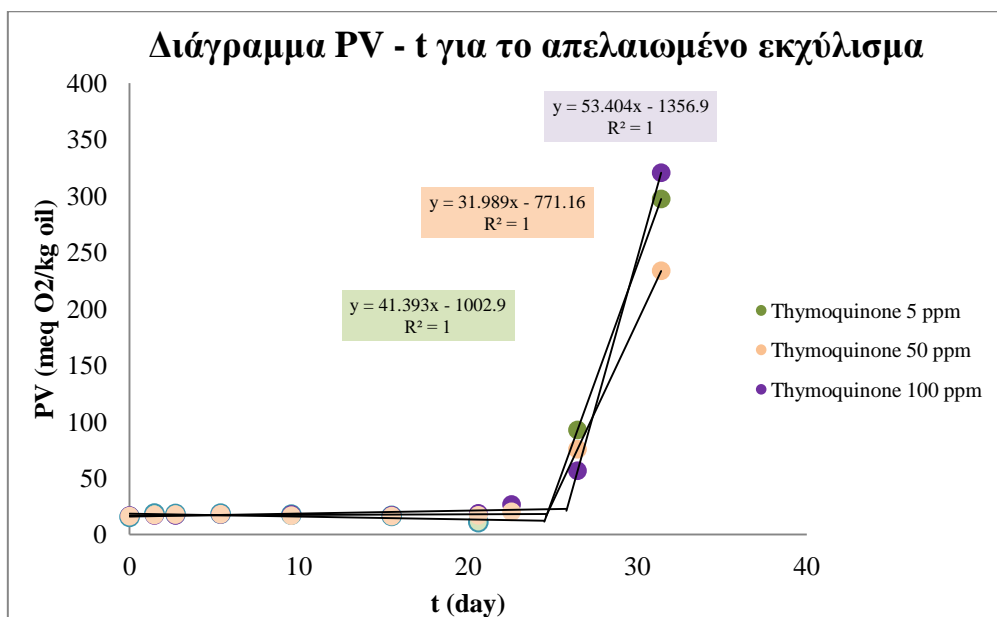
5.5 Αποτελέσματα αυτό-οξείδωσης ελαιοδιαλύματος με εκχύλισμα απεσταγμένου δίκταμου – Συγκριτική μελέτη

Στο ελαιοδιάλυμα το οποίο περιείχε εκχύλισμα απεσταγμένου δίκταμου, έγιναν 2 πειράματα οξείδωσης: θερμική και φωτοχημική οξείδωση. Η πορεία της καθεμίας καταγράφηκε μέσω της μέτρησης του αριθμού των υπεροξειδίων (Peroxide Value – PV), για τον προσδιορισμό της μεταβολής των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης, και μέσω της μέτρησης της p-ανισιδίνης (p-Anisidine Value – p-AV) σε ορισμένα αντιπροσωπευτικά δείγματα.

5.5.1 Αποτελέσματα της θερμικής οξείδωσης των δειγμάτων του απεσταγμένου φυτού

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, η απόσταξη του αιθέριου ελαίου είχε ως αποτέλεσμα τη σοβαρή μείωση της θυμοκινόνης από το δίκταμο. Το αντίστοιχο ακετονικό εκχύλισμα που παραλήφθηκε ήταν φτωχό στην ουσία, οπότε για να επιτευχθεί η συγκέντρωση των 5 ppm θυμοκινόνης επί του ελαιοδιαλύματος, απαιτήθηκε μεγάλη περιεκτικότητα εκχυλίσματος, συγκεκριμένα 963 ppm. Από αυτό το αρχικό ελαιοδιάλυμα παρασκευάστηκαν και τα επιπλέον δύο ελαιοδιαλύματα με εμβολιασμό καθαρής θυμοκινόνης ώστε να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις 50 και 100 ppm ως προς την ουσία.

Παρατίθεται παρακάτω το διάγραμμα υπεροξειδίων – χρόνου για το εκχύλισμα του απελαιωμένου φυτού. Τα δεδομένα PV – t παρατίθενται στο Παράρτημα Π7.



Διάγραμμα 5.32 – Διάγραμμα υπεροξειδίων – χρόνου για τα δείγματα με απελαιωμένο εκχύλισμα.

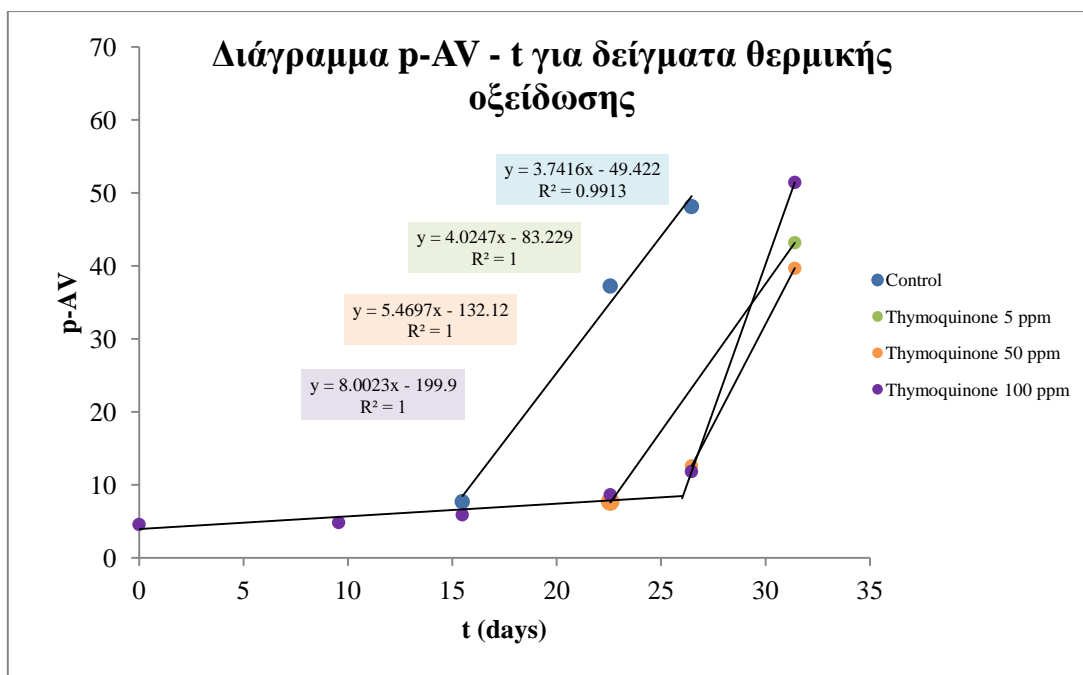
Από το παραπάνω διάγραμμα, γίνεται σαφές ότι τα 3 εκχυλίσματα έχουν παρόμοια συμπεριφορά, με βάση τον παράγοντα της περιόδου επώασης. Τα αποτελέσματα για την περίοδο επώασης, συγκριτικά με το control και το AC₁₅₀, για τα παραπάνω εκχυλίσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.26- Περίοδος επώασης, ρυθμός οξείδωσης και προστασία για τα δείγματα C, AC_{t50}, AC²_{d-t5}, AC²_{d-t50} και AC²_{d-t100}.

Δείγμα	Περίοδος επώασης (days)	Π _{1,p}
C	15.50	0%
AC _{t50}	15.10	0%
AC ² _{d-t5}	24.50	58%
AC ² _{d-t50}	24.60	59%
AC ² _{d-t100}	25.80	66%

Στην περίπτωση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, φαίνεται ότι, τα ελαιοδιαλύματα με τα ενσωματωμένα εκχυλίσματα αύξησαν σε σημαντικό βαθμό την περίοδο επώασης του ελαιολάδου, συγκριτικά με το control δείγμα. Στη μέγιστη συγκέντρωση θυμοκινόνης, μάλιστα, βλέπουμε μέσω του παράγοντα της προστασίας ότι ο χρόνος επώασης έφτασε να είναι 66% μεγαλύτερος, ενώ και στα υπόλοιπα ελαιοδιαλύματα, η προστασία κινείται γύρω στο 60%. Η συμπεριφορά αυτή καταδεικνύει ότι τα εκχυλίσματα του απεσταγμένου φυτού αποτελούν εξαιρετικές πηγές αντιοξειδωτικών. Παρόλα αυτά, ένας προβληματισμός που εγείρεται είναι ότι, μεταξύ των 3 ελαιοδιαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις της θυμοκινόνης (5, 50 και 100 ppm), εμφανίζονται παραπλήσιοι χρόνοι επώασης των δειγμάτων, κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αφορούν το μη απελαιωμένο φυτό, δηλαδή ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης στο σύστημα, εμφανίζεται μεγαλύτερη προστασία ενάντια στην οξείδωση του ελαίου.

Εφόσον ο αριθμός των υπεροξειδίων στα δείγματα θερμικής οξείδωσης ακολούθησε παραπλήσια συμπεριφορά, μετρήθηκε επιπλέον ο αριθμός της p-ανισιδίνης για την αναζήτηση της πορείας των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης (αλδεΐδες). Στο Παράρτημα Π7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον αριθμό της p-ανισιδίνης για τα ελαιοδιαλύματα με εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού. Παρακάτω, παρουσιάζεται το διάγραμμα της p-ανισιδίνης με το χρόνο οξείδωσης των δειγμάτων C, AC²_{d-t5}, AC²_{d-t50} και AC²_{d-t100}.



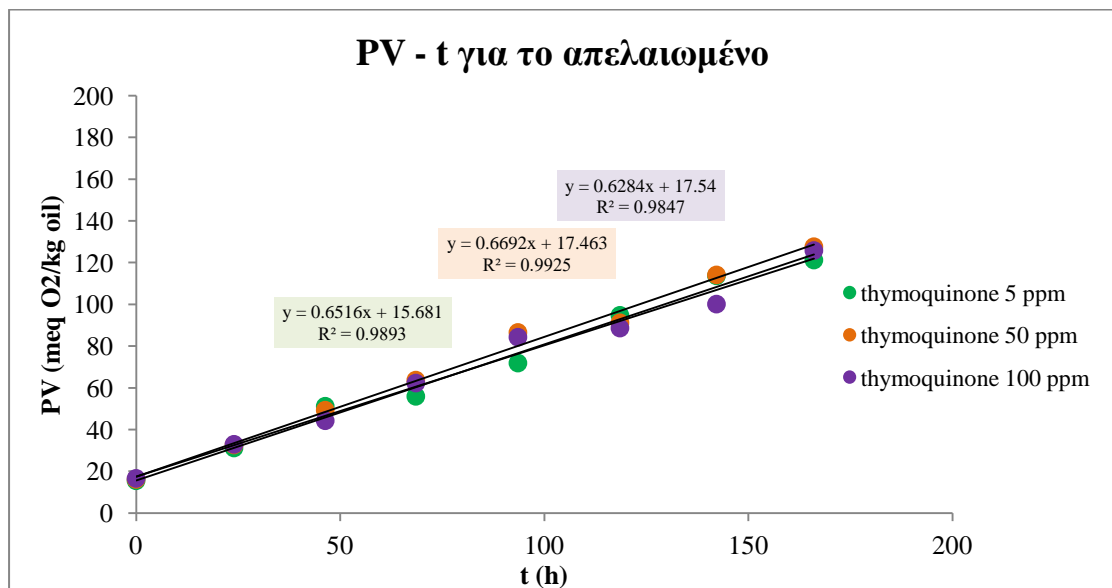
Διάγραμμα 5.33 – Διάγραμμα αριθμού ανισιδίνης – χρόνου οξείδωσης για τα δείγματα C, AC^2_{d-15} , AC^2_{d-150} και AC^2_{d-100} .

Κοιτώντας το παραπάνω διάγραμμα, είναι σαφές ότι, ενώ δεν παρουσιαζόταν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των περιόδων επώασης στη μέτρηση του αριθμού των υπεροξειδίων, τα δείγματα παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς την εξέλιξη του αριθμού ανισιδίνης, δηλαδή των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Εξετάζοντας τη μεταβολή υπό το πρίσμα της περιόδου επώασης, στην περίπτωση της συγκέντρωσης 50 ppm, από 15 μέρες, που ήταν η περίοδος επώασης του control, αυξήθηκε στις 22.6, δηλαδή κατά 51%. Επιπλέον, τόσο στην περίπτωση των 50 ppm, όσο και στην περίπτωση των 100 ppm, η περίοδος φτάνει τις 26 μέρες, δηλαδή έχει αυξηθεί κατά 73%.

Αυτό που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι, ενώ στα δείγματα του απειλωμένου φυτού δεν υπάρχει διαφοροποίηση στο χρόνο επώασης που να εξαρτάται από τη συγκέντρωση θυμοκινόνης, με βάση τα πρωτογενή προϊόντα της θερμικής οξείδωσης, όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 5.36, όμως αυτό το γεγονός παρατηρείται στην αναστολή της παραγωγής των δευτερογενών προϊόντων. Υπάρχει εξάρτηση μεταξύ της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης και στην αύξηση του χρόνου επώασης κατά την παραγωγή αλδευδών λόγω της οξείδωσης.

5.5.2 Αποτελέσματα της φωτοχημικής οξείδωσης των δειγμάτων του απεσταγμένου φυτού

Στο Παράρτημα Π7, παρουσιάζονται αναλυτικά τα στοιχεία για τον υπολογισμό του αριθμού υπεροξειδίων (PV) των δειγμάτων που αφορούν το απεσταγμένο δίκταμο, καθώς και τα τελικά αποτελέσματα αυτού του δείκτη. Επιπλέον, παρακάτω βλέπουμε διαγραμματικά τη σχέση μεταξύ αριθμού υπεροξειδίων και χρόνου οξείδωσης για τα δείγματα C, AC^2_{d-t5} , AC^2_{d-t50} και AC^2_{d-t100} .



Διάγραμμα 5.34 - Διάγραμμα PV - t για τα δείγματα ελαιοδιαλύματος με αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης, ύστερα από φωτοχημική οξείδωση.

Από το παραπάνω διάγραμμα, επιβεβαιώνεται η πρότερη συμπεριφορά των εκχυλισμάτων ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία, δηλαδή δεν παρατηρείται κάποια διαφορά ως προς τη συμπεριφορά των ελαιοδιαλυμάτων με μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα σε θυμοκινόνη, και η παρεχόμενη Προστασία κυμαίνεται στο επίπεδο του 45% μείωσης του ρυθμού οξείδωσης. Παρακάτω βλέπουμε την κλίση της εκάστοτε ευθείας, καθώς και τον παράγοντα της προστασίας συγκριτικά με το control.

Πίνακας 5.27 - Ρυθμός φωτο-οξείδωσης και προστασία για τα δείγματα C, AC_{t50}, AC²_{d-t5}, AC²_{d-t50} και AC²_{d-t100}.

Δείγμα	Ρυθμός οξείδωσης (PV h ⁻¹)	Π _{ki}
C	1.2069	0%
AC _{t50}	1.1421	5%
AC ² _{d-t5}	0.6516	46%
AC ² _{d-t50}	0.6692	45%
AC ² _{d-t100}	0.6284	48%

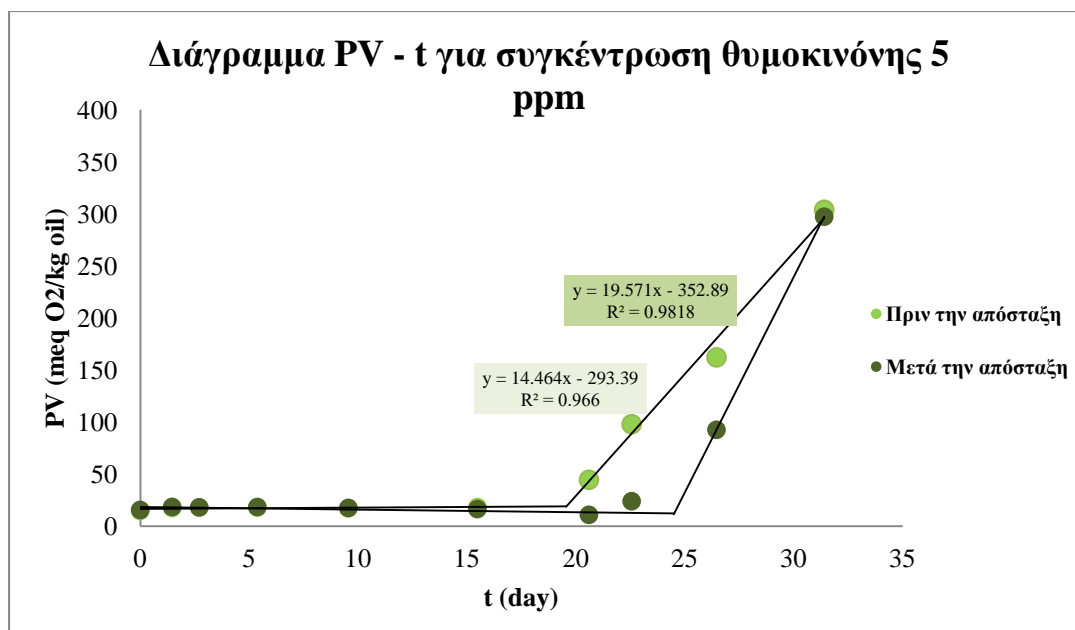
Βλέπουμε ότι το εκχύλισμα δίκταμου παρέχει προστασία στη λιπαρή ύλη ενάντια στην οξείδωση λόγω ακτινοβολίας της τάξης του 45% μείωσης του ρυθμού οξείδωσης, αλλά είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της θυμοκινόνης.

Από τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι το εκχύλισμα δίκταμου επιδεικνύει σημαντική δράση ενάντια στην θερμική οξείδωση του ελαιόλαδου. Μάλιστα, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η ουσία που ευθύνεται για αυτή την τάση είναι η θυμοκινόνη, που εντοπίζεται στο εκχύλισμα ακετόνης, στο οποίο βλέπουμε ότι με αυξανόμενη συγκέντρωση της θυμοκινόνης, αυξάνονται οι χρόνοι επώασης, από την σκοπιά του αριθμού των υπεροξειδίων. Στα δείγματα που περιέχουν εκχύλισμα του φυτού που έχει υποστεί απελαίωση, οι μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας ενδιαφέροντος, οδηγούν σε μικρή μεταβολή στην περίοδο επώασης, υπό το πρίσμα των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης, αλλά σε υψηλότερα επίπεδα από τα εκχυλίσματα του μη απελαιωμένου φυτού.

