ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας ΙΙ: Ανάλυση, Σχεδιασμός & Ανάπτυξη Διεργασιών & Συστημάτων

Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ: ΣΑΜΨΩΝ ΣΤΕΛΛΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΚΡΟΚΙΔΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ
ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΚΡΟΚΙΔΑ
ΑΘΗΝΑ ΠΑΠΠΑ

Αθήνα, 2012

Αφιερώνεται στη μητέρα μου,

Μαρία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας «Αντιοξειδωτική δράση υπολειμμάτων φρούτων και αρωματικών φυτών», πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια «Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών», «Οργανικής Χημείας», «Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων», καθώς και στο Οριζόντιο εργαστήριο της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η ανάθεση του θέματος έγινε από την Επικ. Καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα, ενώ στην τριμελή εξεταστική επιτροπή συμμετείχαν επίσης η Αναπ. Καθηγήτρια Αθηνά Παππά και η Επικ. Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν και συνέβαλαν στην περάτωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια της εργασίας, Μαγδαληνή Κροκίδα, όχι μόνο για την καθοριστική συμβολή της ως επιβλέπουσας, αλλά και για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξή της σε όλους τους τομείς καθ’ όλη τη διάρκεια της διπλωματικής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου στο κομμάτι των διεργασιών εκχύλισης, Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη διαρκή υποστήριξη που μου προσέφερε.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την Υποψ. Διδάκτορα Κωνσταντίνα Κυριακοπούλου, για την καθημερινή υποστήριξή της στην οργάνωση και εκτέλεση των πειραματικών δοκιμών και αναλύσεων, καθώς επίσης και την πολύτιμη συμβολή της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τα μέλη των Εργαστηρίων Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών και Οργανικής Χημείας, για τη βοήθειά τους σε τεχνικά θέματα, καθώς και για την καλή τους διάθεση καθ’ όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, για τη διαρκή υποστήριξή της καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συχνά ακούμε να γίνεται λόγος για τις ελεύθερες ρίζες που ευθύνονται για μια σειρά βλαβών που πλήττουν τον οργανισμό. Παρ' όλο που ο οργανισμός από μόνος του παράγει αντιοξειδωτικά που τις δεσμεύουν, κάποια στιγμή η παραγωγή ελευθέρων ριζών υπερβαίνει την προστατευτική ικανότητα του οργανισμού και τότε προκύπτουν μη ανατρέψιμες βλάβες της κυτταρικής δομής και της λειτουργίας του κυττάρου. Αυτό θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες της διαδικασίας της γήρανσης, καθώς και πλήθους εκφυλιστικών παθήσεων, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, διαβήτη, σκλήρυνση κατά πλάκας κ.α. Για το λόγο γίνεται έρευνα για τα αντιοξειδωτικά.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση υπολειμμάτων φρούτων και αρωματικών φυτών. Τα υπολείμματα των φρούτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι: φλούδα και πούλπα ροδιού, φλούδα πορτοκαλιού και μανταρινιού, ενώ τα αρωματικά φυτά είναι: φύλλα δάφνης και δενδρολίβανο.

Όλα τα υπό μελέτη δείγματα, ξηράθηκαν σε ρεύμα αέρα προκειμένου να προσδιοριστεί η κινητική ξήρανσης του κάθε δείγματος. Μετρήθηκαν επίσης, η αρχική και τελική υγρασία τους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης των δειγμάτων. Ξηρά δείγματα εκχυλίστηκαν με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, 1-βουτανόλη, H_2O). Φρέσκα δείγματα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με μικροκύματα με διαλύτη H_2O, καθώς και σε εκχύλιση με υπερήχους με διαλύτες H_2O και αιθανόλη. Σκοπός των εκχυλίσεων αυτών ήταν αφενός, ο προσδιορισμός της απόδοσης των διαφορετικών τρόπων εκχύλισης του κάθε δείγματος και αφετέρου, η μέτρηση των αντιοξειδωτικών του κάθε εκχυλίσματος. Επιπλέον, έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου του μανταρινιού με απόσταξη με υδρατμούς με συσκευή Clevenger.

Τέλος, η μελέτη των αντιοξειδωτικών έγινε με δύο τρόπους: ποιοτικά με τη μέθοδο TLC και ποσοτικά με τη μέθοδο DPPH. Από τη μέθοδο TLC, τα εκχυλίσματα που παρουσίαζαν μεγαλύτερο ενδιαφέρον (έντονη αντιοξειδωτική δράση), μελετήθηκαν με τη μέθοδο DPPH. Υπολογίστηκε η *ΑΕ*, που ορίζεται ως το αντίστροφο της EC_{50}, της ποσότητας δηλαδή του αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για την μείωση στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH και με βάση αυτή έγινε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων.

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι την εντονότερη αντιοξειδωτική δράση την παρουσιάζει η φλούδα του ροδιού.

ABSTRACT

In recent years, there has been a long discussion about free radicals, especially regarding their association with a series of dysfunctions within the human body. Despite the fact that the human body produces antioxidants which bind with free radical, it seems that at a certain point, the production of free radicals exceeds the protective capacity of the body, therefore leading to irreversible damages of the cellular structure and function. This fact is regarded as one of the most important factors related to the ageing process, as well as to numerous degenerative diseases, such as cardiovascular disease, diabetes, cerebral palsy etc. This is why a lot of research has focused on antioxidants.

The present dissertation focuses on the antioxidant activity of the remains of fruit and aromatic plants. The remains of fruit used are peel and pulp of pomegranate, orange and tangerine peel, whereas the aromatic plants used are bay leaves and rosemary.

All of the examined samples have been air dried, in order to determine the drying kinetics of each sample. In addition, the initial and final humidity of the samples have been measured. Consequently, three different extraction methods of the samples where applied. Dry samples were extracted with solvents of increasing polarity (hexane, methanol, ethyl acetate, 1-butanol, H_2O). Fresh samples were extracted by microwave extraction using H_2O and ethanol as solvents. On the one hand, the purpose of these extractions was to define the yield of the various methods of extraction of each sample and, on the other, they aimed at the measurement of the antioxidants in each extract. In addition, the essential oil of tangerine was extracted with Clevenger distillation apparatus.

Finally, the examination of the antioxidants was done with two different ways: Qualitatively with TLC method and quantitatively with DPPH method. The samples which demonstrated the most intense antioxidant activity using the TLC method were later examined with the DPPH method. AE was measured and on this basis a comparison between the samples was attempted (AE is defined as the reverse of EC_{50}, that is the quantity of an antioxidant needed for a decrease by 50% on the initial concentration of DPPH).

Overall, it could be argued that according to the present study, there is strong evidence that pomegranate peel has the most intense antioxidant activity.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11
1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 11
1.2 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 11
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 12
2.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΥΤΩΝ 12
2.1.1 Ρόδι 12
2.1.2 Πορτοκάλι 13
2.1.3 Μανταρίνι 14
2.1.4 Δενδρολίβανο 15
2.1.5 Δάφνη 16
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ 17
2.2.1 Ξήρανση 17
2.2.2 Εκχύλιση 18
2.2.2.1 Εκχύλιση υγρού - υγρού 18
2.2.2.2 Εκχύλιση στερεών 19
2.2.2.3 Εκχύλιση με μικροκύματα 19
2.2.2.4 Εκχύλιση με υπερήχους 19
2.2.3 Παραλαβή αιθέριων ελαίων 20
2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ 21
2.3.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών και μηχανισμός δράσης τους 21
2.3.2 Γενικά περί αντιοξειδωτικών 22
2.3.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά 23
2.3.4 Φυσικά αντιοξειδωτικά 24
2.3.5 Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών 25
2.3.6 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας 27
2.3.6.1 Μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2–διφαινυλο-1-πικρυλο- υδραζιλίου (DPPH˙) 28
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 31
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 31
3.2 ΞΗΡΑΝΣΗ 31
3.2.1 Εξοπλισμός 31
3.2.2 Διαδικασία - Αποτελέσματα 32

3.2.2.1 Μέτρηση αρχικής και τελικής υγρασίας 32
3.2.2.2 Ξήρανση σε ρεύμα αέρα 33
3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ 38
3.3.1 Εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας 38
3.3.1.1 Υλικά 38
3.3.1.2 Εξοπλισμός 38
3.3.1.3 Διαδικασία εκχύλισης 38
3.3.1.4 Διάγραμμα ροής 41
3.3.1.5 Αποτελέσματα εκχύλισης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας 42
3.3.2 Εκχύλιση με μικροκύματα 45
3.3.2.1 Υλικά 45
3.3.2.2 Εξοπλισμός 45
3.3.2.3 Διαδικασία εκχύλισης 46
3.3.2.4 Διάγραμμα ροής 47
3.3.2.5 Αποτελέσματα εκχύλισης με μικροκύματα 47
3.3.3 Εκχύλιση με υπερήχους 48
3.3.3.1 Υλικά 48
3.3.3.2 Εξοπλισμός 48
3.3.3.3 Διαδικασία εκχύλισης 49
3.3.3.4 Διάγραμμα ροής 51
3.3.3.5 Αποτελέσματα εκχύλισης με υπερήχους 51
3.3.4 Απόσταξη με υδρατμούς (Clevenger) 53
3.3.4.1 Υλικά 53
3.3.4.2 Εξοπλισμός 53
3.3.4.3 Διαδικασία απόσταξης με υδρατμούς - Αποτελέσματα 53
3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ 54
3.4.1 Ποιοτικός προσδιορισμός TLC 54
3.4.1.1 Υλικά 54
3.4.1.2 Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο TLC 54
3.4.1.3 Αποτελέσματα TLC 56
3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DPPH 57
3.4.2.1 Υλικά 57
3.4.2.2 Εξοπλισμός 58

3.4.2.3 Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο DPPH 58
3.4.2.4 Αποτελέσματα DPPH 61
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 69
4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΞΗΡΑΝΣΗΣ 69
4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 70
4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ 74
5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ 81
5.1 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ 81
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 83
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 87
7.1 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΞΗΡΑΝΣΕΩΝ 87
7.1.1 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας πορτοκαλιού 87
7.1.2 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας μανταρινιού 88
7.1.3 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας ροδιού 89
7.1.4 Μετρήσεις ξήρανσης πούλπας ροδιού 90
7.1.5 Μετρήσεις ξήρανσης φύλλων δάφνης 91
7.1.6 Μετρήσεις ξήρανσης δενδρολίβανου 92
7.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ 93

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά, ο προσδιορισμός της κινητικής ξήρανσης σε ρεύμα αέρα των προς μελέτη δειγμάτων. Επιπλέον, η μελέτη της απόδοσης τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, καθώς επίσης και η σύγκριση των μεθόδων αυτών μεταξύ τους. Επίσης έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου της φλούδας του μανταρινιού. Τέλος, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των παραληφθέντων εκχυλισμάτων ποιοτικά. Τα εκχυλίσματα που παρουσίαζαν έντονη αντιοξειδωτική δράση με την ποιοτική μέθοδο μετρήθηκαν και ποσοτικά και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων.

1.2 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Πραγματοποιήθηκε ξήρανση των δειγμάτων (φλούδα και πούλπα ροδιού, φλούδα μανταρινιού και πορτοκαλιού, φύλλα δάφνης και δενδρολίβανο) σε ρεύμα αέρα. Έγινε υπολογισμός των κινητικών ξήρανσης και μετρήθηκαν η αρχική και η τελική υγρασία των προϊόντων. Στη συνέχεια, τα ξηρά προϊόντα εκχυλίστηκαν με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας (εξάνιο, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, 1-βουτανόλη, H_2O). Ακόμη, φρέσκα δείγματα εκχυλίστηκαν με μικροκύματα με διαλύτη H_2O, καθώς επίσης και με υπερήχους με διαλύτες H_2O και αιθανόλη. Επιπλέον, έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου της φλούδας του μανταρινιού με απόσταξη με υδρατμούς σε συσκευή Clevenger. Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν, μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση ποιοτικά με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) και ποσοτικά με τη μέθοδο μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2–διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH).

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΦΥΤΩΝ

2.1.1 Ρόδι

Γενικά

Το ρόδι (Punica granatum) είναι ο καρπός του φυλλοβόλου δένδρου ροδιά που ανήκει στην οικογένεια φυτών Punicaceae και έχει ύψος μέχρι 5 m. Με καταγωγή από την Περσία, η ροδιά καλλιεργήθηκε μέσα στους αιώνες στις μεσογειακές χώρες. Τα άνθη της ροδιάς είναι συνήθως κόκκινου χρώματος (σπανίως λευκού). Ο καρπός της ροδιάς (ρόδι) ωριμάζει το χειμώνα και περικλείει εσωτερικά πολλά κοκκινόχρωμα ζουμερά σπόρια με κουκούτσι τα οποία με την σειρά τους περικλείονται μέσα σε κίτρινες μεμβράνες που περιτυλίγονται από ένα σκληρό κοκκινωπό μανδύα (φλούδα) με μια προεξοχή στο κάτω μέρος του. Ο χυμός του ροδιού αντιπροσωπεύει το 45 – 65 % όλου του φρούτου ή το 76 – 85 % των σπορίων του. (Poyrazoglu, E. et al., 2002), (www.wikipedia.org, 2012)

Εικόνα 2.1 Άνθος ροδιάς

Εικόνα 2.2 Σπόρια και μανδύας ροδιού

Χρησιμότητα

Το ρόδι ήταν γνωστό από την αρχαιότητα σαν σύμβολο αφθονίας, γονιμότητας και καλής τύχης, ενώ χρησιμοποιούσαν τη φλούδα του στη βυρσοδεψία και στην πρακτική ιατρική. Σήμερα έχει γίνει ευρέως γνωστό για την αντιοξειδωτική, την αντιμικροβιακή, την αντικαρκινική, την αντιφλεγμονώδη και αντιμεταλλαξιογόνο δράση του. Το φρούτο μπορεί να καταναλωθεί φρέσκο ή να επεξεργασθεί σε χυμό, σιρόπι (γρεναδίνη), μαρμελάδες ή ακόμα και σε τύπο κρασιού. Επίσης, συμπλήρωμα διατροφής με σπόρια ροδιού μπορεί να εμποδίσει τη φθορά του DNA (Guo S. et al, 2007), να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, καθώς και να ανακουφίσει από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης (Lansky & Newman, 2007). Επιπλέον, αφέψημα του φλοιού του καρπού και της ρίζας χρησιμοποιείται ως ανθελμινθικό και ιδίως κατά της ταινίας, γιατί περιέχει ένα αλκαλοειδές. Τέλος, εκχυλίσματα του φλοιού των ροδιών

Εικόνα 2.3 Ρόδι

χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών. (Pu Jing et al., 2012), (www.wikipedia.org, 2012)

Αντιοξειδωτική δράση

Το ρόδι περιέχει οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, φουμαρικό), φαινολικές ενώσεις (γαλλικό, ελαγικό, πρωτοκατεχικό, χλωρογενικό, καφεϊκό, φερουλικό, ο- και p-κουμαρικό οξύ), φλαβονοειδή (κατεχίνη, βαλανοκετόνη, φλοριδζίνη), ανθοκυανίνες καθώς και υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Η αντιοξειδωτική του δράση σχετίζεται κυρίως με τις πολυφαινόλες και τις τοκοφερόλες. Έχει βρεθεί ότι η φλούδα του ροδιού περιέχει πολύ περισσότερα αντιοξειδωτικά από τα σπόρια και την πούλπα και εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνη και φαινολικές ενώσεις. (Ulrike A. Fischer et al., 2011), (Pu Jing et al., 2012), (Yunfeng Li et al., 2006), (Poyrazoglu, E. et al., 2002), (Madrigal-Carballo S., 2009)