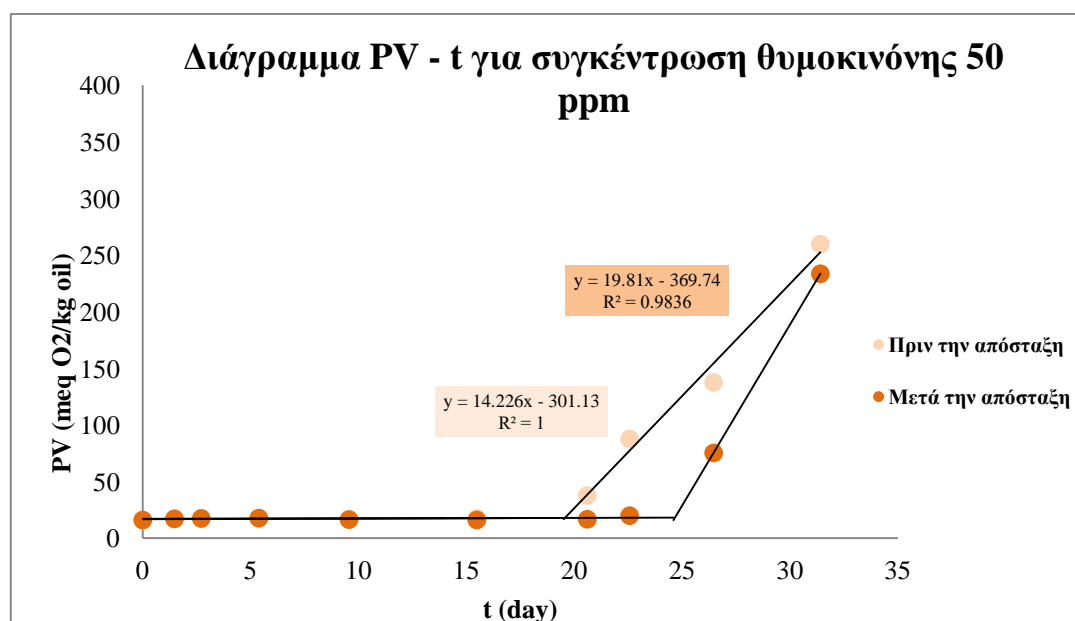
Αντίθετα, φαίνεται υψηλή επίδραση της αύξησης συγκέντρωσης θυμοκινόνης στην αναχίτιση της παραγωγής αλδεϋδών λόγω της οξείδωσης, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του αριθμού ανισιδίνης. Με τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων της θερμικής οξείδωσης, υπό το πρίσμα των παραγόμενων υδροϋπεροξειδίων, θα γίνει πιο κατανοητή η δράση της θυμοκινόνης στο συγκεκριμένο σύστημα.

5.5.3 Συγκριτικά αποτελέσματα για τα δείγματα απεσταγμένου και μη απεσταγμένου φυτού

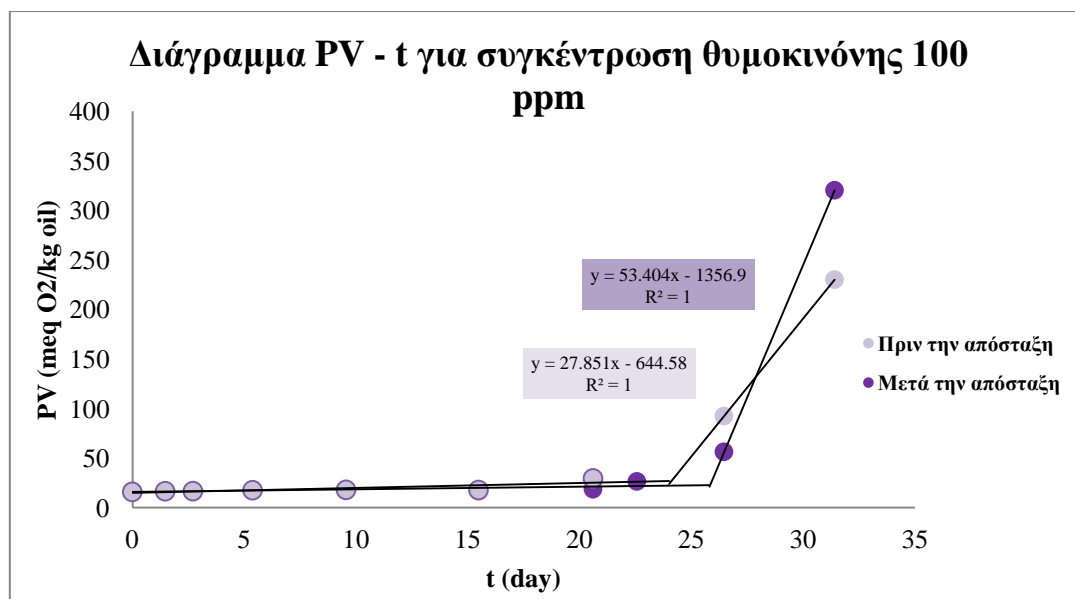
Παρακάτω, παρουσιάζεται διαγραμματικά ο αριθμός υπεροξειδίων (PV) με το χρόνο οξείδωσης (t) συγκριτικά για τα δείγματα που αφορούν στο απεσταγμένο και στο μη απεσταγμένο δίκταμο, με σταθερή συγκέντρωση θυμοκινόνης.



Διάγραμμα 5.35 – Διάγραμμα PV – t για συγκέντρωση θυμοκινόνης 5 ppm.



Διάγραμμα 5.36 - Διάγραμμα PV – t για συγκέντρωση θυμοκινόνης 50 ppm.



Διάγραμμα 5.37 - Διάγραμμα PV – t για συγκέντρωση θυμοκινόνης 100 ppm.

Από τα διαγράμματα παρατηρείται ότι, τα δείγματα που αφορούν το απειλαιωμένο φυτό επιδεικνύουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, διότι αυξάνεται η περίοδος επώασης σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της θυμοκινόνης. Μάλιστα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στην περίπτωση των 50 ppm, ίση με 26%. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 5 ppm αντίστοιχα, η περίοδος επώασης του απειλαιωμένου δείγματος υπερέχει κατά 25% του μη απειλαιωμένου και, τέλος, στα 100 ppm θυμοκινόνης, βλέπουμε το χρόνο επώασης να έχει αυξηθεί κατά 8%.

Με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα για τη δράση των άπολων συστατικών που περιέχει το δίκταμο στην οξείδωση του ελαιολάδου. Για αρχή, γίνεται αντιληπτό ότι, στη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων με εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού, αυξανόμενης της θυμοκινόνης, παρατηρείται ραγδαία αύξηση στην αντιοξειδωτική τους δράση. Το εκχύλισμα από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα περισσότερα πτητικά του συστατικά, παρουσιάζει ανώτερη δράση σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης θυμοκινόνης, όμως η επίδραση της αυξανόμενης συγκέντρωσης της ουσίας αποτυπώνεται κυρίως στα δευτερογενή συστατικά.

Αυτό, πιθανότατα, να σημαίνει ότι η θυμοκινόνη βρίσκεται στο εκχύλισμα του μη απειλαιωμένου φυτού ταυτόχρονα τόσο με συνεργιστικούς όσο και με αντεργιστικούς παράγοντες. Θεωρώντας ότι οι αντεργιστικοί παράγοντες εντοπίζονται στο αιθέριο έλαιο, η απειλαίωση του φυτού οδηγεί σε σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι Tsimogiannis et. al., 2017 απέδειξαν την αρνητική συνεισφορά της

καρβακρόλης στη δράση αποδεδειγμένα ισχυρών αντιοξειδωτικών, ενώ οι Milos et al., 2012 ισχυρίζονται ότι το p-κυμένιο περιορίζει τη δράση της θυμοκινόνης και η καρβακρόλη, δηλαδή το κύριο πτητικό συστατικό του δίκταμου, εμφανίζει ήπια συνεργιστική δράση με την θυμοκινόνη. Εάν ανατρέξουμε στα αποτελέσματα της ανάλυσης GC-MS του αιθέριου ελαίου (βλ. Πίνακας 5.12), θα διαπιστώσουμε ότι, μετά από την καρβακρόλη, το αιθέριο έλαιο περιέχει υψηλή περιεκτικότητα p-κυμενίου. Μία ακόμη πιθανή εξήγηση είναι η συνεργιστική σχέση μεταξύ των καροτενοειδών του δίκταμου (λουτεΐνη, β-καροτένιο) και της θυμοκινόνης. Σύμφωνα με τους Palozza et al., 1992, μάλιστα, το β-καροτένιο δρα συνεργιστικά με την α-τοκοφερόλη, αναγεννώντας την, οπότε θα μπορούσε να έχει αντίστοιχη συμπεριφορά και στην αναγέννηση της διυδροθυμοκινόνης από την θυμοκινόνη. Παρόλα αυτά, το β-καροτένιο και η λουτεΐνη, υπό συνθήκες, εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τους Subagio et al., 2001, σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών, ή υπό ακτινοβολία, επιταχύνουν την οξείδωση της λιπαρής ύλης στην οποία βρίσκονται. Εάν ανατρέξουμε, μάλιστα, στον Πίνακα 5.22, παρατηρούμε ότι, στο εκχύλισμα του μη απεσταγμένου φυτού, η συγκέντρωση των καροτενοειδών είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη του απεσταγμένου, κάτι που πιθανό να ενισχύει την παραγωγή προϊόντων οξείδωσης υπό θερμοκρασία 70 °C και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Έχοντας περιορίσει τους πιθανούς παράγοντες συνεργιστικής ή αντεργιστικής δράσης ως προς τη θυμοκινόνη σε μια μικρή ομάδα συστατικών του ακετονικού εκχυλίσματος δίκταμου, θεωρούμε ότι με μια σειρά στοχευμένων πειραμάτων, είναι δυνατόν να εξακριβωθεί ο ρόλος καθεμιάς από τις συγκεκριμένες ουσίες. Στη συνέχεια θα μπορούσε να σχεδιαστεί εκείνο το μίγμα συστατικών από δίκταμο, ίσως και από άλλες φυτικές πρώτες ύλες, το οποίο θα εξασφαλίζε τη μεγιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε λιπιδικά συστήματα.

6. Συμπεράσματα – προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Το δίκταμο είναι ένα αρωματικό φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών και παράγεται αποκλειστικά στην Κρήτη. Πρόκειται για ένα φυτό το οποίο έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, λόγω των εξαιρετικών αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων. Οι εν λόγω δράσεις οφείλονται, τόσο σε εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται από το φυτό, και στις φαινολικές ενώσεις που αυτά περιέχουν, όσο και στο αιθέριο έλαιό του. Στην παρούσα διπλωματική χαρτογραφήθηκε το δίκταμο ως προς τα εκχυλίσματά του, το είδος και η ποσότητα αυτών, και διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική δράση τους σε ένα πραγματικό σύστημα τροφίμου.

Πρώτο βήμα στην προσπάθεια χαρακτηρισμού της πρώτης ύλης ήταν η εκχύλιση των βιοδραστικών του συστατικών με τη χρήση διαλυτών χαμηλής και υψηλής πολικότητας, δηλαδή την ακετόνη και το νερό. Μέσα από εκχύλιση ημιδιαλείποντος έργου σε σταθερή κλίνη, προέκυψε ότι το φυτό αποτελεί σημαντική πηγή φαινολικών ουσιών. Ειδικότερα στο υδατικό εκχύλισμα, συναντάμε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά (Total Phenolic Content, TPC). Τα εκχυλίσματα από νερό φαινολικά συστατικά ανήλθαν σε 103 mg GAE/g ξηρού φυτού. Στη συνέχεια, στα εκχυλίσματα εφαρμόστηκε μία μέθοδος εξέτασης της ικανότητας των εκχυλιζόμενων από το δίκταμο ουσιών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, μέσω της ρίζας DPPH. Από αυτή τη δοκιμή, προέκυψε ότι η αντιριζική ικανότητα του δίκταμου είναι υψηλή με το εκχύλισμα νερού να περιέχει 578 mg Trolox/g εκχυλίσματος, συγκριτικά με το εκχύλισμα ακετόνης το οποίο περιέχει 192 mg Trolox/g εκχυλίσματος. Τέλος, για την αναγνώριση των ουσιών που απαρτίζουν τα 2 εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκε σε αυτά ανάλυση HPLC. Έτσι, προέκυψε ότι, στο ακετονικό εκχύλισμα, οι 2 βασικότερες ουσίες που το αποτελούν είναι η θυμοκινόνη, με συγκέντρωση 22 mg/g εκχυλίσματος, και η καρβακρόλη, από την οποία εντοπίζονται 257 mg/g εκχυλίσματος. Αντίστοιχα, για την απόκτηση της πλήρους εικόνας για το φυτό, έγινε ανάλυση HPLC στο υδατικό εκχύλισμα, από την οποία φαίνεται ότι περιέχει σημαντικό ποσοστό φλαβονοειδών, ροσμαρινικού οξέος και παραγώγων του καφεϊκού οξέος.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της εκχύλισης δίκταμου με ακετόνη σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου. Σε δείγματα που παραλήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα προσδιορίστηκαν οι παράμετροι TPC, και οι περιεκτικότητες θυμοκινόνης της καρβακρόλης μέσω HPLC-DAD. Μέσα από τη μελέτη της κινητικής της παραλαβής των TPC, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η πλειοψηφία των φαινολικών συστατικών που εκχυλίζονται από την ακετόνη εξαντλούνται σε χρόνο 15 λεπτών. Αυτό, πρακτικά, σημαίνει ότι η ακετόνη είναι ένας διαλύτης που διεισδύει με μεγάλη ευκολία στη μικροδομή του φυτού. Η πληροφορία αυτή επιβεβαιώθηκε με τη μελέτη της χρονικής εξέλιξης της παραλαβής της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, μέσω ανάλυσης HPLC, όπου φάνηκε ότι τα συγκεκριμένα συστατικά εκχυλίζονται ακόμα πιο γρήγορα. Μέσω της μαθηματικής επεξεργασίας των παραπάνω αποτελεσμάτων, προσδιορίστηκαν οι σταθερές των ρυθμών στα διακριτά στάδια της εκχύλισης. Αντίθετα, από την κινητική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος, φάνηκε ότι το νερό δεν μπορεί να εκχυλίσει εύκολα το δίκταμο, καθώς δεν μπορεί να διεισδύσει στο εσωτερικό των κόκκων του. Συνεπώς, σε αυτή την περίπτωση, απαιτείται ειδική προεπεξεργασία της πρώτης ύλης, και δεν αποτέλεσε αντικείμενο της διπλωματικής.

Κατά τη μεταποίηση των αρωματικών φυτών, η πιο βασική διεργασία στην οποία υποβάλλονται είναι η απόσταξη με υδρατμούς για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου. Όπως έχει αποδειχτεί από μεγάλο πλήθος ερευνών, οι απεσταγμένες φυτικές ύλες εξακολουθούν να αποτελούν πλούσιες πηγές μη πτητικών βιοδραστικών συστατικών. Στην παραπάνω λογική, το δίκταμο υποβλήθηκε στη διεργασία της απόσταξης με υδρατμούς χρησιμοποιώντας την τεχνική της υδρο-ατμοαπόσταξης. Παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο του δίκταμου με απόδοση 2.5%, σε αυτό έγινε ανάλυση GC-MS, ώστε να προσδιοριστεί η σύστασή του. Προέκυψε ότι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου δίκταμου είναι η καρβακρόλη (56.4%), ενώ ακολουθούν το p-κυμένιο (15.9%), το γ-τερπινένιο (14.5%) και άλλες ουσίες σε ίχνη, όπως το τρανς-καρνοφυλλένιο, το α-πινένιο κ.λπ. Ακόμη, βρέθηκε ότι περιέχει 0.7% θυμοκινόνη. Πέρα από την ανάλυση GC-MS, αναζητήθηκαν τα φαινολικά του συστατικά μέσω Folin – Ciocalteu, τα οποία ανήλθαν σε 328 mg GAE/g αιθέριου ελαίου.

Το απεσταγμένο δίκταμο, ξηράνθηκε ήπια, κονιοποιήθηκε και υποβλήθηκε στην ίδια διαδικασία εκχύλισης και αναλύσεων. Ο λόγος που έγινε αυτό είναι για να διερευνηθεί εάν η απόσταξη επηρεάζει ποιοτικά τα βιοδραστικά συστατικά του

φυτού. Το φαινολικό περιεχόμενο, και η αντιριζική ικανότητα, του δίκταμου, τόσο από το ακετονικό, όσο και από το υδατικό εκχύλισμα, μειώθηκαν σημαντικά, αφενός λόγω της απομάκρυνσης του αιθέριου ελαίου (πτητικά συστατικά), αφετέρου λόγω της καταστροφής μέρους των μη πτητικών συστατικών λόγω της υψηλής θερμοκρασίας της απόσταξης. Σύμφωνα με τις αναλύσεις HPLC που πραγματοποιήθηκαν, η συγκέντρωση της θυμοκινόνης μειώθηκε κατά 92%, ενώ της καρβακρόλης κατά 95%. Η μεγάλη μείωση της καρβακρόλης οφείλεται φυσικά στην παραλαβή της στο αιθέριο έλαιο, ενώ η μείωση της θυμοκινόνης αποδίδεται περισσότερο σε θερμική διάσπαση της ουσίας. Κατά την ανάλυση HPLC του υδατικού εκχυλίσματος, φάνηκε ότι υπήρξε μια ήπια μείωση σε ορισμένα συστατικά (παράγωγα καφεϊκού οξέος, φλαβονοειδή), ενώ άλλα αυξήθηκαν (ροσμαρινικό οξύ). Η αύξηση θα μπορούσε να αποδοθεί στη διόγκωση της μικροδομής του δίκταμου κατά τη θέρμανση-ενυδάτωση στη διάρκεια της απόσταξης, γεγονός που κατέστησε πιο προσβάσιμα ορισμένα συστατικά στο διαλύτη κατά τη μετέπειτα εκχύλιση με νερό.