2.1.2 Πορτοκάλι

Γενικά

Εικόνα 2.4 Άνθη πορτοκαλιάς

Το πορτοκάλι (Citrus sinensis) είναι ο καρπός του αειθαλούς δένδρου πορτοκαλιά που ανήκει στην οικογένεια φυτών Citrinae (Rutaceae) και έχει ύψος μέχρι 8 m περίπου. Με καταγωγή από την νοτιοανατολική Ασία, η πορτοκαλιά καλλιεργήθηκε μέσα στους αιώνες και στις μεσογειακές χώρες. Τα άνθη της πορτοκαλιάς είναι λευκά, αρκετά μεγάλα και εύοσμα. Ο καρπός της πορτοκαλιάς (πορτοκάλι) έχει σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα με παχιά ή λεπτή φλούδα και γλυκιά ή γλυκόξινη γεύση ανάλογα με την ποικιλία. Η εξωτερική επιφάνεια της φλούδας είναι σχετικά ανώμαλη και φέρει μικρά αδενώδη στίγματα που παράγουν αρωματικό αιθέριο έλαιο. Η σάρκα του πορτοκαλιού χωρίζεται σε τμήματα που λέγονται σκελίδες ή φέτες. Κάθε φέτα περιβάλλεται από ινώδη ιστό λευκού χρώματος. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες πορτοκαλιών ορισμένες εκ των οποίων είναι και οι: Βαλέντσια, Μέρλιν, Σαγκουίνι. (www.wikipedia.org, 2012)

Χρησιμότητα

Το πορτοκάλι και ο χυμός του, έχουν εδώ και χρόνια ταυτιστεί με την βιταμίνη C και με τις όποιες ευεργετικές επιδράσεις, συνεπάγεται η κατανάλωση αυτής της βιταμίνης. Η βιταμίνη C, βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου από τον οργανισμό, κάτι το οποίο βοηθά όσους πάσχουν από σιδηροπενική αναιμία. Το πορτοκάλι είναι επίσης, πλούσια πηγή πηκτίνης, μιας διαλυτής φυτικής ίνας με εξέχουσες ιδιότητες στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης. Μελέτες έδειξαν πως η αυξημένη κατανάλωση πηκτίνης από εσπεριδοειδή, συμβάλλει στην μείωση της «αθηρογόνου»

Εικόνα 2.5 Πορτοκάλια

LDL-χοληστερόλης, τροποποιώντας έτσι θετικά τον αθηρωματικό δείκτη. Στον μεταβολισμό δε των λιποπρωτεινών, ενεπλέκεται και άλλο ένα διατροφικό στοιχείο του πορτοκαλιού, το μαγνήσιο, που μελέτες το φέρουν να κατέχει σημαντική αντι-αθηρογόνο δράση. Επίσης, το πορτοκάλι είναι συν τοις άλλοις, πολύ πλούσιο σε κάλιο και φτωχό σε νάτριο, γεγονός που καθιστά την κατανάλωσή του ευεργετική σε περιπτώσεις υπέρτασης. Τέλος, μελέτες έχουν αποδείξει την αναστολή του πολλαπλασιασμού του καρκίνου του μαστού. (Jayaprakasha G.K., Bhimanagouda S. Patil, 2007)

Αντιοξειδωτική δράση

Το πορτοκάλι περιέχει τερπένια (όπως α-πινένιο, β-πινένιο, β-μυρκένιο, δ-λιμονένιο, trans-καρυοφυλλένιο, κ.ά), οξυγονούχες ενώσεις (οκτανάλη, εννεανάλη, 1-οκτανόλη, λιναλοόλη, κιτρονελάλη κ.ά.). Η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στη βιταμίνη C, στις φαινολικές ενώσεις, στα φλαβονοειδή και στο ασκορβικό οξύ. (Jayaprakasha G.K., Bhimanagouda S. Patil, 2007), (Mira B. et al., 1999)

2.1.3 Μανταρίνι

Γενικά

Το μανταρίνι (Citrus tangerina) είναι ο καρπός του αειθαλούς δένδρου μανταρινιά που ανήκει στην οικογένεια φυτών Citrinae (Rutaceae). Με καταγωγή από την νοτιοανατολική Ασία, η μανταρινιά καλλιεργήθηκε μέσα στους αιώνες και στις μεσογειακές χώρες. Ο καρπός της μανταρινιάς (μανταρίνι), ωριμάζει από το Δεκέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο και διακρίνεται για τον λεπτό φλοιό πορτοκαλί χρώματος, με σάρκα χυμώδη, πολύ αρωματική και γλυκιά, που μπορεί να περιέχει σπόρους (σπέρματα). (www.wikipedia.org, 2012)

Εικόνα 2.6 Μανταρίνι

Χρησιμότητα

Το μανταρίνι είναι ένα φρούτο που συμβολίζει τη μακροζωία και η αποξηραμένη φλούδα του χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική. Είναι πλούσια πηγή καλίου και βοηθά στη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επίσης, παρουσιάζει ηρεμιστική δράση λόγω των αλάτων βρωμίου που περιέχει. Επιπλέον, ο φλοιός του μανταρινιού διευκολύνει την πέψη. Τέλος, μελέτες, έχουν δείξει ότι η κατανάλωση

μανταρινιού μειώνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του ήπατος, καρδιοπαθειών, εγκεφαλικών επεισοδίων και διαβήτη. (www.iatronet.gr, 2012)

Αντιοξειδωτική δράση

Το μανταρίνι είναι περιέχει φλαβονοειδή, λεμονοειδή, φουροκουμαρίνες, καροτενοειδή, βιταμίνες, οργανικά οξέα (ασκορβικό, κιτρικό οξύ) και αμινοξέα, στα οποία οφείλει την αντιοξειδωτική του δράση. (Ram M. Uckoo et al., 2011), (Leandro Danielski et al., 2008)

2.1.4 Δενδρολίβανο

Γενικά

Εικόνα 2.7 Άνθη δενδρολίβανου

Το δενδρολίβανο (Rosmarinus Officinalis) είναι ένας αειθαλής πυκνόφυλλος και πολύκλαδος θάμνος που ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae με μέγιστο ύψος 2 m. Είναι ευρέως διαδεδομένο στις περιοχές της Μεσογείου και στην Ευρώπη. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή αχνά γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων. Το χρώμα τους είναι μωβ, κυανόλευκο ή και λευκό. Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη για νερό γι' αυτό και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχώδεις ορεινές περιοχές. Οι βλαστοί έχουν ένα ευχάριστο άρωμα που μοιάζει με αυτό του τσαγιού και η γεύση τους είναι ελαφρώς πικρή και λίγο καυτερή. (www.wikipedia.org, 2012)

Χρησιμότητα

Το δενδρολίβανο από τα αρχαία χρόνια, ήταν σύμβολο ομορφιάς και ευφορίας, το ελιξίριο της νεότητας για τις χώρες της Μεσογείου. Οι αρχαίοι Έλληνες το θεωρούσαν δώρο της θεάς Αφροδίτης στους ανθρώπους. Οι Ρωμαίοι, κατά τη διάρκεια θρησκευτικών τελετών, κρατούσαν πάντα ένα κλαδί δενδρολίβανου, διότι θεωρούσαν ότι εξασφαλίζουν ευλογημένη ζωή και ειρήνη μετά το θάνατο. Το δενδρολίβανο σήμερα χρησιμοποιείται στη μαγειρική, καθώς επίσης σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών, καθώς διεγείρει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του θύλακα της τρίχας και προλαμβάνει την πρόωρη φαλάκρα χάρη στο φλαβονοειδές διοσμίνη. Επίσης, έχει αντιοξειδωτικές, τονωτικές ιδιότητες, βοηθά στην αποτοξίνωση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της κυτταρίτιδας, επειδή διεγείρει την κυκλοφορία και το μεταβολισμό. Το αιθέριο έλαιο του δενδρολίβανου χάρη στη

διεγερτική του δράση, μπορεί να βοηθήσει στην καταπολέμηση της υπνηλίας και της πνευματικής κόπωσης. Φέρνει γρήγορη ανακούφιση από μυϊκ ούς πόνους καθώς επίσης, από τον πονοκέφαλο που προκαλείται από την υπερκόπωση και την νευρική ένταση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μασάζ για την ανακούφιση από μυϊκούς πόνους. Τέλος, έχει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. (Angel Calin-Sanchez et al., 2011)

Εικόνα 2.8 Δενδρολίβανο

Αντιοξειδωτική δράση

Το δενδρολίβανο περιέχει φαινολικές ενώσεις, διτερπένια, φλαβονοειδή, ταννίνη, καμφορά, 1,8-κινεόλη, βορνεόλη, βερμπενόνη, α-πινένιο, καμφένιο. Η αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται κυρίως στο καρνοσικό, καρνοσόλη και ροσμαρινικό οξύ. (S. Rodriguez-Rojo et al., 2012), (Angel Calin-Sanchez et al., 2011), (Naciye Erkan et al., 2008), (Ozlem Yesil-Celiktas et al., 2008)

2.1.5 Δάφνη

Γενικά

Η δάφνη (Laurus nobilis) είναι ένα αειθαλές δένδρο με μέγιστο ύψος 8 m. Η κοινή της ονομασία είναι Δάφνη Απόλλωνος ή βάγια και ανήκει στην οικογένεια φυτών Lauraceae. Είναι ευρέως διαδεδομένη στις περιοχές της Μεσογείου και στην Ευρώπη. Η εποχή ανθοφορίας της είναι η άνοιξη και τα άνθη της είναι κίτρινου χρώματος. Η δάφνη έχει μέτρια αντοχή στον πάγο και μικρές απαιτήσεις σε νερό. Τα φύλλα της δάφνης έχουν μήκος 5 - 8 cm και πλάτος 3 - 4 cm ενώ το σχήμα τους είναι ελλειπτικό - λογχοειδές με ελαφρά κυματοειδή μορφή και οι καρποί της είναι μαύρα μούρα ωοειδούς σχήματος. (Afifi F.U. et al., 1997), (Ibtissem Hamrouni Sellami et al., 2011), (www.antemisiaris.gr, 2012)

Εικόνα 2.9 Φύλλα δάφνης

Χρησιμότητα

Εικόνα 2.10 Καρποί δάφνης

Η δάφνη είναι ευρέως γνωστή από την αρχαιότητα όπου χρησιμοποιούσαν τα φύλλα της για να κοσμήσουν τα τιμητικά στεφάνια των ηρώων και των νικητών. Σε διάφορες χώρες χρησιμοποιείται ως θεραπεία για τους κολικούς, την υστερία, τους πολύποδες και τους σπασμούς. Επίσης, τα ξηρά φύλλα δάφνης χρησιμοποιούνται πολύ στη μαγειρική ως αρωματικά. Τα μούρα της δάφνης χρησιμοποιούνται

για τη θεραπεία των ινομυωμάτων της μήτρας, της κίρρωσης του ήπατος καθώς και για τους πόνους των αρθρώσεων. Τα πτητικά έλαια από τα φύλλα και τα μούρα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία αρωμάτων και σαπουνιού. Για τα έλαια των φύλλων έχει αναφερθεί βακτηριοκτόνος και μυκητοκτόνος δράση, ενώ για τα εκχυλίσματα των φύλλων υπογλυκαιμική δράση. Παρ' όλα αυτά, η υπέρμετρη χρήση του ενδέχεται να είναι τοξική και επικίνδυνη. (Afifi F.U. et al., 1997)

Αντιοξειδωτική δράση

Εικόνα 2.11 Άνθη δάφνης

Η δάφνη περιέχει πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, λιπαρά οξέα, βιταμίνη Α, τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε) και μέταλλα. Η αντιοξειδωτική της δράση οφείλεται κυρίως στις πολυφαινόλες, στις τοκοφερόλες και στα φλαβονοειδή. Το έλαιο της δάφνης περιέχει τερπένια, κετόνες, ευκαλυπτόλη, μεθυλευγενόλη, φελανδρένη, λαυρίνη, κινεόλη, γερανιόλη, λιναλόλη, πινένιο, ταννίνη, κατεχίνη, κουμαρικό οξύ, μανιτόλη. (Olfa Ouchikh et al., 2011)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.2.1 Ξήρανση

Ως ξήρανση (drying) ή αφυδάτωση (dehydration) ορίζεται η διεργασία απομάκρυνσης (με εξάτμιση ή εξάχνωση) ενός πτητικού υγρού (κυρίως νερού) από στερεά σώματα (κυρίως τρόφιμα). Αποτελεί μια διεργασία ταυτόχρονης μεταφοράς θερμότητας και μάζας, μεταξύ στερεών σωμάτων και αδρανών αερίων ή κενού.

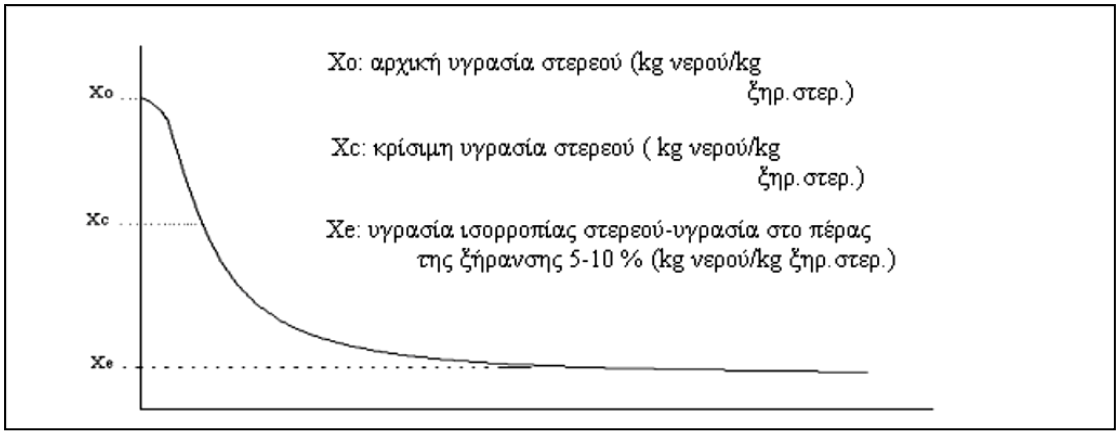
Ο ρυθμός απομάκρυνσης της πτητικής ουσίας από το στερεό (ρυθμός ξήρανσης) επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες οι οποίοι μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής:

- παράγοντες που συνδέονται με τις συνθήκες ξήρανσης
- παράγοντες που συνδέονται με τη φύση του στερεού
- παράγοντες που συνδέονται με το σχεδιασμό της συσκευής ξήρανσης (ξηραντήρας)

Η ξήρανση αποτελεί, συνήθως, το τελικό στάδιο επεξεργασίας πριν την συσκευασία και κάνει πολλά υλικά καταλληλότερα για χρησιμοποίηση. Ακόμα η ξήρανση ή αφυδάτωση των βιολογικών υλικών και ιδιαίτερα των τροφίμων, χρησιμοποιείται και ως μέθοδος συντήρησης καθώς, οι μικροοργανισμοί που προκαλούν την καταστροφή των τροφίμων και την αποσύνθεση τους δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν απουσία νερού. Επίσης, πολλά ένζυμα που προκαλούν χημικές αλλαγές στα τρόφιμα και σε άλλα βιολογικά προϊόντα δεν μπορούν να δράσουν χωρίς νερό. Η περιεχόμενη υγρασία στα τρόφιμα πρέπει να κυμαίνεται σε ένα ποσοστό 5% κ.β έως και 10% κ.β περίπου, ώστε να είναι ανενεργοί οι μικροοργανισμοί αλλά και να διατηρηθεί η γεύση και η θρεπτική αξία των

τροφίμων. (Μαρουλής Ζ., Ζιώμας Ι., Κροκίδα Μ., 2011) ,(http://www.chemeng .ntua.gr /courses/trb io/files/KEF9%20%20Drying.pdf, 2012)

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται μία τυπική καμπύλη μεταβολής υγρασίας του στερεού με το χρόνο.