Βασικός στόχος τη διπλωματικής ήταν η αξιοποίηση των δύο ακετονικών εκχυλισμάτων για την εύρεση της αντιοξειδωτικής τους δράσης σε ένα πραγματικό οξειδούμενο λιπιδικό υπόστρωμα. Ήδη από προγενέστερη έρευνα είχε βρεθεί ότι ένα σημαντικό συστατικό για την αντιοξειδωτική δράση του δίκταμου είναι η θυμοκινόνη. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων έγινε έτσι ώστε η θυμοκινόνη να αποτελεί το συστατικό με τον κεντρικό ρόλο. Επιλέχθηκε τα εκχυλίσματα ακετόνης να ενσωματωθούν σε ελαιόλαδο, και τα ελαιοδιαλύματα να υποστούν θερμική και φωτοχημική οξείδωση. Να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι, τα ελαιοδιαλύματα παρασκευάστηκαν έτσι ώστε να έχουν αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης, Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν κυρίως μέσω του αριθμού υπεροξειδίων και της p-ανισιδίνης.

Όσον αφορά την οξείδωση των ελαιοδιαλυμάτων με εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού, προέκυψε υψηλή αντιοξειδωτική δράση, αυξανόμενης της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση 100 ppm, το εκχύλισμα αύξησε κατά 55% την περίοδο επώασης κατά τη θερμική οξείδωση, ενώ όλα τα εκχυλίσματα έδειξαν χαμηλότερη δράση ενάντια στη φωτοχημική οξείδωση. Στην περίπτωση της οξείδωσης των ελαιοδιαλυμάτων με εκχύλισμα απεσταγμένου δίκταμου η αντιοξειδωτική δράση ήταν ακόμα μεγαλύτερη, της τάξης του 60%, χωρίς να

φαίνεται να υπάρχει δόσοεξαρτώμενη δράση της θυμοκινόνης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε επίπεδο πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης. Σημαντική ήταν η επίδραση της συγκέντρωσης της θυμοκινόνης σε επίπεδο δευτερογενών προϊόντων. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης της ουσίας αυξανόταν ο χρόνος επώασης του ελαιόλαδου, και μάλιστα σε συγκέντρωση 100 ppm θυμοκινόνης η επέκταση του χρόνου επώασης έφτασε στο +75%. Να σημειωθεί ότι εμπλουτίζοντας το ελαιόλαδο αποκλειστικά με καθαρή θυμοκινόνη δεν παρατηρήθηκε καμία αντιοξειδωτική δράση.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις για την παρουσία στα ακετονικά εκχυλίσματα του δίκταμου συστατικών που θα μπορούσαν να εμφανίζουν συνεργιστική ή αντεργιστική/ανταγωνιστική δράση με τη θυμοκινόνη. Πτητικά συστατικά που βρίσκονται στο μη απειαιωμένο φυτό όπως η καρβακρόλη και το p-κυμένιο έχουν χαρακτηριστεί στο παρελθόν ως παράγοντες τόσο συνεργιστικής όσο και ανταγωνιστικής δράσης για τη θυμοκινόνη και για ισχυρά αντιοξειδωτικά, ενώ μη πτητικά συστατικά του δίκταμου, όπως τα καροτενοειδή, έχουν εμφανίσει συνεργιστική δράση με τοκοφερόλες, και προ-οξειδωτικό χαρακτήρα σε ακραίες συνθήκες.

Στην παρούσα διπλωματική αποδείχτηκε ότι στα χαμηλής πολικότητας εκχυλίσματα δίκταμου το συστατικό-κλειδί για την εμφάνιση αντιοξειδωτικής δράσης είναι η θυμοκινόνη. Η ουσία δεν μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό από μόνη της, χρειάζεται την παρουσία συγκεκριμένων συστατικών από τα υπόλοιπα του εκχυλίσματος ώστε να αναγεννηθεί η αντίστοιχη διφαινόλη της και να δράσει αντιοξειδωτικά. Τα εκχυλίσματα δίκταμου ενδέχεται να περιέχουν και ανταγωνιστικούς παράγοντες στην αναγέννηση της διφαινόλης. Ωστόσο οι παράγοντες συνέργειας/ανταγωνισμού έχουν περιοριστεί σε ένα μικρό πλήθος συστατικών. Σε μελλοντική έρευνα θα γίνει δυνατή η ταυτοποίηση των συστατικών που εξασφαλίζουν τη μεγιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και των ανταγωνιστικών παραγόντων, ώστε τελικά να σχεδιαστεί ένα παρασκεύασμα με βάση τη θυμοκινόνη από το δίκταμο ή/και άλλα εκχυλίσματα το οποίο θα προσφέρει τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση σε λιπιδικά συστήματα.

Μερικές προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι οι ακόλουθες:

- Διερεύνηση των συνθηκών εκχύλισης, για μεγιστοποίηση της απόδοσης.

- Αξιοποίηση του πλούσιου σε πολυφαινόλες υδατικού εκχυλίσματος, για ενσωμάτωση σε άλλα συστήματα τροφίμων ή καλλυντικά.
- Εφαρμογή διεργασίας απομάκρυνσης αιθερίου ελαίου με ταυτόχρονη διατήρηση της θυμοκινόνης (π.χ. με ατμοαπόσταξη), για τον περιορισμό της απώλειάς του στο αιθέριο έλαιο.
- Περαιτέρω μελέτη της δράσης της συνεργιστικής/ανταγωνιστικής δράσης της θυμοκινόνης στο εν λόγω λιπιδικό σύστημα.
- Εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση θυμοκινόνης σε άλλα λιπιδικά συστήματα (π.χ. σπορέλαιο) με λιγότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά.

Βιβλιογραφία

Ελληνική βιβλιογραφία

Γεωργάκα, Γ. (2005). Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας in vitro καθαρών φυτικών φαινολικών ουσιών, εκχυλισμάτων και κλασμάτων των ελληνικών ποικιλιών αμπέλου Ασύρτικο και Μανδηλαριά Σαντορίνης: έλεγχος για πιθανή συνεργική δράση μεταξύ των φαινολικών ουσιών (Bachelor's thesis).

Γιαννιώτης, Σ. (2007). Μηχανική Τροφίμων, Μέρος 1ο: Φαινόμενα μεταφοράς στη μηχανική Τροφίμων, Αθήνα, Γ.Π.Α.

Γούλα Α., Κάντσα Α. και Παγκοζίδου Γ. (2004), «Ο Δίκταμος της Κρήτης: Στοιχεία της βιογεωγραφίας, της εθνοβοτανικής και της θέσης του στη σύγχρονη επιστημονική έρευνα». Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «Σπουδή στο Ερωντοβότανο, το Δίκταμο της Κρήτης» Ηράκλειο, 26 & 27 Ιουνίου 2004, σελ. 1-2.

Γούτη, Μ. (2021). Λειτουργικά τρόφιμα, βιοδραστικές ουσίες, φαρμακευτική και αντιοξειδωτική δράση του *Origanum dictamnus*.

Γρίμπιλας, Γ. (2023). Αναλυτικές Μέθοδοι Ελέγχου του Ελαιολάδου-Εστιάζοντας στο Παρθένο Ελαιόλαδο.

Δαούσης, Σ. Φ. (2013). Ενόργανη ανάλυση και βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων των φυτών δίκταμο (*Origanum dictamnus*), δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) και θρούμπι (*Satureja hortensis*).

Καλτσής, Α. (2021). Συσχέτιση φυσικοχημικών ιδιοτήτων και αντιοξειδωτικής δράσης φαινολικών ενώσεων με in silico και in vitro μεθόδους.

Κανακίδη, Α. Δ. (2020). Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από δεντρολίβανο και επεξεργασία για χρήση σε καλλυντικά.

Κανέλλου, Γ. (2012). Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας.

Λεμονής, Η. (2017). Ανάκτηση αντιοξειδωτικών από φυσικές πρώτες ύλες με χρήση της υπερκρίσιμης εκχύλισης: πειραματικές μετρήσεις και προσομοίωση.

Ορδούδη, Σ. (2007). Φαινολικά οξέα ως φυσικοί παρεμποδιστές οξείδωσης: αξιολόγηση δραστηριότητας, προοπτική αξιοποίησης σε λειτουργικά τρόφιμα (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας. Τομέας Χημικής Τεχνολογίας και Βιομηχανικής Χημείας. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων).

Πάγκαλος, Μ. (2011). Το δίκταμο της Κρήτης.

Πεχλιβανίδου, Μ. Σ. (2022). Συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης φυτικών ειδών του γένους *Mentha*.

Πουλή, Α. (2015). Χρήση αιθέριων ελαίων κατά τη συντήρηση προϊόντων κρέατος.

Σάλτας, Δ. Κ. (2013). Προσδιορισμός του ροσμαρινικού οξέος σε βότανα με την εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας, της φασματοσκοπίας υπερύθρου και της χημειομετρίας.

Σκοπαράντζος, Κ. (2021). Επίδραση της μάλαξης στα πτητικά και φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου.

Στίνη, Ε. Μ. (2022). Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από μελισσόχορτο και εγκλεισμός τους σε δομές κατάλληλες για τρόφιμα.

Σύμπουρα, Φ. (2015). Απομόνωση και μελέτη βιοδραστικών συστατικών αρωματικών φυτών.

Τέζιας, Σ. (2004). Το δίκταμο της Κρήτης. Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «Σπουδή στο Ερωντοβότανο, το Δίκταμο της Κρήτης» Ηράκλειο, 26 & 27 Ιουνίου 2004, σελ.10-11.

Τσαγκάρη, Σ. (2021). Οξειδωτική υποβάθμιση και μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης ελαιολάδου.

Τσιμογιάννης, Δ. (2008). *Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων* (Doctoral dissertation, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων).

Τσουβαλάκη, Ε. (2009). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά Κρήτης. Δίκταμο-Φασκόμηλο-Ρίγανη.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2004). Στοιχεία τεχνικής καλλιέργειας αρωματικών - φαρμακευτικών φυτών κατά νομαρχιακό διαμέρισμα της χώρας. Δ/νση ΠΑΠ-Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας. Τμήμα Καπνού-Αρωματικών Φαρμακευτικών Φυτών.

Φωστέρης, Σ. (2021). Εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από βαλσαμόχορτο (*Hypericum perforatum* L.).

Χανιώτη, Σ. (2020). Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης φυτικών λιπαρών και βιοδραστικών συστατικών τους.

Χρυσολωράς, Μ. (2015). Τα καροτενοειδή και ο ρόλος τους ως αντιοξειδωτικά σε φρούτα και λαχανικά.

Ξένη βιβλιογραφία

Aggarwal, B. B., Kunnumakkara, A. B., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Sung, B., & Anand, P. (2008). Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta medica*, 74(13), 1560-1569.

Ahmad, A., Mishra, R. K., Vyawahare, A., Kumar, A., Rehman, M. U., Qamar, W., ... & Khan, R. (2019). Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(8), 1113-1126.

Al-Harashseh, M., & Kingman, S. W. (2004). Microwave-assisted leaching—a review. *Hydrometallurgy*, 73(3-4), 189-203.

Aparicio, R., & Harwood, J. (2013). *Handbook of olive oil* (pp. 431-478). Boston, MA, USA.: Springer.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.

- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal El-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*, 26(2), 87-98.
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., & Božin, B. (2018). Potential of selected Lamiaceae plants in anti (retro) viral therapy. *Pharmacological research*, 133, 301-314.
- Bernhoft, A., Siem, H., Bjertness, E., Meltzer, M., Flaten, T., & Holmsen, E. (2010). Bioactive compounds in plants—benefits and risks for man and animals. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian journal of botany*, 1(1), 1-6.
- Carpentieri, S., Mazza, L., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Ferrari, G., & Pataro, G. (2021). Pulsed electric fields-and ultrasound-assisted green extraction of valuable compounds from *Origanum vulgare* L. and *Thymus serpyllum* L. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(10), 4834-4842.
- Chen, X. Q., & XIAO, J. B. (2005). RP-HPLC-DAD determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and apigenin in *Marchantia convoluta*.
- Craft, N. E., & Soares, J. H. (1992). Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and beta-carotene in organic solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(3), 431-434.
- Dabbs, D. J. (Ed.). (2021). *Diagnostic immunohistochemistry e-book: theranostic and genomic applications*. Elsevier Health Sciences.
- Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H., & Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*, 95, 138-158.
- De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta*, 369(1-2), 1-10.
- Determination of the free fatty acids in European Commission Regulation (ECC) No. 2568/91, *Official Journal of the European Communities*, No. L 248, 05/09/91 pp. 6.

Di Serio, M. G., Di Giacinto, L., Di Loreto, G., Giansante, L., Pellegrino, M., Vito, R., & Perri, E. (2016). Chemical and sensory characteristics of Italian virgin olive oils from Grossa di Gerace cv. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(2), 288-298.

Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., & Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 382-396.

Gambelunghe, C., & Melai, P. (2002). Absinthe: enjoying a new popularity among young people?. *Forensic science international*, 130(2-3), 183-186

Garrard A., Coumarins, Editor(s): Philip Wexler, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), Academic Press, 2014, Pages 1052-1054, ISBN 9780123864550.

Goyal, S. N., Prajapati, C. P., Gore, P. R., Patil, C. R., Mahajan, U. B., Sharma, C., ... & Ojha, S. K. (2017). Therapeutic potential and pharmaceutical development of thymoquinone: a multitargeted molecule of natural origin. *Frontiers in pharmacology*, 8, 656.

Görner, H. (2004). Photoreactions of 2-methyl-5-isopropyl-1, 4-benzoquinone. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 165(1-3), 215-222.

Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.

Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 94, 651–715 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.

Gunstone, F. D. (2012). *Fatty acid and lipid chemistry*. Springer.

Khalife, K. H., & Lupidi, G. (2007). Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free radical research*, 41(2), 153-161.

Komaitis, M. E., Revinthi-Moraiti, K., & Evangelatos, G. (1988). The lipid composition of fresh *Origanum dictamnus* leaves. *Food chemistry*, 27(1), 25-32.

- Kouri, G., Tsimogiannis, D., Bardouki, H., & Oreopoulou, V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 155-162.
- Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate polymers*, 56(2), 181-185.
- Kreis, W., Kaplan, M. H., Freeman, J., Sun, D. K., & Sarin, P. S. (1990). Inhibition of HIV replication by Hyssop officinalis extracts. *Antiviral research*, 14(6), 323-337.
- Kundu, J., Chun, K. S., Aruoma, O. I., & Kundu, J. K. (2014). Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 768, 22-34.
- Lagos, J. B., Vargas, F. C., de Oliveira, T. G., da Aparecida Makishi, G. L., & do Amaral Sobral, P. J. (2015). Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. *Current Opinion in Food Science*, 5, 1-7.
- Lagouri, V., Bantouna, A., & Stathopoulos, P. (2010). A comparison of the antioxidant activity and phenolic content of nonpolar and polar extracts obtained from four endemic lamiaceae species grown in Greece. *Journal of food processing and preservation*, 34(5), 872-886.
- Lemonis, I., Tsimogiannis, D., Louli, V., Voutsas, E., Oreopoulou, V., & Magoulas, K. (2013). Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO₂ and liquid solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 48-53.
- Liolios, C. C., Graikou, K., Skaltsa, E., & Chinou, I. (2010). Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 131(2), 229-241.
- Mahmoud, Y. K., & Abdelrazek, H. M. (2019). Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108783.

Milos, M., & Makota, D. (2012). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*, *131*(1), 296-299.

Mitropoulou, G., Fitsiou, E., Stavropoulou, E., Papavassilopoulou, E., Vamvakias, M., Pappa, A., ... & Kourkoutas, Y. (2015). Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. *Microbial ecology in health and disease*, *26*(1), 26543.

Møller, J. K., Madsen, H. L., Aaltonen, T., & Skibsted, L. H. (1999). Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food chemistry*, *64*(2), 215-219.

Montoya Garcia, T., Castejon, M.L., Alarcón De-La-Lastra, C., & Sánchez-Hidalgo, M.(2021, June 26). Secoiridoids from *Olea europaea* L.. In *Encyclopedia*. <https://encyclopedia.pub/entry/11335>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5281792, Rosmarinic acid. Retrieved July 26, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmarinic-acid>.

Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Phytochemistry and nematocidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(13), 7856-7863.

Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *55*, 315-327.

Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, E47. doi:10.1017/jns.2016.41

Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992). β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *297*(1), 184-187.

Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202-2211.

Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.

Proestos, C., & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-food science and technology*, 41(4), 652-659.

Puri M, Sharma D, Barrow CJ. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* 2012 Jan;30(1):37-44. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014. Epub 2011 Aug 2. PMID: 21816495.

Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N. *et al.* Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Eng Rev* 7, 275–297 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C., & Bernini, R. (2019). Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8), 1776.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.

Sakai, E., Farhana, F., Yamaguchi, Y., & Tsukuba, T. (2022). Potentials of natural antioxidants from plants as antiosteoporotic agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 72, 1-28.

Sayed, A. A. R. (2008). Thymoquinone protects renal tubular cells against tubular injury. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26(3), 374-380.

Seidel, Veronique. (2008). Initial and Bulk Extraction. 10.1385/1-59259-955-9:27.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., del Mar Contreras, M., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675-1687.

Spagnol, C. M., Assis, R. P., Brunetti, I. L., Isaac, V. L. B., Salgado, H. R. N., & Corrêa, M. A. (2019). In vitro methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 219, 358-366.

Staniek, K., & Gille, L. (2010, November). Is thymoquinone an antioxidant?. In *BMC pharmacology* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-1). BioMed Central.

Subagio, A., & Morita, N. (2001). Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food research international*, 34(2-3), 183-188.

Taborsky, J., Kunt, M., Kloucek, P., Lachman, J., Zeleny, V., & Kokoska, L. (2012). Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 1899-1906.

Tonutti, I., & Liddle, P. (2010). Aromatic plants in alcoholic beverages. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 341-350.

Tsimogiannis, D., Bimpilas, A., & Oreopoulou, V. (2017). DPPH radical scavenging and mixture effects of plant o-diphenols and essential oil constituents. *European journal of lipid science and technology*, 119(9), 16003473.

Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2018). A kinetic study of essential oil components distillation for the recovery of carvacrol rich fractions. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9, 117-123.

Zhou, H. Y., & Liu, C. Z. (2006). Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1129(1), 135-139.