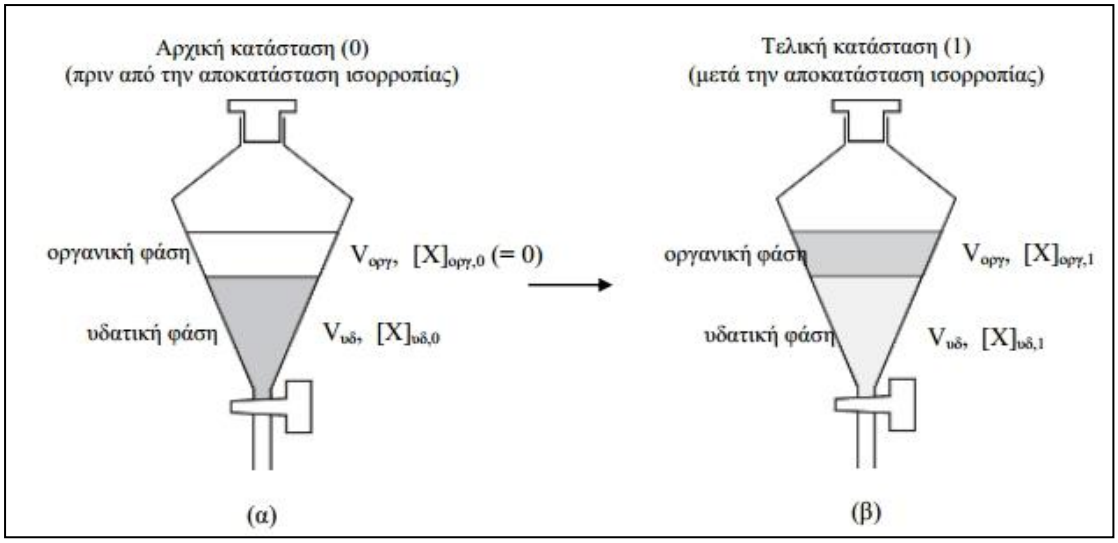
Σχήμα 2.1: Μεταβολή της υγρασίας του στερεού με το χρόνο

2.2.2 Εκχύλιση

Ως εκχύλιση ορίζεται η παραλαβή μιας ουσίας Α από μίγμα ουσιών με τη χρήση ενός διαλύτη. Κυρίως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Η εκχύλιση είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος, καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μίκρο- και μάκρο- ανάλυση ουσιών.

2.2.2.1 *Εκχύλιση υγρού - υγρού*

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού η ουσία κατανέμεται μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων. Στις περισσότερες των περιπτώσεων μία εκ των δύο φάσεων είναι υδατική ενώ η άλλη είναι ένας οργανικός διαλύτης. Επειδή τα υγρά είναι μη μιγνυόμενα μεταξύ τους σχηματίζουν δύο στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα. Η ουσία, ενώ αρχικά ευρίσκεται στη μία φάση, μετά την εκχύλιση υπάρχει και στις δύο φάσεις. Η κατανομή της ουσίας, δηλαδή ο λόγος των συγκεντρώσεών της στις δύο διαφορετικές στιβάδες, εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητά της στις δύο φάσεις και καθορίζεται από το συντελεστή ή σταθερά κατανομής, K_D. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η διαδικασία εκχύλισης. Έστω ότι ποσότητα ουσίας X είναι διαλυμένη στην υδατική φάση (κάτω φάση), όγκου $V_{υδ}$. Προστίθεται όγκος $V_{οργ}$ καθαρού οργανικού διαλύτη (μη αναμίξιμου με την υδατική φάση) και έχουμε την κατάσταση που δείχνεται στο Σχήμα 2.2α. Αναταράσσεται η διαχωριστική χοάνη έντονα και για αρκετό χρονικό διάστημα, οπότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων και επέρχεται κατάσταση ισορροπίας. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων προκύπτει η κατάσταση όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2β. (Ευάγγελος Μπακέας, Κων/νος Ευσταθίου, 2008).



Σχήμα 2.2 Εκχύλιση υδατικού διαλύματος ουσίας Χ με οργανικό διαλύτη σε διαχωριστική χοάνη. (α) Αρχική κατάσταση (0), (β) Τελική κατάσταση (1). Ο αριθμητικός δείκτης στις συγκεντρώσεις δείχνει πόσες εκχυλίσεις έχει υποστεί το αρχικό υδατικό διάλυμα.

2.2.2.2 *Εκχύλιση στερεών*

Η εκχύλιση οργανικών ουσιών από μίγματα στερεών αποτελεί τον κύριο τρόπο παραλαβής των διαφόρων φυσικών προϊόντων από τις πρωτογενείς πηγές τους. Μια απλή εκχύλιση ενός στερεού μπορεί να γίνει με θέρμανση της ουσίας με ένα διαλύτη και στη συνέχεια απόχυση ή διήθηση του θερμού μίγματος. Σε εργαστηριακό επίπεδο, για την παρούσα εργασία, η εκχύλιση του στερεού πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός της φάσης του διαλύτη με τα διαλυτά στοιχεία του στερεού μίγματος. (Ευάγγελος Μπακέας, Κων/νος Ευσταθίου, 2008)

2.2.2.3 *Εκχύλιση με μικροκύματα*

Στην εκχύλιση με μικροκύματα το δείγμα τοποθετείται μαζί με το διαλύτη σε κλειστό περιέκτη και θερμαίνεται, με τη βοήθεια των μικροκυμάτων, σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και πίεσης προκαλώντας έτσι εκχύλιση της προσδιοριζόμενης ένωσης στο διαλύτη. Η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, αφού το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, όπου η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Επίσης, ο κλειστός περιέκτης επιτρέπει την άνοδο της θερμοκρασίας του διαλύτη πέρα από το σημείο ζέσεώς του με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου εκχύλισης και ταυτοχρόνως την αύξηση της απόδοσης. (Tameshia S. Ballard et al., 2010)

2.2.2.4 *Εκχύλιση με υπερήχους*

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και

αραίωσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς. (www.chemist.gr, 2012)

2.2.3 Παραλαβή αιθέριων ελαίων

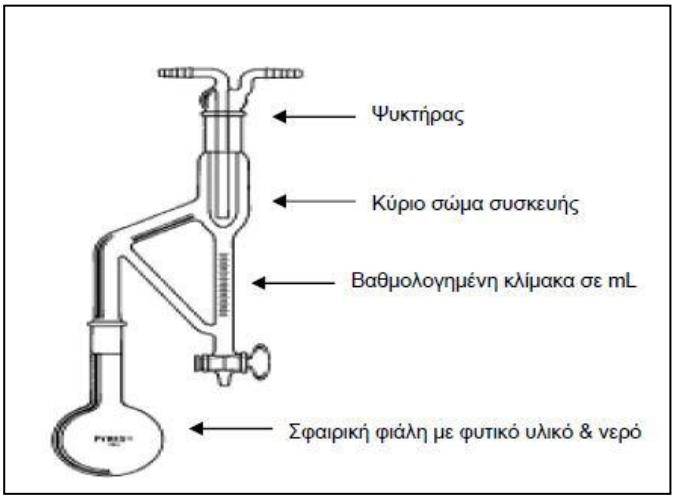
Η παραλαβή των αιθέριων (πτητικών) ουσιών που περιέχονται σε φυτικούς ιστούς χρειάζεται ειδικές προφυλάξεις και επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