Παράρτημα

ΠΙ. Εύρεση μέσης ροής διαλύτη στην εκχύλιση

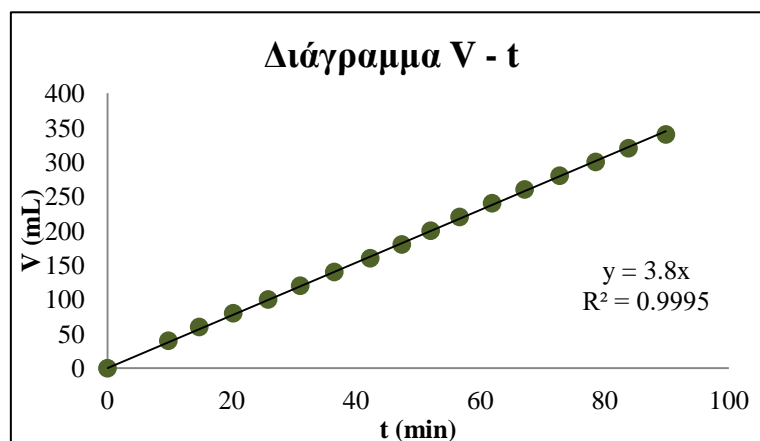
➤ Εκχύλιση ακετόνης πριν την απόσταξη του φυτού.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας Ι - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της εκχύλισης με ακετόνη.

t (min)	V (mL)	t (min)	V (mL)
0	0	52.02	200
9.80	40	56.67	220
14.77	60	61.90	240
20.23	80	67.13	260
25.85	100	72.77	280
31.02	120	78.57	300
36.50	140	83.85	320
42.28	160	89.87	340
47.37	180		

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα I - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της εκχύλισης με ακετόνη.

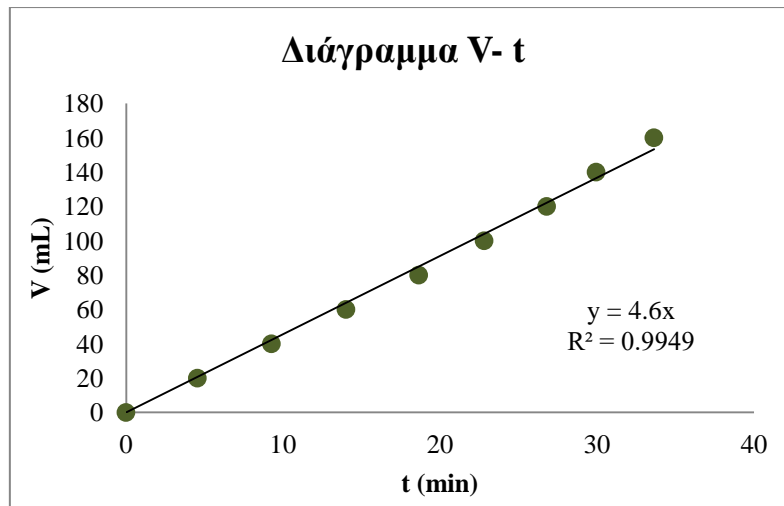
Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 3.8 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 3.8 mL/min.

Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκε η ροή της ακετόνης στη 2^η επανάληψη της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 2^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας II - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της εκχύλισης με ακετόνη.

t (min)	V (mL)
0	0
4.55	20
9.27	40
14.02	60
18.65	80
22.82	100
26.80	120
29.95	140
33.63	160

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα II - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της εκχύλισης με ακετόνη.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 4.6 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 4.6 mL/min.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέση ροή της εκχύλισης της ακετόνης ισούται με 4.3 ± 0.6 mL/min.

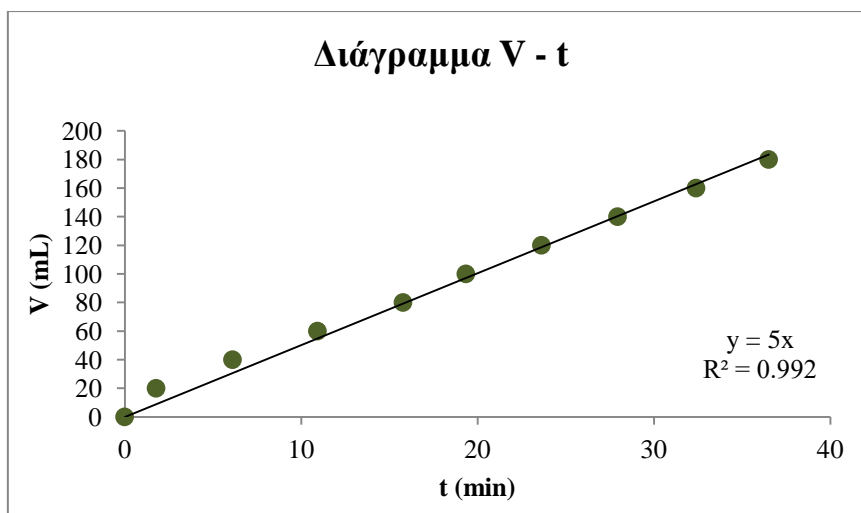
➤ Εκχύλιση νερού πριν την απόσταξη του φυτού.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με νερό.

Πίνακας III - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1η επανάληψη της εκχύλισης με νερό.

t (min)	V (mL)	t (min)	V (mL)
0	0	19.35	100
1.78	20	23.63	120
6.12	40	27.95	140
10.93	60	32.40	160
15.78	80	36.52	180

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα III - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1η επανάληψη της εκχύλισης με νερό.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 5 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 5 mL/min.

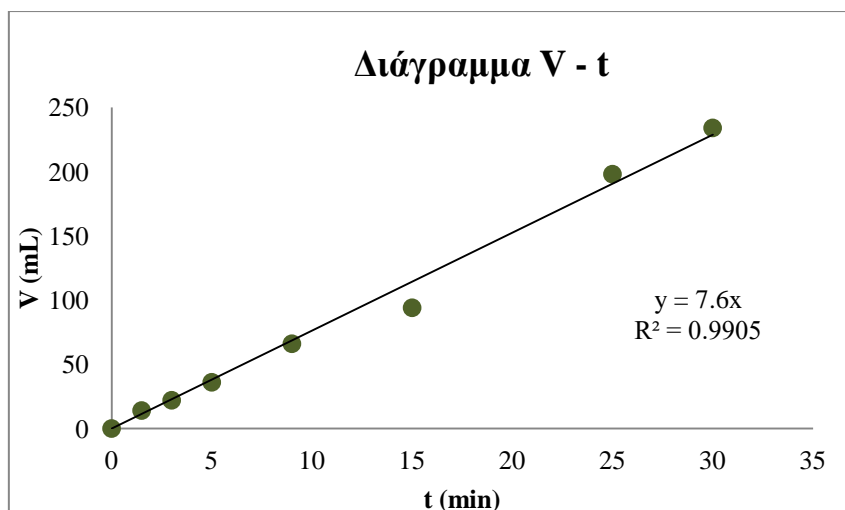
➤ Εκχύλιση ακετόνης πριν την απόσταξη του φυτού – κινητική μελέτη.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας IV - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	14
3	22
5	36
9	66
15	94
25	198
30	234

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα IV - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

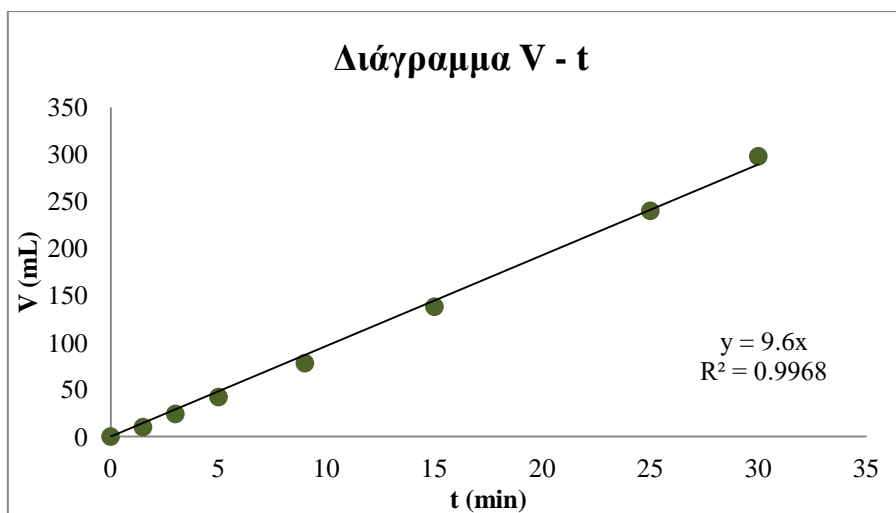
Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 7.6 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 7.6 mL/min.

Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκε η ροή της ακετόνης στη 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 2^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας V - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	10
3	24
5	42
9	78
15	138
25	240
30	298

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα V - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 9.6 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 9.6 mL/min.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέση ροή της εκχύλισης της ακετόνης ισούται με 9 ± 1 mL/min.

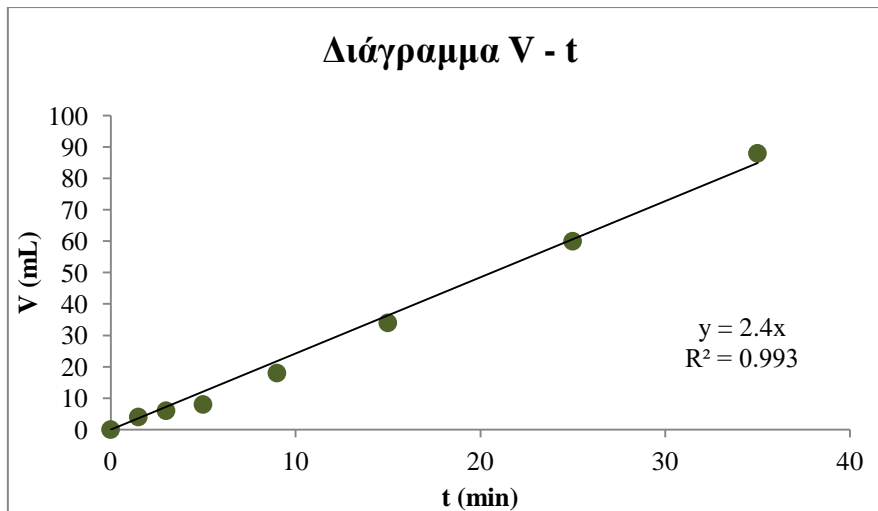
➤ Εκχύλιση νερού πριν την απόσταξη του φυτού – κινητική μελέτη.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

Πίνακας VI - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	4
3	6
5	8
9	18
15	34
25	60
35	88

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα VI - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

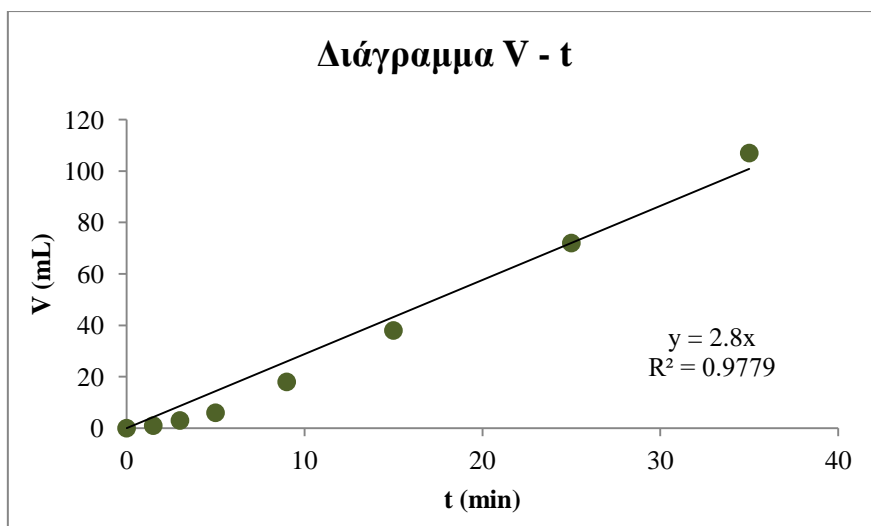
Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 2.4 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 2.4 mL/min.

Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκε η ροή του νερού στη 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 2^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με νερό.

Πίνακας VII - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	1
3	3
5	6
9	18
15	38
25	72
35	107

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα VII - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 2.8 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 2.8 mL/min.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέση ροή της εκχύλισης του νερού ισούται με 2.6 ± 0.3 mL/min.

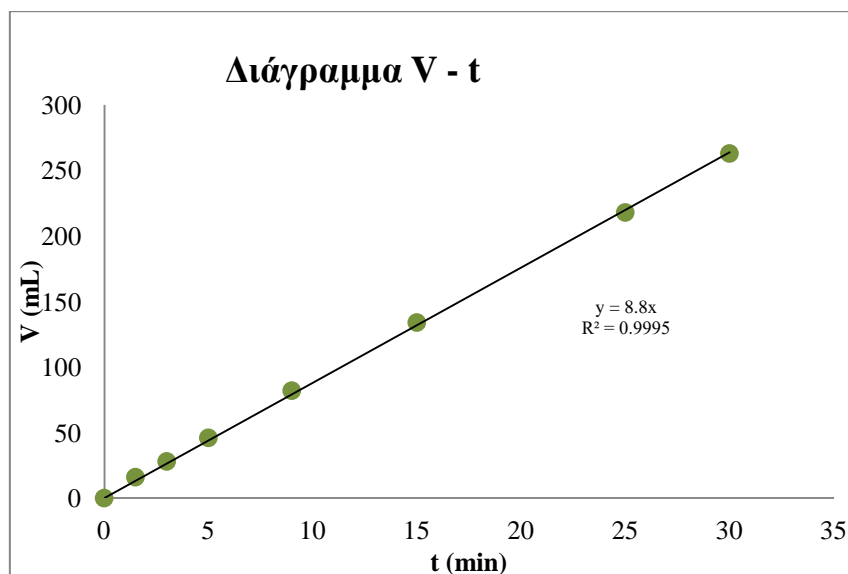
➤ Εκχύλιση ακετόνης μετά την απόσταξη του φυτού – κινητική μελέτη.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας VIII - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη του απελαιωμένου φυτού.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	16
3	28
5	46
9	82
15	134
25	218
30	263

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα VIII - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

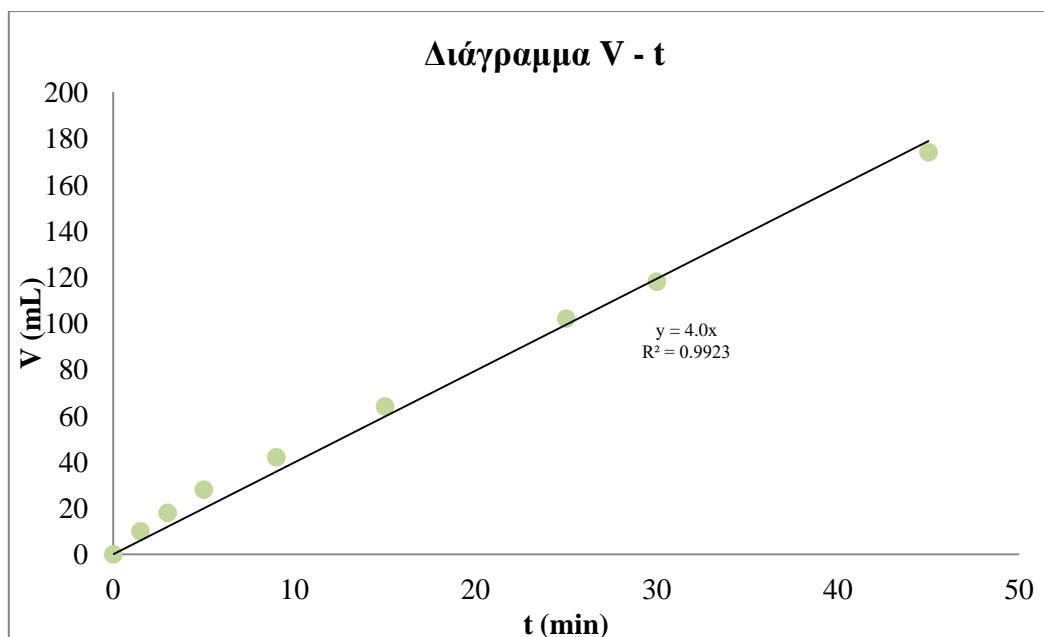
Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 8.8 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 8.8 mL/min.

Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκε η ροή της ακετόνης στη 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 2^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με ακετόνη.

Πίνακας IX - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη του απειλαιωμένου φυτού.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	10
3	18
5	28
9	42
15	64
25	102

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα IX - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με ακετόνη.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 4.0 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 4.0 mL/min.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέση ροή της εκχύλισης της ακετόνης ισούται με 6 ± 3 mL/min.

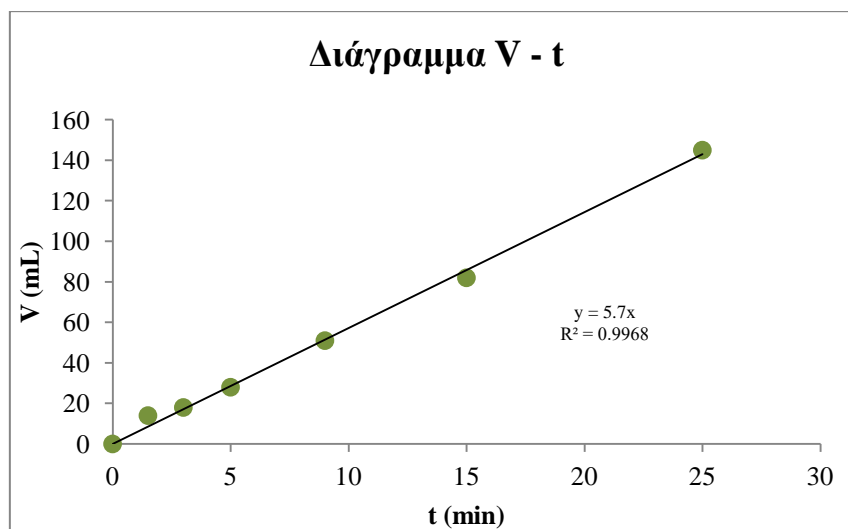
➤ Εκχύλιση νερού μετά την απόσταξη του φυτού – κινητική μελέτη.

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 1^{ης} επανάληψης της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

Πίνακας X - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό του απειλαιωμένου φυτού.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	14
3	18
5	28
9	51
15	82
25	145

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα X - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 1^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό του απειλαιωμένου φυτού.

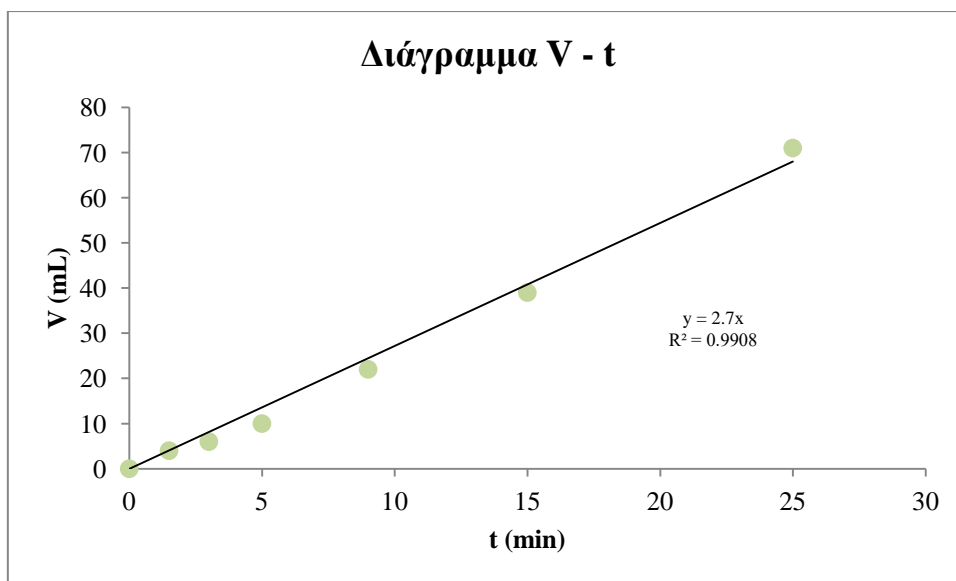
Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 5.7 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 5.7 mL/min.

Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκε η ροή του νερού στη 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα δεδομένα όγκου εκχυλίσματος – χρόνου εκχύλισης που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της 2^{ης} επανάληψης της εκχύλισης με νερό.

Πίνακας XI - Δεδομένα όγκου - χρόνου για την 2η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό του απειλαιωμένου φυτού.

t (min)	V (mL)
0	0
1.5	4
3	6
5	10
9	22
15	39
25	71

Τα παραπάνω δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα όγκου – χρόνου, στο οποίο εφαρμόστηκε γραμμική γραμμή τάσης.



Διάγραμμα XI - Διάγραμμα όγκου - χρόνου για την 2^η επανάληψη της κινητικής μελέτης της εκχύλισης με νερό.

Από τα παραπάνω, εξάγεται η εξίσωση που συνδέει τα δεδομένα του όγκου με αυτά του χρόνου, η οποία είναι η ακόλουθη: $V = 2.7 \cdot t$. Συνεπώς, η μέση ροή του διαλύτη ισούται με την κλίση της ευθείας, άρα είναι ίση με 2.7 mL/min.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η μέση ροή της εκχύλισης του νερού ισούται με 4 ± 2 mL/min.

Π2. Δεδομένα ολικού φαινολικού περιεχομένου αρωματικών φυτών

Στον παρακάτω πίνακα βλέπουμε τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών (TPC), εκφρασμένη σε mg GAE/g ξηρού βάρους φυτού για τα εκχυλίσματα από το δίκταμο και από το μελισσόχορτο, το δενδρολίβανο και το βαλσαμόχορτο. Να σημειωθεί εδώ ότι η εκχυλιστική διαδικασία ήταν η ίδια σε όλες τις περιπτώσεις, δηλαδή υπήρξε διπλή διαδοχική εκχύλιση, πρώτα με ακετόνη και ύστερα με νερό.

Πίνακας XII - Φαινολικό περιεχόμενο σε εκχυλίσματα ακετόνης και νερού για διάφορα αρωματικά φυτά.

Δείγμα	Συγκέντρωση TPC στο εκχύλισμα ακετόνης (mg GAE/g ξ.β. φυτού)	Συγκέντρωση TPC στο εκχύλισμα νερού (mg GAE/g ξ.β. φυτού)
Δίκταμο	22.3 ± 0.1	103 ± 29
Μελισσόχορτο	2.3 ± 0.2	74 ± 5
Δενδρολίβανο	17.5 ± 1.4	44.5 ± 3.8
Βαλσαμόχορτο	15.8 ± 0.7	35.8 ± 7.3

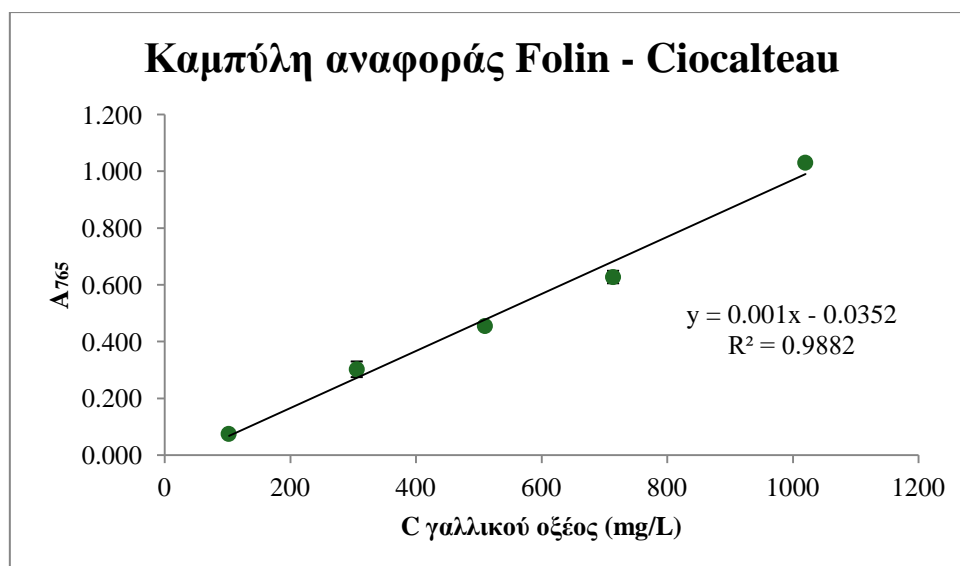
Π3. Καμπύλες αναφοράς

Ξεκινώντας με την καμπύλη αναφοράς Folin – Ciocalteu, παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα δεδομένα για τη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος (καθώς και την αντίστοιχη αραιώση) και την απορρόφηση του διαλύματος στα 765 nm (Πίνακας XIII), ενώ στο Διάγραμμα XII φαίνεται η γραμμική συσχέτιση αυτών των 2 μεγεθών.

Πίνακας XIII - Δεδομένα συγκέντρωσης γαλλικού οξέος και απορρόφησης στα 765 nm.

Αραίωση διαλύματος	C γαλλικού οξέος (mg/L)	Απορρόφηση στα 765 nm	Μέση απορρόφηση	Τυπική απόκλιση
0.1C	102	0.07	0.075	0.007
		0.08		
0.3C	306	0.322	0.303	0.028
		0.283		
0.5C	510	0.456	0.455	0.001
		0.454		

0.7C	714	0.643	0.628	0.022
		0.612		
C	1020	1.028	1.031	0.004
		1.033		



Διάγραμμα XII - Καμπύλη αναφοράς Folin - Ciocalteu.

Επομένως, έχοντας εφαρμόσει γραμμή τάσης στα δεδομένα, προκύπτει η σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών (C) εκφρασμένη ως προς ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/L) με την απορρόφηση (A) στα 765 nm:

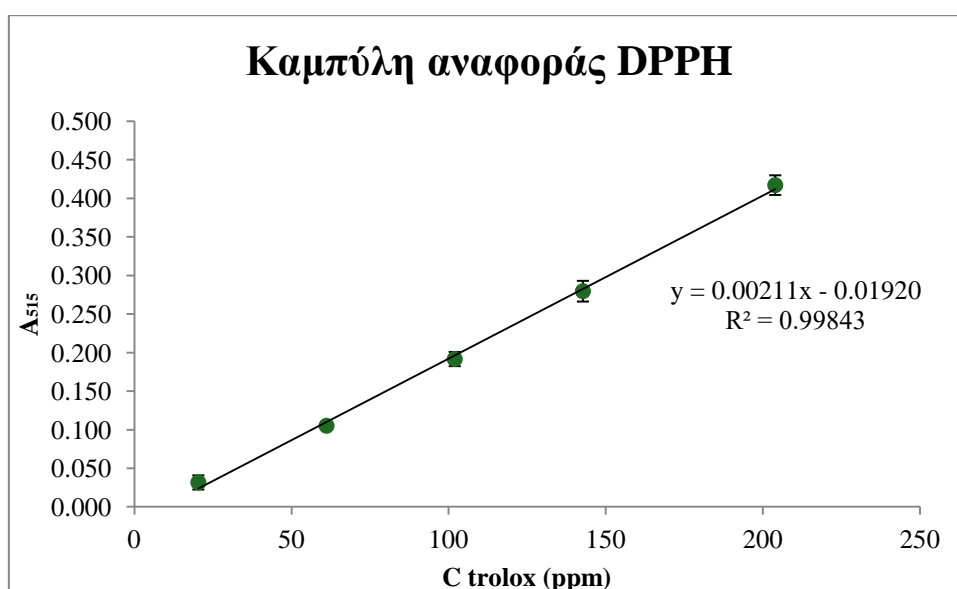
$$A = 0.001 \cdot C - 0.0352$$

Συνεχίζοντας με την καμπύλη αναφοράς για τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών με τη μέθοδο DPPH, στον Πίνακα XIV παρουσιάζονται τα δεδομένα της αραιώσης και της συγκέντρωσης Trolox στο κάθε διάλυμα και της απορρόφησης στα 515 nm, ενώ στο Διάγραμμα XIII απεικονίζεται η γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους.

Πίνακας XIV - Δεδομένα συγκέντρωσης Trolox και απορρόφησης στα 515 nm.

Αραίωση	Συγκέντρωση Trolox (ppm)	$A_{\text{τυφλού}}$ στα 515 nm	$A_{\text{δείγματος}}$ στα 515 nm	$A_{\text{τυφλού}} - A_{\text{δείγματος}}$	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0.1C	20.4	0.718	0.693	0.025	0.032	0.009
		0.718	0.680	0.038		
0.3C	61.2	0.718	0.611	0.107	0.105	0.003

		0.718	0.615	0.103		
0.5C	102.0	0.718	0.533	0.185	0.192	0.009
		0.718	0.520	0.198		
0.7C	142.8	0.687	0.417	0.270	0.280	0.013
		0.687	0.398	0.289		
C	204.0	0.687	0.261	0.426	0.417	0.013
		0.687	0.279	0.408		



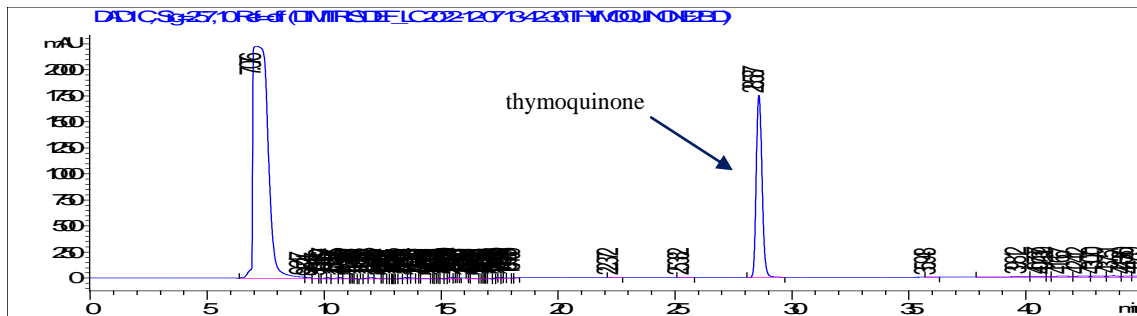
Διάγραμμα XIII - Καμπύλη αναφοράς DPPH.

Έχοντας εφαρμόσει γραμμή τάσης στα δεδομένα, προκύπτει η σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών ουσιών (C) εκφρασμένη ως προς ισοδύναμα Trolox (mg Trolox/L) με την απορρόφηση (A) στα 765 nm:

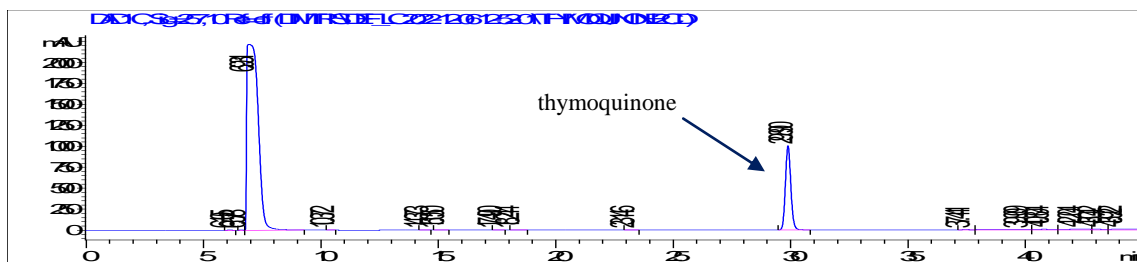
$$A = 0.00211 \cdot C - 0.01920$$

Τέλος, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς που συνδέει το εμβαδό της κορυφής του εκάστοτε χρωματογραφήματος που αντιστοιχεί στη θυμοκινίνη με τη συγκέντρωσή της στο διάλυμα. Η εν λόγω διαδικασία έγινε μέσω HPLC. Αρχικά, στα Σχήματα I – V παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα για την εκάστοτε συγκέντρωση θυμοκινίνης, καθώς και η κορυφή της. Στον Πίνακα XV παρουσιάζονται τα δεδομένα για τους όγκους έγχυσης της κάθε ανάλυσης, τη συγκέντρωση της

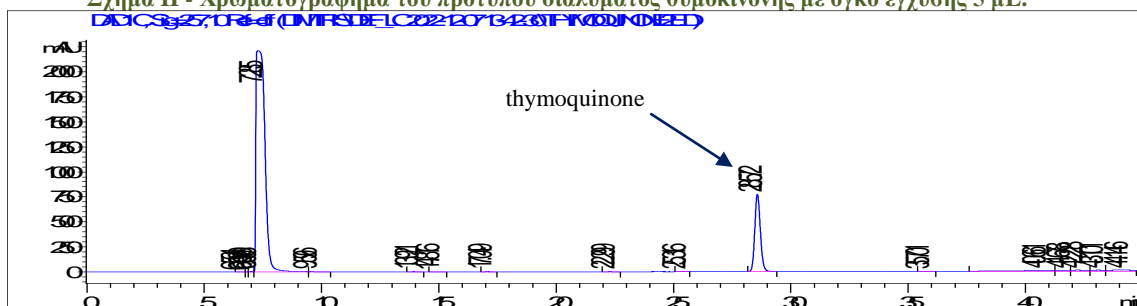
θυμοκινόνης σε κάθε έγχυση και το εμβαδό της κάθε κορυφής, ενώ, τελικά, στο Διάγραμμα X παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς της θυμοκινόνης.



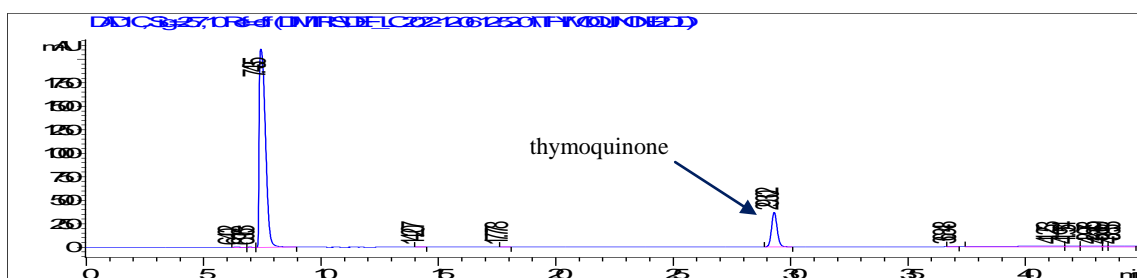
Σχήμα I- Χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος θυμοκινόνης με όγκο έγχυσης 10 µL.



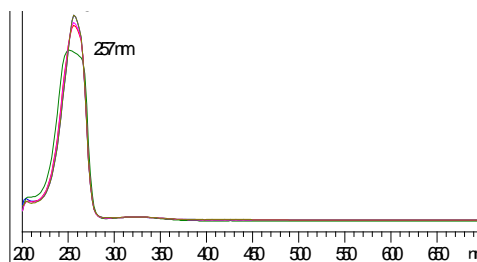
Σχήμα II - Χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος θυμοκινόνης με όγκο έγχυσης 5 µL.



Σχήμα III - Χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος θυμοκινόνης με όγκο έγχυσης 4 µL.



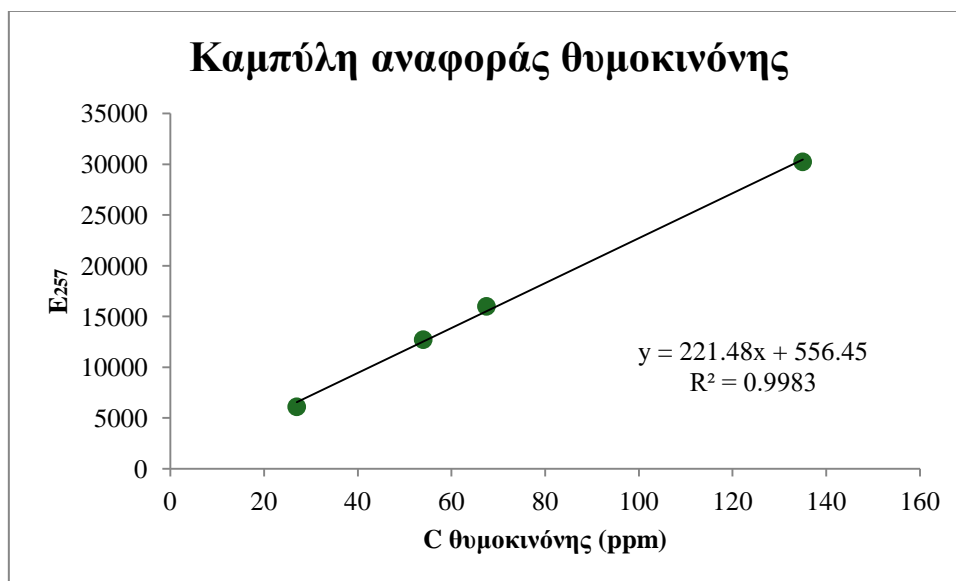
Σχήμα IV - Χρωματογράφημα του προτύπου διαλύματος θυμοκινόνης με όγκο έγχυσης 2 µL.