- Απόσταξη με υδρατμούς (Steam Distillation, SD)
- Μικρό απόσταξη με Υδρατμούς Εκχύλιση με Οργανικό Διαλύτη (Micro Steam Distillation Extraction, MSDE).
- Απομόνωση από το χώρο πάνω από το φυτό.(Head Space, HD).
- Απόσταξη με κενό (Vacuum Head Space Distillation, VHSD)
- Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Super Critical Liquids)

Οι κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης των πτητικών συστατικών, που είναι υπεύθυνα για το άρωμα ενός φυτού, βασίζονται κυρίως στην εκχύλιση με διαλύτη και στην απόσταξη με υδρατμούς. Βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι, πολλές φορές, η δημιουργία συστατικών που δεν αντιπροσωπεύουν το πραγματικό άρωμα του φυτού. Ευαίσθητες ενώσεις μπορεί να υποβαθμιστούν ή να καταστραφούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης.

Στην παρούσα μελέτη, ακολουθήθηκε η μέθοδος της υδροαπόσταξης σε συσκευή τύπου Clevenger. Η μέθοδος της υδροαπόσταξης Clevenger περιλαμβάνει την εξής πορεία:

Οι δημιουργούμενοι από τη θέρμανση υδρατμοί συμπαρασύρουν τα πτητικά συστατικά του δείγματος στον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται και καταλήγουν στο σωλήνα του κύριου μέρους της συσκευής Clevevger σχηματίζοντας διπλή στιβάδα (πάνω στιβάδα: αιθέριο έλαιο, κάτω στιβάδα: υδατική φάση). Μέρος της υποκείμενης υδατικής φάσης επιστρέφει στη σφαιρική φιάλη που περιέχει το φυτικό υλικό, ενώ παράλληλα παράγεται νέα ποσότητα ατμών. Η όλη διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να ολοκληρωθεί η συλλογή του αιθέριου ελαίου. Μετά το τέλος της αποστάξεως το έλαιο



Σχήμα 2.3 Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger

αφήνεται να ψυχθεί , ενώ ο όγκος του μετριέται στη διαβαθμισμένη περιοχή της παγίδας. Το ποσό του αιθέριου ελαίου εκφράζεται σε mL/100g φυτικού υλικού. Εντός της σφαιρικής φιάλης παραμένει εν τέλει το αποσμωμένο φυτικό υλικό και το υδατικό εκχύλισμα, ενώ στα προιόντα της απόσταξης είναι το αιθέριο έλαιο και η υποκειμενική σε μορφή γαλακτώματος, υδατική φάση, η οποία όμως πλέον περιέχει και μέρος των συστατικών του αιθέριου ελαίου που καλείται υδρόλυμα.

2.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τελευταία γίνεται λόγος για τις ελεύθερες ρίζες που ευθύνονται για μια σειρά βλαβών που πλήττουν τον οργανισμό. Παρ' όλο που ο οργανισμός από μόνος του παράγει αντιοξειδωτικά που τις δεσμεύουν, κάποια στιγμή η παραγωγή ελευθέρων ριζών υπερβαίνει την προστατευτική ικανότητα του οργανισμού και τότε προκύπτουν μη ανατρέψιμες βλάβες της κυτταρικής δομής και της λειτουργίας του κυττάρου. Αυτό θεωρείται ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες της διαδικασίας της γήρανσης, καθώς και πλήθους εκφυλιστικών παθήσεων, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, διαβήτη, σκλήρυνση κατά πλάκας κ.α. Για το λόγο έχουν στραφεί όλοι στα αντιοξειδωτικά.

Παρά το γεγονός ότι πολλές ουσίες έχουν μελετηθεί για την αντιοξειδωτική τους δράση in vitro, η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο τους και η σημασία τους για τον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελεί έργο εξαιρετικά δυσχερές. Απαιτείται η κατανόηση των μηχανισμών, με τους οποίους βλάπτονται οι ιστοί από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς και της αλληλουχίας των αντιδράσεων, με τις οποίες οι τελευταίες σχηματίζονται in vivo (Μπόσκου, 2004).

2.3.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών και μηχανισμός δράσης τους

Σήμερα είναι γενικότερα αποδεκτό ότι κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού στο ανθρώπινο σώμα, δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (free radicals) και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), ικανά να βλάψουν το DNA, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια (Μπόσκου, 2004).

Όταν ο αριθμός των ελεύθερων ριζών που σχηματίζεται είναι μεγάλος, τότε η δράση των προστατευτικών ενζύμων όπως είναι η καταλάση και η υπεροξειδάση, δεν επαρκεί για την σάρωσή τους, με συνέπεια να προκαλούν καταστροφικές κυτταρικές επιδράσεις (π.χ. απόπτωση), οξειδώνοντας μεμβράνες λιπιδίων, πρωτεΐνες, DNA, διακόπτοντας ακόμα και την κυτταρική αναπνοή (Antolovich et al., 2002). Η οξείδωση είναι μία διαδικασία η οποία επηρεάζει ακόμα και τα τρόφιμα, στα οποία αποτελεί και την κύρια αιτία χημικής αλλοίωσης, οδηγώντας το προϊόν σε τάγγιση ή μείωση της θρεπτικής ποιότητας, του χρώματος, του αρώματος, της υφής και της ασφάλειάς του. Εκτιμάται ότι η μισή από την παγκόσμια παραγωγή φρούτων και λαχανικών καταστρέφεται, λόγω των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μετά την συγκομιδή και οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη αλλοίωση των προϊόντων αυτών. Σε όλες αυτές τις επιδράσεις των υπερβολικών οξειδώσεων, υπάρχουν κάποιοι

αμυντικοί μηχανισμοί, οι οποίοι αφορούν κυρίως δράσεις διαφόρων ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά συστατικά. (Antolovich et al., 2002).

<u>Αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών</u>

Η σειρά των αντιδράσεων που μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό επικίνδυνων ελεύθερων ριζών είναι:

$$\mathbf{O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}}\ \textbf{ρίζα υπεροξειδίου}$$
$$\mathbf{2\,O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2}$$
$$\mathbf{H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG}$$
$$\mathbf{ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O}$$
$$\mathbf{O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + O_2 + OH^-}$$

Αρχικά σχηματίζεται μία ρίζα υπεροξειδίου, η οποία ανάγεται με την αντίστοιχη δισμουτάση προς υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το τελευταίο μπορεί να απομακρυνθεί με τη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί του σώματος όμως, δεν επαρκούν γιατί παρουσία ιόντων μετάλλων (σιδήρου, μαγγανίου) η ρίζα του υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρούν προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου.

Οι ρίζες αυτές είναι εξαιρετικά δραστικές και αφαιρούν υδρογόνα από το πλησιέστερο διαθέσιμο μόριο λιπιδίου, πρωτεΐνης ή νουκλεΐνικού οξέος. Το αρχικό αυτό στάδιο εξελίσσεται σε μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση, που μπορεί να προκαλέσει τη βλάβη στο κύτταρο. Σε αυτό ακριβώς το σημείο, θεωρεί η επιστημονική κοινότητα ότι βρίσκει εφαρμογή η παρουσία των αντιοξειδωτικών, όπως είναι η βιταμίνη Ε. Πιο συγκεκριμένα οι ουσίες αυτές, δρουν ως αποσβέστες (quenchers) ριζών αφού μπορούν να αποτρέψουν τον σχηματισμό νέων αλυσίδων υπεροξείδωσης, πράγμα το οποίο δεν επιτυγχάνεται από την υπεροξειδάση (η οποία απομακρύνει μόνο τα υπεροξείδια). Ανάλογα προς τη βιταμίνη Ε πιστεύεται ότι δρα και το β-καροτένιο, καθώς και η βιταμίνη C, η οποία δρα έμμεσα ως αντιοξειδωτικό σε συνέργεια με την τοκοφερόλη (την οποία αναγεννά επαναφέροντας υδρογόνα).