Σχήμα V - Κορυφή της θυροκινόνης στα 257 nm.

Πίνακας XV - Δεδομένα συγκέντρωσης θυροκινόνης και εμβαδού κορυφών της στα 257 nm.

Αραίωση	Όγκος έγχυσης (μL)	Συγκέντρωση θυροκινόνης (ppm)	Εμβαδό κορυφής στα 257 nm
0.5C	10	135	30228.3
0.25C	5	67.5	15988.9
0.2C	4	54	12706.6
0.1C	2	27	6092.5



Διάγραμμα XIV1 - Καμπύλη αναφοράς θυροκινόνης.

Γίνεται αντιληπτό, επομένως, ότι η σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση της θυροκινόνης (C) με το εμβαδό της κορυφής της στα 257 nm (E) είναι γραμμική και είναι της μορφής:

$$E = 221.48 \cdot C + 556.45$$

Π4. Υπολογισμοί στα πειράματα κινητικής μελέτης.

- Κινητική μελέτη παραλαβής TPC από το μη απεσταγμένο δίκταμο.

Ξεκινώντας από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών για κάθε χρονική στιγμή στο εκχύλισμα (C_i), αρχικά υπολογίστηκε ο όρος dC/dV ως

εξής: $\frac{dC}{dV} = \frac{dC_i \left(\frac{\text{mg}}{\text{g ξ.β. φυτού}} \right)}{V_{\text{Folin}}(\text{L})}$. Για να βρεθεί η συγκέντρωση των φαινολικών (dC_i),

χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη σχέση:

$$dC_i = \frac{dC_x \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{Folin}}(\text{L})}{W_{\text{φυτού}}(\text{g})}$$

όπου:

- dC_x η διαφορική συγκέντρωση των δειγμάτων σε TPC, εκφρασμένη ως προς mg GAE/L (υπολογίζεται μέσω καμπύλης αναφοράς).
- V_{Folin} ο όγκος του εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται στην αντίδραση Folin. Στην περίπτωση των δειγμάτων του ακετονικού εκχυλίσματος, ο όγκος αυτός είναι ίσος με 20 μL , ή $2 \cdot 10^{-6}$ L, ενώ στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος, ισούται με 50 μL , ή $5 \cdot 10^{-6}$ L (βλ. κεφάλαιο 4.4.3).
- $W_{\text{φυτού}}$ το ξηρό βάρος του δίκταμου που τοποθετήθηκε στην εκχυλιστική στήλη κάθε φορά.

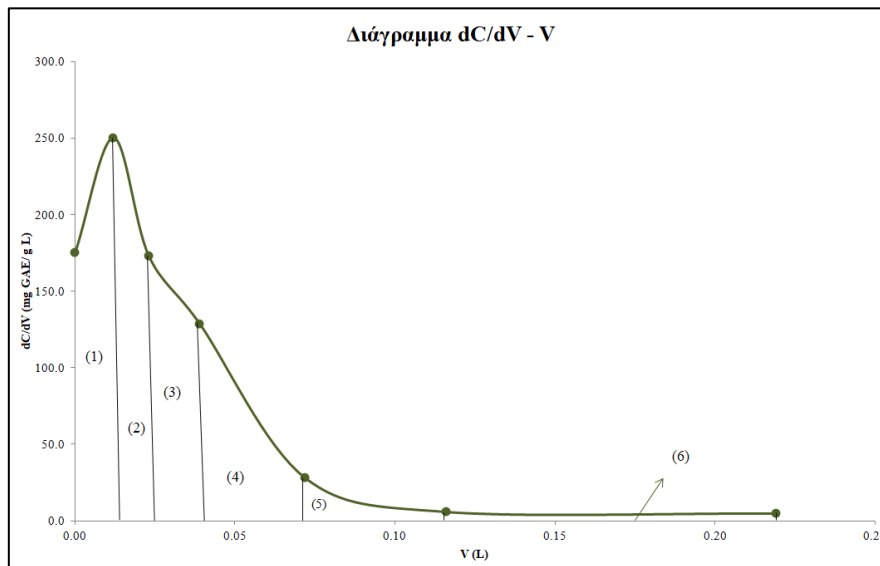
Μέσω της εύρεσης του dC/dV , κατασκευάζεται διάγραμμα $dC/dV - V_{\text{εκχυλίσματος}}$. Ο λόγος που κατασκευάστηκε αυτό το διάγραμμα είναι γιατί, μέσω του εμβαδού μεταξύ των αξόνων και της καμπύλης που σχηματίζεται, υπολογίζεται το C_i . Στους παρακάτω πίνακες, παρουσιάζονται τα δεδομένα απορρόφησης των εκχυλισμάτων ακετόνης και νερού, η συγκέντρωση dC_i και ο όρος dC/dV σε κάθε περίπτωση. Να σημειωθεί ότι στους πίνακες παρατίθεται η τελική απορρόφηση, όπου ισούται με την αρχική απορρόφηση πολλαπλασιασμένη με την αραιώση του δείγματος. Τα δεδομένα $dC/dV - V$ για το κάθε εκχύλισμα προσαρμόστηκαν στα ανάλογα διαγράμματα (Διαγράμματα XV, XVI).

Πίνακας XVI - Δεδομένα απορρόφησης των δειγμάτων εκχύλισης με ακετόνη του φυτού πριν την απόσταξη, συγκέντρωση TPC σε mg GAE/g φυτού και dC/dV.

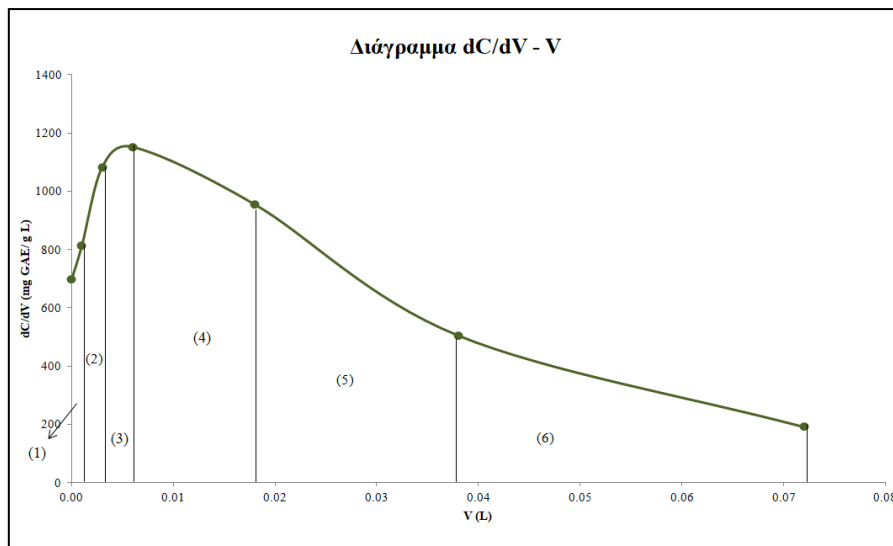
t (min)	Τελική απορρόφηση στα 765 nm		dC _i (mg GAE/g φυτού)	dC/dV
	1 ^η επανάληψη	2 ^η επανάληψη		
0	5.095	1.88	0.0030 ±0.003	175 ± 113
1.5	5.98	4.02	0.0040 ± 0.003	250 ± 69
3	2.785	4.12	0.004 ±0.001	173 ± 47
5	2.81	2.3	0.0026 ± 0.0004	129 ± 18
9	0.34	0.715	0.0020 ± 0.002	28 ± 13
15	0.04	0.126	0.0004 ± 0.001	6 ± 3
25	0	0.123	0.0004 ± 0.001	5 ± 4

Πίνακας XVII - Δεδομένα απορρόφησης των δειγμάτων εκχύλισης με νερό του φυτού πριν την απόσταξη, συγκέντρωση TPC σε mg GAE/g φυτού και dC/dV.

t (min)	Τελική απορρόφηση στα 765 nm		dC _i (mg GAE/g φυτού)	dC/dV
	1 ^η επανάληψη	2 ^η επανάληψη		
0	15.5	11.4	0.03±0.01	699 ± 103
1.5	17.4	13.9	0.041 ± 0.004	814 ± 73
3	24.8	17	0.08±0.05	1083 ± 212
5	23.6	20.6	0.115 ±0.003	1152 ± 31
9	22.4	14.5	0.10 ± 0.02	955 ± 225
15	12.45	7.1	0.10 ± 0.03	505 ± 162
25	3.89	3.41	0.00192 ± 0.00004	192 ± 4



Διάγραμμα XV - Διάγραμμα dC/dV - V για την κινητική μελέτη παραλαβής TPC στο εκχύλισμα ακετόνης του φυτού πριν την απόσταξη.



Διάγραμμα XVI - Διάγραμμα dC/dV - V για την κινητική μελέτη παραλαβής TPC στο εκχύλισμα νερού του φυτού πριν την απόσταξη.

Το χωρίο κάτω από την κάθε καμπύλη χωρίζεται, βάσει των σημείων, σε 6 τμήματα. Το εμβαδό του κάθε τμήματος (E_i , όπου $i=1 - 6$) υπολογίζεται μέσω της μεθόδου του τραπεζιού. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκεται ως εξής:

$$E_i = \frac{\left(\frac{dC}{dV}\right)_i + \left(\frac{dC}{dV}\right)_{i-1}}{2} \cdot (V_i - V_{i-1})$$

Τελικά, το C_t υπολογίζεται ως εξής: $C_{t,i} = C_{t,i-1} + E_i$. Στην περίπτωση όπου $i=1$, το $C_{t,0}$ ισούται με το dC_0 .

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ανωτέρω υπολογισμών, δηλαδή τα εμβαδά σε κάθε περίπτωση (E_i), καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαινολών στο εκχύλισμα, εκφραζόμενες ως προς mg GAE/g ξηρού φυτού, τόσο για το εκχύλισμα ακετόνης, όσο και για το εκχύλισμα νερού και ο όρος $\ln(C_{inf} - C_t)$ για την προσαρμογή στο 2^ο νόμο του Fick.

Πίνακας XVIII - Αποτελέσματα υπολογισμών για εμβαδά και συγκέντρωση εκχυλιζόμενων φαινολών στο εκχύλισμα ακετόνης του φυτού πριν την απόσταξη.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg GAE/g ξηρού φυτού)
0	-	0.003 ± 0.003
1.5	3 ± 2	3 ± 2
3	2.3 ± 0.8	5.0 ± 0.9
5	2.4 ± 0.7	7.4 ± 0.3
9	2.6 ± 0.3	10.00
15	0.8 ± 0.7	10.8 ± 0.7
25	0.5 ± 0.4	11 ± 1
Συνολικό:	-	14 ± 2

Πίνακας XIX1 - Αποτελέσματα υπολογισμών για εμβαδά και συγκέντρωση εκχυλιζόμενων φαινολών στο εκχύλισμα νερού του φυτού πριν την απόσταξη.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg GAE/g ξηρού φυτού)
0	-	0.03 ± 0.01
1.5	2 ± 2	2 ± 2
3	1.9 ± 0.3	4 ± 2
5	2.8 ± 0.5	7 ± 2
9	11.50 ± 0.08	18 ± 2
15	13 ± 1	31 ± 3
25	10.2 ± 0.5	41 ± 3
Συνολικό:	-	72 ± 39

Πίνακας XX - Αποτελέσματα υπολογισμών του όρου $\ln(C_{inf} - C_t)$ για το εκχύλισμα ακετόνης και νερού, του μη απεσταγμένου φυτού, για την εφαρμογή στο 2ο νόμο Fick.

t (min)	$\ln(C_{inf} - C_t)$	
	Εκχύλισμα ακετόνης	Εκχύλισμα νερού
0	2.6349 ± 0.0002	4.2787 ± 0.0001
1.5	2.4 ± 0.2	4.25 ± 0.03
3	2.2 ± 0.1	4.22 ± 0.03
5	1.88 ± 0.04	4.18 ± 0.02
9	1.3724 ± 0.0003	3.99 ± 0.03
15	1.1 ± 0.2	3.7 ± 0.1
25	0.9 ± 0.4	3.4 ± 0.1

- Κινητική μελέτη παραλαβής θυμοκινόνης & καρβακρόλης από το εκχύλισμα ακετόνης του μη απεσταγμένου δίκταμου.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, μέσω της ανάλυσης HPLC. Αναλυτικότερα, υπολογίστηκε ο όρος dC/dV ως εξής: $\frac{dC}{dV} = \frac{dC_i \left(\frac{\text{mg}}{\text{g ξ.β.φυτού}} \right)}{V_{\text{injection(L)}}$. Για να βρεθεί η συγκέντρωση των ουσιών (dC_i), χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη σχέση:

$$dC_i = \frac{dC_x \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot V_{\text{injection(L)}}}{W_{\text{φυτού}} (\text{g})}$$

όπου:

- dC_x η διαφορική συγκέντρωση των δειγμάτων σε θυμοκινόνη ή καρβακρόλη αντίστοιχα, εκφρασμένη ως προς mg/L (υπολογίζεται μέσω καμπύλης αναφοράς).
- $V_{\text{injection}}$ ο όγκος έγχυσης της κάθε ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνους 0, 1.5 και 3 min, το $V_{\text{injection}}$ ισούται με $5 \cdot 10^{-6}$ L, ενώ στα δείγματα των χρόνων 5,9 και 15 min, καθώς και στο συνολικό δείγμα, το $V_{\text{injection}}$ ισούται με 10^{-5} L.
- $W_{\text{φυτού}}$ το ξηρό βάρος του δίκταμου που τοποθετήθηκε στην εκχυλιστική στήλη κάθε φορά.

Μέσω της εύρεσης του dC/dV , κατασκευάζεται διάγραμμα $dC/dV - V_{\text{εκχυλίσματος}}$. Στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το dC_i και το dC/dV , καθώς και για τον όρο $\ln(C_{\text{inf}} - C_t)$ για τη θυμοκινόνη και την καρβακρόλη.

Πίνακας XXI- Αποτελέσματα συγκέντρωσης και dC/dV της θυμοκινόνης στα δείγματα κινητικής μελέτης της ακετονικής εκχύλισης του μη απεσταγμένου φυτού.

t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg/g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^{-5}$	t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg/g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^{-5}$
0	8 ± 2	1.7 ± 0.4	5	9 ± 2	0.9 ± 0.2
1.5	12 ± 1	2.5 ± 0.3	9	2 ± 1	0.2 ± 0.1
3	8.2 ± 0.6	1.6 ± 0.1	15	0.11 ± 0.04	0.011 ± 0.004

Πίνακας XXII - Αποτελέσματα συγκέντρωσης και dC/dV της καρβακρόλης στα δείγματα κινητικής μελέτης της ακετονικής εκχύλισης του μη απεσταγμένου φυτού.

t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg/g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^{-5}$	t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg/g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^{-5}$
0	174 ± 51	35 ± 10	5	189 ± 40	19 ± 4
1.5	271 ± 30	54 ± 6	9	39 ± 22	4 ± 2
3	176 ± 12	35 ± 2	15	4.1 ± 0.5	0.41 ± 0.05

Πίνακας XXIII - Αποτελέσματα υπολογισμών του όρου $\ln(C_{\text{inf}} - C_t)$ για τη θυμοκινόνη και την καρβακρόλη, του εκχυλίσματος ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

t (min)	$\ln(C_{\text{inf}} - C_t)$	
	Θυμοκινόνη	Καρβακρόλη
0	0.63257 ± 0.00001	2.8 ± 0.4
1.5	0.5 ± 0.1	2.3 ± 0.5
3	0.34 ± 0.02	1.8 ± 0.8
5	0.19 ± 0.02	1.2 ± 0.9
9	0.018 ± 0.001	1.2 ± 0.1
15	-0.04 ± 0.06	0.8 ± 0.3

Παρομοίως με παραπάνω, τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα $dC/dV - V_{\text{εκχυλίσματος}}$, μέσω του οποίου υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα εμβαδά (E_i). Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ανωτέρω υπολογισμών, δηλαδή τα εμβαδά σε κάθε περίπτωση (E_i), καθώς και η συγκέντρωση θυμοκινόνης ή καρβακρόλης αντίστοιχα για κάθε χρόνο αντίστοιχα, εκφραζόμενη ως προς mg/g ξηρού φυτού.

Πίνακας XXIV – Αποτελέσματα εμβαδών και συγκεντρώσεων θυμοκινόνης στα δείγματα κινητικής μελέτης της εκχύλισης ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg /g ξηρού φυτού)
0	-	0.00008 ± 0.00002
1.5	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
3	0.22 ± 0.07	0.48 ± 0.3
5	0.20 ± 0.01	0.68 ± 0.02
9	0.19 ± 0.02	0.864 ± 0.01
15	0.06 ± 0.06	0.93 ± 0.06
Συνολικό:	-	1.9 ± 0.2

Πίνακας XXV2 - Αποτελέσματα εμβαδών και συγκεντρώσεων καρβακρόλης στα δείγματα κινητικής μελέτης της εκχύλισης ακετόνης του μη απεσταγμένου φυτού.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg /g ξηρού φυτού)
0	-	0.0017 ± 0.0005
1.5	5 ± 2	5 ± 2
3	5 ± 1	10.3 ± 0.8
5	4.3 ± 0.3	14.6 ± 0.6
9	3.7 ± 0.2	18.3 ± 0.4
15	1 ± 1	19.4 ± 0.6
Συνολικό:	-	22 ± 1

➤ Κινητική μελέτη παραλαβής TPC από το απεσταγμένο δίκταμο.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη διαφορική συγκέντρωση (dC_i) των TPC, καθώς και του όρου dC/dV , στο εκχύλισμα ακετόνης και νερού του απεσταγμένου δίκταμου, υπολογισμένοι σύμφωνα με τις προαναφερθείσες σχέσεις. Να σημειωθεί εδώ ότι, ως V_{Folin} , στην περίπτωση των δειγμάτων του ακετονικού εκχυλίσματος, λαμβάνονται τα 100 μL , ή $100 \cdot 10^{-6}$ L, ενώ

στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος, λαμβάνονται 250 μL , ή $250 \cdot 10^{-6}$ L, για τους χρόνους 0,1.5 και 3 min, και στους υπόλοιπους χρόνους 10 μL ή $10 \cdot 10^{-6}$ L (βλ. κεφάλαιο 4.4.3).

Πίνακας XXVI - Δεδομένα απορρόφησης των δειγμάτων εκχύλισης με ακετόνη του φυτού μετά την απόσταξη, συγκέντρωση TPC σε mg GAE/g φυτού και dC/dV.

t (min)	dC _i (mg GAE/g ξ.β. φυτού)	dC/dV
0	0.0021 ± 0.0007	107 ± 37
1.5	0.003 ± 0.002	65 ± 35
3	0.003 ± 0.002	27 ± 20
5	0.0019 ± 0.0007	19 ± 7
9	0.0013 ± 0.0009	13 ± 9
15	0.0006 ± 0.0008	6 ± 8

Στους παρακάτω πίνακες, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εμβαδών που προκύπτουν από την εφαρμογή των ανωτέρω υπολογισμών σε καμπύλη dC/dV – V_{εκχυλίσματος}, καθώς και η υπολογιζόμενη συγκέντρωση των φαινολικών του εκχυλίσματος ακετόνης.

Πίνακας XXVII - Αποτελέσματα εμβαδών και συγκεντρώσεων TPC στα δείγματα κινητικής μελέτης της εκχύλισης ακετόνης του απεσταγμένου φυτού.

t (min)	E _i	C _{i,i} (mg GAE/g ξηρού φυτού)
0	-	0.002 ± 0.001
1.5	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
3	0.3 ± 0.3	1.3 ± 0.5
5	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.6
9	0.27 ± 0.06	1.8 ± 0.7
15	0.2 ± 0.2	2.0 ± 0.9
Συνολικό:		3.3 ± 0.4

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η προσαρμογή των παραπάνω δεδομένων στο 2^ο νόμο του Fick, δηλαδή ο όρος $\ln(C_{\text{inf}} - C_t)$ για τα 2 εκχυλίσματα.

Πίνακας XXVIII3 - Αποτελέσματα υπολογισμών του όρου $\ln(C_{inf} - C_t)$ για το εκχύλισμα ακετόνης, του απεσταγμένου φυτού, για την εφαρμογή στο 2ο νόμο Fick.

t (min)	$\ln (C_{inf} - C_t)$
0	1.8782 ± 0.0001
1.5	1.71 ± 0.03
3	1.65 ± 0.09
5	1.6 ± 0.1
9	1.6 ± 0.1
15	1.5 ± 0.2
25	-

- Κινητική μελέτη παραλαβής θυμοκινόνης & καρβακρόλης από το εκχύλισμα ακετόνης του απεσταγμένου δίκταμου.

Παρόμοια διαδικασία με παραπάνω ακολουθήθηκε κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης της θυμοκινόνης και της καρβακρόλης, μέσω της ανάλυσης HPLC. Να σημειωθεί εδώ ότι ως $V_{injection}$ χρησιμοποιήθηκε, για τα δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνους 0 και 1.5 min, τα 10^{-5} L, ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα $2 \cdot 10^{-5}$ L.

Μέσω της εύρεσης του dC/dV , κατασκευάζεται διάγραμμα $dC/dV - V_{εκχυλίσματος}$. Στους πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το dC_i και το dC/dV .

Πίνακας XXIX – Αποτελέσματα συγκέντρωσης και dC/dV της θυμοκινόνης στα δείγματα κινητικής μελέτης της ακετονικής εκχύλισης του απεσταγμένου φυτού.

t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg /g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^{-5}$
0	7 ± 2	7 ± 2
1.5	3.2 ± 0.9	3.2 ± 0.9
3	3 ± 2	1 ± 1
5	1.1 ± 0.9	0.6 ± 0.5
9	0.8	0.4

Πίνακας XXX4 - Αποτελέσματα συγκέντρωσης και dC/dV της καρβακρόλης στα δείγματα κινητικής μελέτης της ακετονικής εκχύλισης του απεσταγμένου φυτού.

t (min)	$dC_i \cdot 10^{-5}$ (mg/g φυτού)	$dC/dV \cdot 10^5$
0	117 ± 43	12 ± 4
1.5	58 ± 16	6 ± 2
3	48 ± 35	2 ± 2
5	24 ± 16	1.2 ± 0.8
9	18	0.9

Παρομοίως με παραπάνω, τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε διάγραμμα $dC/dV - V_{\text{εκχυλίσματος}}$, μέσω του οποίου υπολογίστηκαν τα αντίστοιχα εμβαδά (E_i). Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ανωτέρω υπολογισμών, δηλαδή τα εμβαδά σε κάθε περίπτωση (E_i), καθώς και η συγκέντρωση θυμοκινόνης ή καρβακρόλης αντίστοιχα για κάθε χρόνο αντίστοιχα, εκφραζόμενη ως προς mg/g ξηρού φυτού.

Πίνακας XXXI5 – Αποτελέσματα εμβαδών και συγκεντρώσεων θυμοκινόνης στα δείγματα κινητικής μελέτης της εκχύλισης ακετόνης του απεσταγμένου φυτού.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg /g ξηρού φυτού)
0	-	0.00007 ± 0.00002
1.5	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
3	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.01
5	0.009 ± 0.007	0.083 ± 0.004
9	0.009*	0.0891 ± 0.0004
Συνολικό:		0.09 ± 0.04

Πίνακας XXXII - Αποτελέσματα εμβαδών και συγκεντρώσεων καρβακρόλης στα δείγματα κινητικής μελέτης της εκχύλισης ακετόνης του απεσταγμένου φυτού.

t (min)	E_i	$C_{t,i}$ (mg /g ξηρού φυτού)
0	-	0.0012 ± 0.0004
1.5	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.4
3	0.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2
5	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1
9	0.2*	1.6 ± 0.1

Συνολικό:	2.1 ± 0.6
-----------	------------------

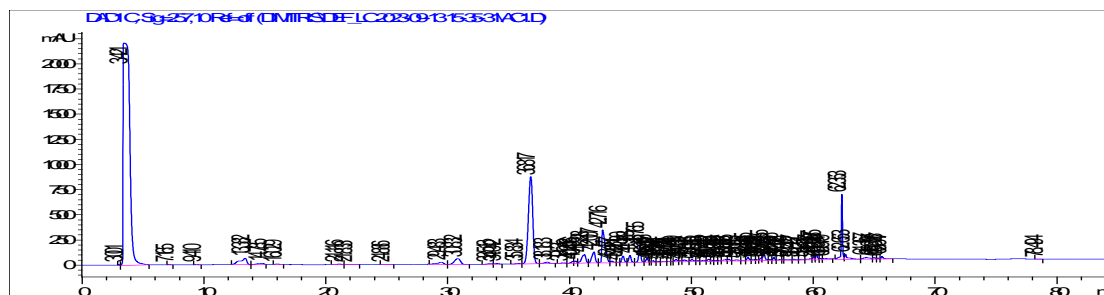
Πίνακας XXXIII - Αποτελέσματα υπολογισμών του όρου $\ln(C_{inf} - C_t)$ για τη θυμοκινόνη του ακετονικού εκχυλίσματος του απεσταγμένου φυτού, για την εφαρμογή στο 2ο νόμο Fick.

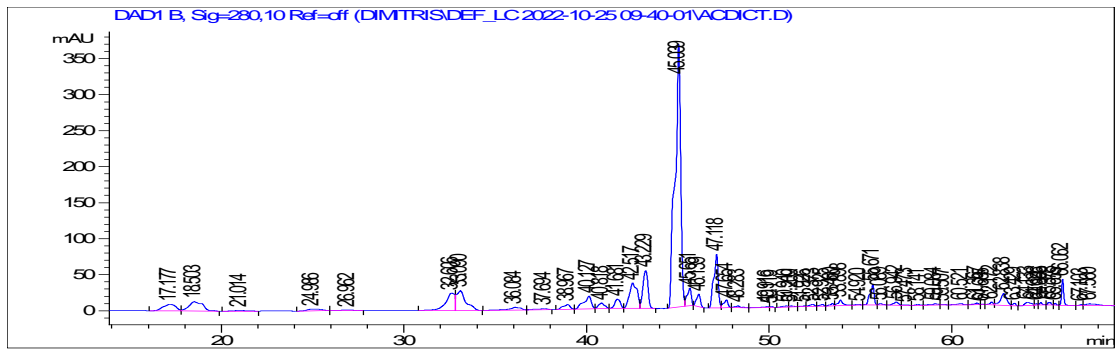
t (min)	$\ln(C_{inf} - C_t)$ της θυμοκινόνης
0	-2.1376 ± 0.0002
1.5	-2.9 ± 0.4
3	-3.1 ± 0.3
5	-3.4 ± 0.1
9	-2.4*

*Προέρχονται από μονή μέτρηση.

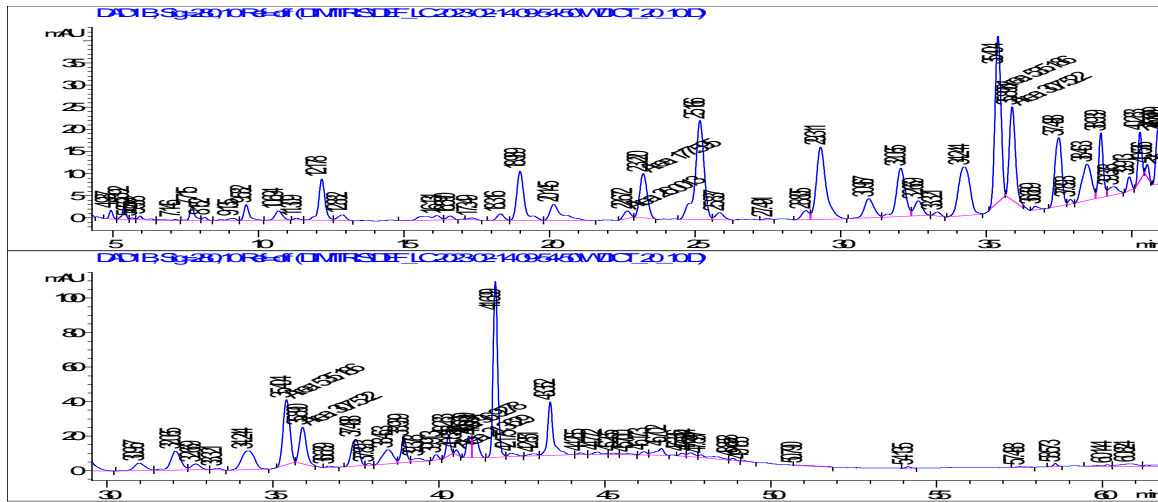
Π5. Χρωματογραφήματα HPLC

- Χρωματογραφήματα εκχυλίσματος ακετόνης του μη απεσταγμένου δίκταμου.

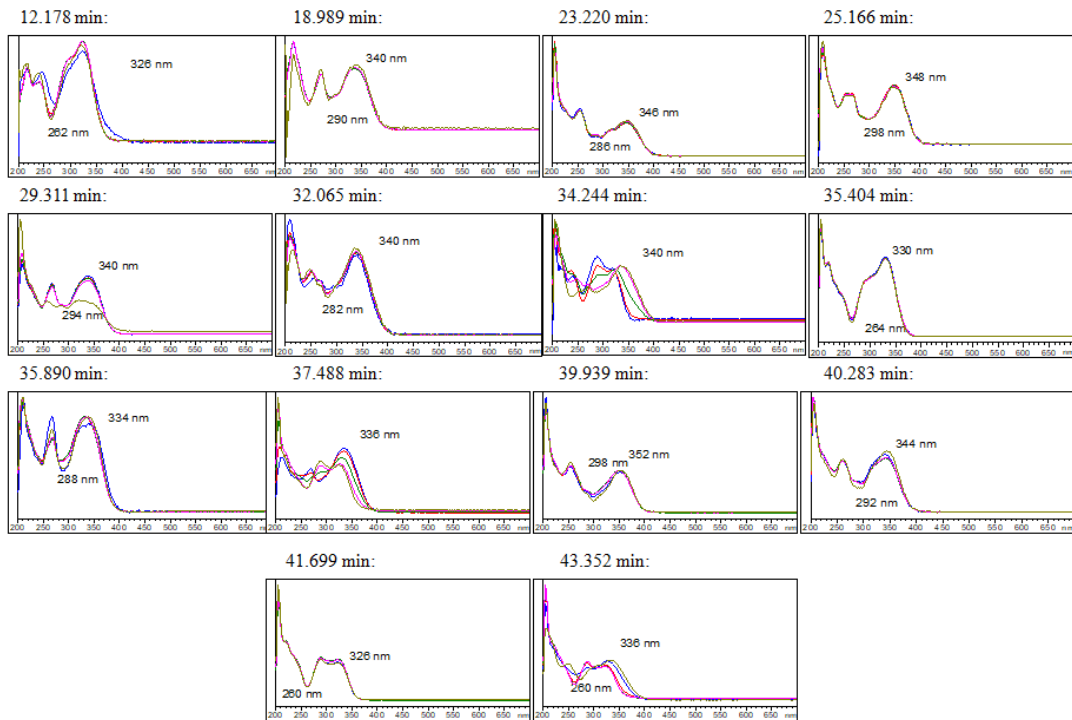




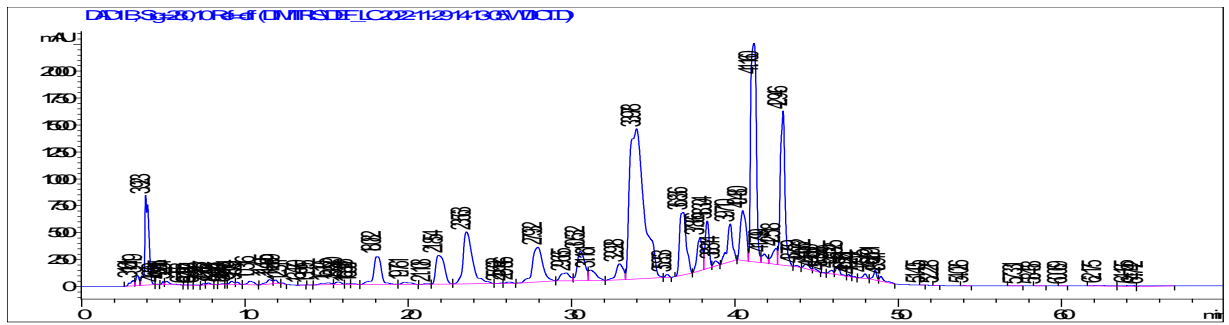
➤ Χρωματογραφήματα εκχυλίσματος νερού του μη απεσταγμένου δίκταμου

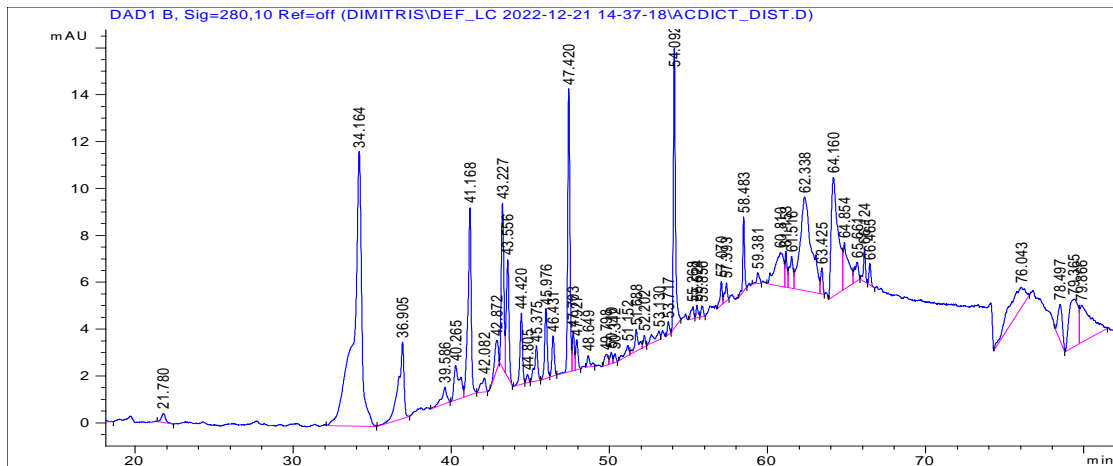


Σχήμα VI – Χρωματογράφημα του 1^{ου} εκχυλίσματος νερού του μη απεσταγμένου φυτού στα 280 nm.

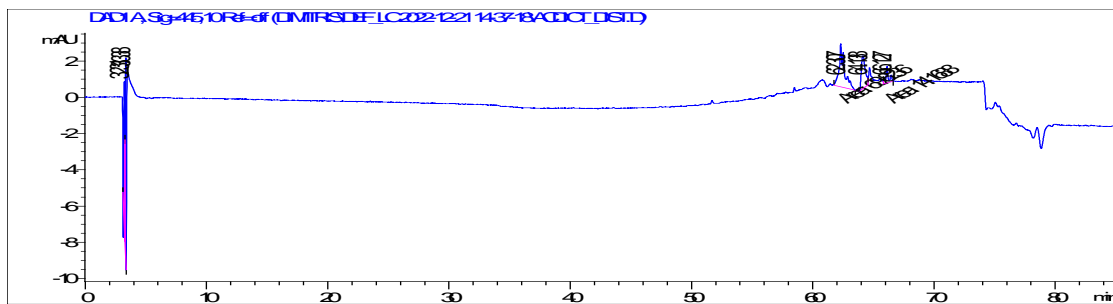


Σχήμα VII – Κορυφές του 1^{ου} χρωματογραφήματος του εκχυλίσματος νερού στα 280 nm, και χρόνος έκλουσής τους.