2.3.2 Γενικά περί αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά, αποτελούν ενώσεις, οι οποίες μπορούν να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίσουν την οξείδωση λιπών, ελαίων, όπως επίσης και τροφίμων που περιέχουν λιπαρές ύλες, αναστέλλοντας τις αντιδράσεις έναρξης και διάδοσης της αυτοξείδωσης. Αδιαμφισβήτητα σε αυτά περιλαμβάνονται α) τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία είναι κυρίως ενώσεις φυτικής προέλευσης και β) τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον υπάρχει για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, τα οποία ενδέχεται να αντικαταστήσουν τα συνθετικά διότι ορισμένα από τα τελευταία έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για καρκινογένεση (Zheng και Wang, 2001).

Πολλές λιπαρές ύλες, ιδιαίτερα όταν δεν έχουν υποστεί εξευγενισμό, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα στην οξείδωση. Αυτό οφείλεται στην παρουσία συστατικών με αντιοξειδωτική δράση. Παρατηρείται όμως ότι τα

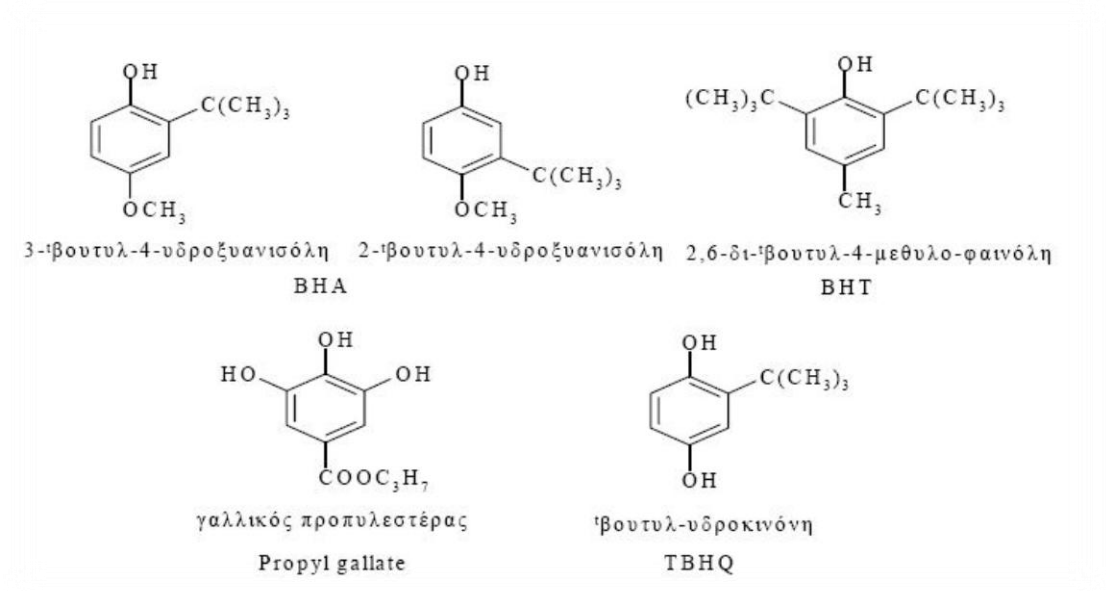
περισσότερα λίπη, τα έλαια και τα λιπαρά τρόφιμα ζωικής προέλευσης, περιέχουν μόνο μικρές ποσότητες φυσικών αντιοξειδωτικών, λόγω της επεξεργασίας στην οποία υποβάλλονται για να καταστούν εδώδιμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι επιρρεπή στην οξείδωση. Τα σπουδαιότερα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι φαινόλες και οι τοκοφερόλες (Κυριτσάκης, 2007).

2.3.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Αποτελούν ενώσεις φαινολικής κυρίως δομής και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα λιπαρών τροφίμων, ώστε να αποτρέψουν ή να επιβραδύνουν την οξείδωση τους. Η ανώτατη επιτρεπόμενη συγκέντρωση των συνθετικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα είναι 0,02%.

Τα σπουδαιότερα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι (Εικόνα 2.12) (Μπόσκου, 2004):

1. βουτυλο-υδρόξυ-ανισόλη ή BHA, μίγμα δύο ισομερών της 2-τριτ.-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-τριτ.-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης
2. το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο ή (BHT), δηλ. 2,6-δι-τριτ.-βουτυλο-παρακρεσόλη
3. εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός ή PG, ο οκτυλικός και δωδεκυλικός και
4. η τριτοταγής βουτυλοϋδροκινόνη (TBHQ)



Εικόνα 1.12 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Η TBHQ είναι το πλέον αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό για τα φυτικά έλαια, ενώ η BHA και το BHT χρησιμοποιούνται κυρίως κατά την επεξεργασία των δημητριακών για την αποφυγή της οξείδωσης τους, στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, κατά την επεξεργασία τους.

Τα δύο τελευταία χρησιμοποιούνται επίσης στην παρασκευή προϊόντων αρτοποιίας. Οι εστέρες του γαλλικού οξέος είναι ευαίσθητοι στη θέρμανση και για το λόγο αυτό η προσθήκη τους σε λιπαρή ύλη που προορίζεται για τηγάνισμα δεν είναι αποτελεσματική (Κυριτσάκης, 2007).

Η σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης των ανωτέρω συνθετικών αντιοξειδωτικών είναι: TBHQ>PG>BHT>BHA, σε όλες τις συνθήκες αποθήκευσης των ελαίων. Τα τελευταία χρόνια, όπως προαναφέρθηκε, διατυπώθηκαν επιφυλάξεις σε ότι αφορά τη χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών, αφού ορισμένα από αυτά όπως το BHT και η TBHQ σχετίζονται με τη πρόκληση διαφόρων μορφών καρκίνου σε πειραματόζωα.

2.3.4 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυτικής προέλευσης με αντιοξειδωτική δράση. Η αποτελεσματικότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών εξαρτάται κυρίως από τα φυτά από τα οποία προέρχονται και από τον τρόπο παραλαβής τους. Παραλαμβάνονται λοιπόν είτε σε μορφή αιθερίου ελαίου ή ως εκχυλίσματα (extracts).

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τα οποία παραλαμβάνονται από τα φυτά, επηρεάζεται σημαντικά από:

- Τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται στην παραλαβή τους και
- Την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή τους.

Εκτός των αρκετά γνωστών φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως βιταμίνες A, C και E, υπάρχουν και τα λιγότερο γνωστά: πολυφαινόλες, σελήνιο, φλαβονοειδή και λυκοπένιο. Οι κυριότερες διατροφικές πηγές των τελευταίων αντιοξειδωτικών είναι:

- **Βιταμίνη A:** απαντάται στο αυγό, το βούτυρο, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το συκώτι και τα ιχθυέλαια
- **β-καροτένιο:** απαντάται στα φρούτα, κυρίως τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, κίτρα) και τα λαχανικά, ιδιαίτερα τα κίτρινα και πορτοκαλί (καρότα, πιπεριές)
- **Βιταμίνη C:** απαντάται στα φρούτα, κυρίως τα εσπεριδοειδή, τα φραγκοστάφυλα, τις φράουλες, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και τα κραμβοειδή (σπανάκι, μπρόκολο)
- **Βιταμίνη E (τοκοφερόλη):** απαντάται στα φυτικά έλαια, κυρίως στο ελαιόλαδο
- **Σελήνιο:** απαντάται στο κρέας, το συκώτι, τα θαλασσινά
- **Φλαβονοειδή:** ισχυρή ομάδα αντιοξειδωτικών που περιέχονται στα φρούτα και τα λαχανικά. Αντιπροσωπευτικά είναι οι κατεχίνες (τσάι, κρασί), η κερσετίνη (μπρόκολα, σταφύλι), η ροτίνη (μήλα), η απιγενίνη (σέλινο) και οι θειοφλαβίνες (τσάι).