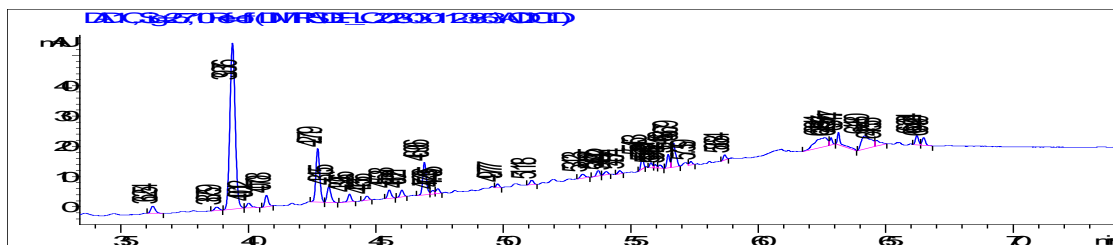




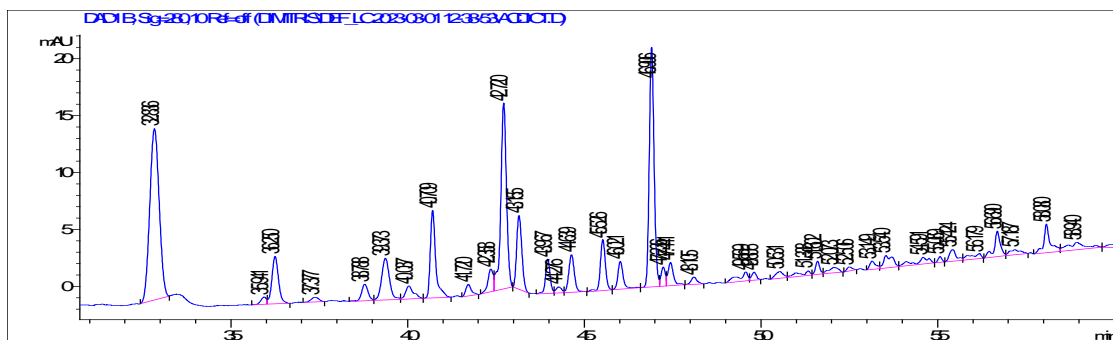
Σχήμα XI - Χρωματογράφημα του 1^{ου} εκχυλίσματος ακετόνης του απεσταγμένου φυτού στα 280 nm.



Σχήμα XII - Χρωματογράφημα του 1^{ου} εκχυλίσματος ακετόνης του απεσταγμένου φυτού στα 445 nm.



Σχήμα XIII - Χρωματογράφημα του 2^{ου} εκχυλίσματος ακετόνης του απεσταγμένου φυτού στα 257 nm.

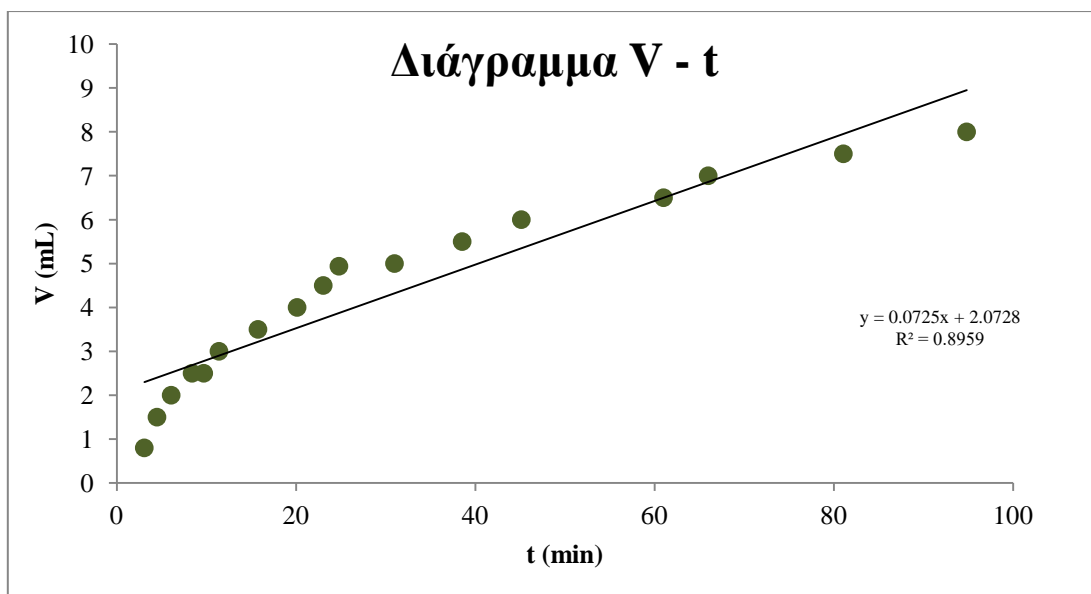


Σχήμα XIV - Χρωματογράφημα του 2^{ου} εκχυλίσματος ακετόνης του απεσταγμένου φυτού στα 280 nm.

Πίνακας XXXIV – Όγκος αιθερίου ελαίου ανά ορισμένα χρονικά διαστήματα και απόδοσή του επί τοις εκατό.

t (min)	V (mL)	% απόδοση
3.1	0.8	0.249%
4.5	1.5	0.467%
6.1	2	0.623%
8.4	2.5	0.779%
9.7	2.5	0.779%
11.4	3	0.935%
15.8	3.5	1.090%
20.1	4	1.246%
23.1	4.5	1.402%
31.0	5	1.558%
38.6	5.5	1.713%
45.2	6	1.869%
61.0	6.5	2.025%
66.0	7	2.181%
81.1	7.5	2.336%
94.8	8	2.492%

Τοποθετώντας τα στοιχεία για τον όγκο και το χρόνο σε διάγραμμα, υπολογίζεται η μέση ροή του αιθερίου ελαίου, ως η κλίση του διαγράμματος:



Διάγραμμα 0.2 – Διάγραμμα όγκου – χρόνου για το αιθέριο έλαιο.

Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο μέσος ρυθμός παραλαβής του αιθερίου ελαίου είναι 0.07 mL/min.

➤ Αποτελέσματα υδρο-ατμοαπόσταξης:

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η μάζα του δίκταμου πριν και μετά την ήπια ξήρανση που υπέστη στο τέλος της απόσταξης, ο όγκος του ανθόνερου και του υπολείμματος της απόσταξης, τα ολικά στερεά (TS) που βρίσκονται στο υπόλειμμα, καθώς ο όγκος και η απόδοση του αιθερίου ελαίου.

Πίνακας XXXV – Αποτελέσματα υδρο-ατμοαπόσταξης.

Μάζα δίκταμου, πριν την ξήρανση	321g
Μάζα δίκταμου, μετά την ξήρανση	287g
Όγκος ανθόνερου	780 mL
Όγκος υπολείμματος απόσταξης	2850 mL
Ολικά στερεά στο υπόλειμμα	1.6 ± 0.1 g/L
Απόδοση TS στο υπόλειμμα	1.617 ± 0.001 %
Όγκος αιθερίου ελαίου	8 mL
Απόδοση αιθερίου ελαίου	2.5%

Π7. Αριθμοί υπεροξειδίων & p-ανισιδίνης των οξειδωμένων ελαιοδιαλυμάτων.

Αρχικά, παρατίθενται τα αποτελέσματα για τον αριθμό υπεροξειδίων των δειγμάτων που υπέστησαν θερμική οξείδωση. Στους παρακάτω πίνακες βλέπουμε το χρόνο δειγματοληψίας από το φούρνο (days), τη μάζα του ελαίου (g), τον όγκο τιτλοδότη που καταναλώθηκε (mL) και τον αριθμό υπεροξειδίων (PV) για την κάθε σειρά δειγμάτων.

Πίνακας XXXVI – Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα control.

Χρόνος οξείδωσης (days)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.0106	6.3	15.7
1.0	4.3273	8.0	18.5
1.5	3.0946	5.9	19.1
2.7	1.8762	3.6	19.4 ± 0.3
	2.197	4.3	
5.4	2.102	4.1	19.7 ± 0.3
	2.1649	4.3	
9.6	1.5987	3.0	18.3 ± 0.6
	2.1268	3.8	
15.5	1.4801	3.8	24 ± 2
	1.4918	3.4	
20.6	2.5205	42.8	169.8
22.6	0.9031	24.7	273.5
26.5	0.7581	22.4	295.5
31.4	0.9499	36.2	381.1

Πίνακας XXXVII6 - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με την καθαρή θυμοκινόνη(AC₁₅₀).

Χρόνος οξείδωσης (days)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.0902	6.7	16.4
1.5	2.9074	5.5	18.8 ± 0.1
	2.9331	5.5	
2.7	1.9841	3.7	18.9 ± 0.3
	1.9868	3.8	
5.4	1.8504	3.6	19.1 ± 0.5
	2.2381	4.2	
9.6	2.0793	3.8	18.28 ± 0.01
	2.2417	4.1	
15.5	2.074	4.5	22.1 ± 0.5

	1.6035	3.6	
20.6	1.2908	18.5	143.3
22.6	1.61	32.5	201.9
26.5	0.9705	29.5	304.0
31.4	1.3661	45.6	333.8

Πίνακας XXXVIII - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 5 ppm (AC^{d-15}).

Χρόνος οξείδωσης (days)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.1524	6.0	14.4	4.1424	6.4	15.4
1.5	3.3313	5.9	17.3 ± 0.6	2.8634	5.2	18.3 ± 0.2
	3.0186	5.1		2.1615	4.0	
2.7	2.3634	4.2	17.73 ± 0.05	2.0755	3.8	18.0 ± 0.5
	2.204	3.9		2.2702	4.0	
5.4	1.826	3.3	17.9 ± 0.3	2.1369	4.0	18.3 ± 0.7
	2.0957	3.7		2.4174	4.3	
9.6	2.2745	3.9	17.0 ± 0.2	1.8896	3.2	17.4 ± 0.6
	1.844	3.1		2.0186	3.6	
15.5	2.3246	4.2	18.2 ± 0.2	1.9899	3.3	16.3 ± 0.4
	1.6314	3.0		2.4356	3.9	
20.6	1.2847	5.7	44.4	2.4192	2.6	10.75
22.6	0.583	5.7	97.8	0.9231	2.2	23.83
26.5	1.5063	24.4	162.0	1.0493	9.7	92.4
31.4	0.6847	20.8	303.8	0.3702	11.0	297.1

Πίνακας XXXIX - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 50 ppm (AC^{d-150}).

Χρόνος οξείδωσης (days)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	3.8349	6.1	15.9	3.9145	6.3	16.1
1.5	3.2717	5.6	17.2 ± 0.2	2.9658	5.2	17.1 ± 0.6
	2.4773	4.3		2.6415	4.4	
2.7	2.0198	3.6	17.6 ± 0.3	2.3324	4.0	17.5 ± 0.4
	2.6358	4.6		2.3063	4.1	
5.4	2.2909	4.1	17.894 ± 0.004	1.8955	3.4	17.7 ± 0.3
	2.2916	4.1		2.0544	3.6	
9.6	2.1827	3.6	16.6 ± 0.1	2.5487	4.2	16.52 ± 0.06
	2.3363	3.9		1.8113	3.0	

15.5	1.7662	3.2	17.6 ± 0.8	1.5858	2.6	16.1 ± 0.4
	1.8251	3.1		1.3245	2.1	
20.6	1.856	7.0	37.72	1.7293	2.9	16.8
22.6	1.0616	9.3	87.6	1.357	2.7	19.9
26.5	0.6687	9.2	137.6	1.726	13.0	75.3
31.4	0.8856	23.0	259.7	0.7109	16.6	233.5

Πίνακας XL - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 100 ppm (ACⁱ_{a-1100}).

Χρόνος οξείδωσης (days)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.6297	7.3	15.8	4.4550	7.4	16.6
1.5	3.1714	5.2	16.44 ± 0.06	3.0454	5.0	16.7 ± 0.3
	3.3358	5.5		3.4907	5.9	
2.7	2.4223	3.9	16.5 ± 0.6	2.5929	4.4	16.7 ± 0.4
	2.4793	4.2		2.01	3.3	
5.4	3.1138	5.4	17.5 ± 0.2	2.1125	3.7	17.6 ± 0.1
	1.9897	3.5		2.4291	4.3	
9.6	1.5734	2.9	17.9 ± 0.8	2.1561	3.8	17.4 ± 0.3
	1.7358	3.0		1.8638	3.2	
15.5	1.4744	2.6	17.67 ± 0.05	1.3796	2.2	17 ± 1
	1.9771	3.5		2.1600	3.8	
20.6	1.0881	3.2	29.41	2.2664	4.2	18.53
26.5	1.1685	10.8	92.43	1.3646	3.6	26.38
31.4	0.7647	17.6	230.16	1.1902	6.7	56.29

Στη συνέχεια, συναντάμε τα αποτελέσματα για τον αριθμό υπεροξειδίων των δειγμάτων που υπέστησαν φωτοχημική οξείδωση. Στους παρακάτω πίνακες βλέπουμε το χρόνο δειγματοληψίας από τη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (h), τη μάζα του ελαίου (g), τον όγκο τιτλοδότη που καταναλώθηκε (mL) και τον αριθμό υπεροξειδίων (PV) για την κάθε σειρά δειγμάτων.

Πίνακας XLI - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα control.

Χρόνος οξείδωσης (h)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.0106	6.3	15.7
2.0	4.211	7.4	18.0 ± 0.6
	3.9639	7.3	

3.7	4.0011	7.7	19.27 ± 0.04
	4.6635	9.0	
6.6	2.0447	4.8	23.2 ± 0.4
	2.3988	5.5	
16.3	2.3079	7.2	31.1 ± 0.2
	2.4224	7.5	
26.8	1.8293	9.3	50.8
46.8	2.1033	14.9	70.8
61.8	1.6415	13.5	82.2
83.0	1.7320	15.6	90.1

Πίνακας XLII - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με την καθαρή θυμοκινόνη(AC₁₅₀).

Χρόνος οξείδωσης (h)	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.0902	6.7	16.4
2.0	3.9879	7.3	18.6 ± 0.4
	4.0423	7.6	
3.7	4.1308	8.5	20.2 ± 0.6
	3.8462	7.6	
6.6	2.8932	6.7	24.0 ± 1.2
	2.2906	5.7	
16.3	2.4391	7.6	31.4 ± 0.3
	1.8652	5.9	
26.8	2.6190	12.2	46.58
46.8	1.5866	11.1	70.0

Πίνακας XLIII - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 5 ppm (ACⁱ_{d-15}).

Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)		Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na ₂ SO ₃ (mL)	PV (meq O ₂ /kg ελαίου)
0	4.1524	6.0	14.4	0.0	4.1424	6.4	15.4
2.0	4.1534	6.7	16.6 ± 0.7	24.0	1.6044	5.0	31.2
	3.9708	6.8		46.4	1.9351	9.9	51.2
3.7	4.1439	8.1	19 ± 1	68.6	1.4669	8.2	55.9
	4.1328	7.5		93.6	1.7400	12.5	71.8
6.6	1.937	4.4	22.9 ± 0.2	118.6	1.457	13.8	94.7
	2.3041	5.3		142.2	1.4433	16.4	113.6
16.3	2.1873	6.4	30 ± 1	166.1	0.8251	10.0	121.2
	1.8512	5.8					
26.8	2.037	10.4	51.1				

46.8	1.5232	9.4	61.7	
61.8	1.2277	9.1	74.1	
83.0	1.4291	13.5	94.5	

Πίνακας XLIV - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 50 ppm (AC_{d-150}^i).

Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na_2SO_3 (mL)	PV (meq O_2/kg ελαίου)		Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na_2SO_3 (mL)	PV (meq O_2/kg ελαίου)
0.0	3.8349	6.1	15.9	0.0	3.9145	6.3	16.1
20.4	1.9745	5.8	29.4	24.0	1.5947	5.2	32.6
48.0	1.1329	6.5	57.4	46.4	0.8931	4.4	49.3
74.0	1.6357	10.9	66.6	68.6	1.4134	9.0	63.7
98.3	1.1545	10.0	86.6	93.6	1.0404	9.0	86.5
121.4	1.6829	17.0	101.0	118.6	0.9875	9.0	91.1
				142.2	1.1134	12.7	114.1
				166.1	1.5362	19.6	127.6

Πίνακας XLV - Χρόνος δειγματοληψίας, μάζα ελαίου, όγκος τιτλοδότη και αριθμός υπεροξειδίων για το δείγμα με συγκέντρωση θυμοκινόνης 1050 ppm (AC_{d-1100}^i).

Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα μη απεσταγμένου φυτού			Χρόνος οξείδωσης (h)	Εκχύλισμα απεσταγμένου φυτού		
	Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na_2SO_3 (mL)	PV (meq O_2/kg ελαίου)		Μάζα ελαίου (g)	Όγκος Na_2SO_3 (mL)	PV (meq O_2/kg ελαίου)
0.0	4.6297	7.3	15.8	0.0	4.4550	7.4	16.6
20.4	0.9076	3.3	36.4	24.0	2.7339	9	32.9
48.0	2.4788	11.3	45.6	46.4	1.3567	6	44.2
74.0	1.6599	12.0	72.3	68.6	1.2688	7.9	62.3
98.3	1.8885	14.2	75.2	93.6	1.8996	16	84.2
121.4	2.2867	22.8	99.7	118.6	1.0835	9.6	88.6
				142.2	1.1134	7.7	100.1
				166.1	1.5362	11.9	125.8

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα στοιχεία για το χρόνο οξείδωσης (days), τη μάζα του ελαίου (g) που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση, τις απορροφήσεις A_b και A_s των εκάστοτε διαλυμάτων και, τελικά, τον αριθμό της p-ανισιδίνης για τα δείγματα C, AC^2_{d-t5} , AC^2_{d-t50} και AC^2_{d-t100} , ύστερα από πείραμα θερμικής οξείδωσης.

Πίνακας XLVI – Χρόνος οξείδωσης, μάζα ελαίου, απορροφήσεις A_b και A_s και αριθμός ανισιδίνης για δείγματα απελαιωμένου φυτού, ύστερα από θερμική οξείδωση.

Δείγμα	Χρόνος οξείδωσης (days)	$m_{\text{ελαίου}}$ (g)	A_b	A_s	p-AV
C	0	0.5078	0.046	0.088	2.93
	9.6	0.5204	0.068	0.140	4.80
	15.5	0.5532	0.079	0.208	7.71
	22.6	0.6895	0.085	0.927	37.25
	26.5	0.5253	0.084	0.913	48.14
AC^2_{d-t5}	22.6	0.5789	0.107	0.236	7.61
	31.4	0.7516	0.168	1.222	43.19
AC^2_{d-t50}	22.6	0.5761	0.087	0.221	7.73
	26.5	0.6094	0.145	0.377	12.61
	31.4	0.6365	0.120	0.942	39.69
AC^2_{d-t100}	0	0.6130	0.131	0.203	4.59
	9.6	0.6236	0.126	0.206	4.86
	15.5	0.7067	0.140	0.256	5.91
	22.6	0.6358	0.100	0.267	8.67
	26.5	0.6101	0.137	0.355	11.84
	31.4	0.7016	0.140	1.320	51.45