- **Λυκοπένιο:** κόκκινη χρωστική ουσία, η οποία ανήκει στην κατηγορία των καροτενοειδών, βρίσκεται στα φρούτα και στα λαχανικά (κυρίως ντομάτες).
- **Πολυφαινόλες:** ουσίες που περιέχονται σε ελιά και ελαιόλαδο, έχουν αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν από καρκινογενέσεις, αντιπροσωπευτικές είναι η προβιταμίνη Α και η βιταμίνη Ε.

Είναι όμως γενικά αποδεκτό ότι τα αρωματικά φυτά, αποτελούν τις κυριότερες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών. (Bozin et al., 2006)

Δευτερογενή αντιοξειδωτικά

Πρόκειται για ενώσεις οι οποίες από μόνες τους παρουσιάζουν ασήμαντη αντιοξειδωτική δράση, αλλά σε συνδυασμό με τα πρωτοταγή (κύρια) αντιοξειδωτικά αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των τελευταίων. Ο μηχανισμός της δράσης τους δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, αλλά πιστεύεται ότι ορισμένα από αυτά συμβάλλουν στην αναγωγή της οξειδωμένης ανενεργούς μορφής των πρωτογενών αντιοξειδωτικών προς την ενεργό μορφή. Άλλα συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων, γεγονός που συντελεί στον περιορισμό της παρουσίας ελεύθερων ριζών στο λιπαρό υπόστρωμα, οπότε και διευκολύνεται το έργο του πρωτοταγούς αντιοξειδωτικού. Τέλος, τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά δρουν και ως δεσμευτές μετάλλων.

Ο χαλκός και ο σίδηρος είναι τα σημαντικότερα και τα πιο συχνά εμφανιζόμενα μέταλλα στα έλαια. Τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα που δρουν ως καταλύτες στις αντιδράσεις της οξείδωσης. Κάθε δευτεροταγές αντιοξειδωτικό παρουσιάζει διαφορετική ικανότητα δέσμευσης μεταλλικών ιόντων. Στα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται και τα μέσα δέσμευσης του οξυγόνου. Τα σημαντικότερα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά είναι το κιτρικό οξύ και το φωσφορικό οξύ (Κυριτσάκης, 2007).

2.3.5 Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών

Η οξείδωση μπορεί να ενεργοποιηθεί από έναν σημαντικό αριθμό χημικών και φυσικών φαινομένων και να εξελίσσεται πάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα μέχρι κάποιος αμυντικός μηχανισμός (αντιοξειδωτικό) να μπλοκάρει την όλη διαδικασία. Τα υποστρώματα-στόχος είναι συνήθως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), φωσφορολιπίδια, χοληστερόλη και DNA.

Η οξειδωτική αποσύνθεση των λιπιδίων αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων και της οξειδωτικής μετατροπής της LDL. Η οξείδωση των λιπαρών υλών λαμβάνει χώρα με τη μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία διαχωρίζεται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμός (termination).

Κατά το πρώτο στάδιο παρουσία φωτός, θέρμανσης, μετάλλων (Cu, Fe) ή μεταλλοπρωτεϊνών σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες:

$$LH + R^{\cdot} \rightarrow L^{\cdot} + RH$$

Όπου: LH: το λιπαρό υπόστρωμα
$R^{\cdot}$: ο οξειδωτικός παράγοντας
$L^{\cdot}$: ρίζα

Στη συνέχεια, οι ρίζες ($L^{\cdot}$) ενώνονται με οξυγόνο και σχηματίζουν υπεροξειδικές ρίζες ($LOO^{\cdot}$), οι οποίες αποσπούν ένα μόριο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο (LH) και σχηματίζουν υπεροξείδιο (LOOH) και μια νέα ρίζα ($L^{\cdot}$). Η νέα ρίζα μπορεί επίσης να αντιδράσει με οξυγόνο και να δώσει νέες ρίζες και υπεροξείδια.

$$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$$
$$LOO + LH \rightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

Τα υπεροξείδια είναι άοσμα, αλλά διασπώνται σε αλκοόλες, αλδεΰδες και κετόνες, που προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή στις αλλοιωμένες λιπαρές ύλες, καθώς και υδρογονάνθρακες και αλκοξυλ – ρίζες ($LO^{\cdot}$).

$$LOOH \rightarrow LO^{\cdot} + HO^{\cdot}$$
$$2LOOH \rightarrow LOO^{\cdot} + LO^{\cdot} + H_2O$$

Στο τρίτο στάδιο οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους παρέχοντας αδρανή προϊόντα.

$$LO^{\cdot} + LO^{\cdot} \rightarrow \text{αδρανή προϊόντα}$$
$$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow \text{αδρανή προϊόντα}$$
$$LO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow \text{αδρανή προϊόντα}$$

Η προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών εφαρμόζεται σε πολλά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης και με διάφορους τρόπους. Έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριες κατηγορίες: σε παρεμποδιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης ή πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά (chain- breaking or primary antioxidants) και σε προστατευτικά ή δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά (preventive or secondary antioxidants) (Antolovich et al., 2002). Τα δευτερεύοντα απλώς καθυστερούν τον ρυθμό της οξείδωσης. Τα πρωτεύοντα καθυστερούν ή παρεμποδίζουν το στάδιο έναρξης, αντιδρώντας με τη ρίζα ($L^{\cdot}$) ή παρεμποδίζουν το στάδιο διάδοσης αντιδρώντας με τις υπεροξειδικές ($LOO^{\cdot}$) και αλκοξυλ-ρίζες ($LO^{\cdot}$). Παράλληλα, σχηματίζεται ελεύθερη αντιοξειδωτική ρίζα ($A^{\cdot}$), που δεν έχει την ικανότητα να αρχίσει και να προάγει νέα αλυσιδωτή αντίδραση, απλά μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες και να δώσει υπερόξυ αντιοξειδωτικά συστατικά.

$$L^{\cdot} + AH \rightarrow LH + A^{\cdot}$$
$$LOO^{\cdot} + AH \rightarrow LOOH + A^{\cdot}$$
$$LO^{\cdot} + AH \rightarrow LOH + A^{\cdot}$$
$$A^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow LOOA$$
$$A^{\cdot} + LO^{\cdot} \rightarrow LOA$$

Ο μηχανισμός που αποτρέπει την οξείδωση, μέσω συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων που καταλύουν την οξείδωση, δεν περιλαμβάνει ελεύθερες ρίζες. Εμποδίζει, απλώς, το μεταλλικό ιόν να συμμετάσχει σε αντιδράσεις αποικοδόμησης των υδροϋπεροξειδίων (LOOH), και κατά συνέπεια τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά που δρουν σύμφωνα με τον τρίτο μηχανισμό, οφείλουν την αντιοξειδωτική τους δράση στην καταστολή του οξυγόνου απλής κατάστασης. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με μεταφορά ενέργειας από το οξυγόνο απλής κατάστασης στο μόριο του αντιοξειδωτικού, γεγονός που επαναφέρει το οξυγόνο στην αδρανή βασική κατάσταση, είτε με αντίδραση με το οξυγόνο απλής κατάστασης και την παραγωγή σταθερών προϊόντων.

2.3.6 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν επιτυγχάνεται άμεσα, αλλά με μέτρηση της επίδρασης των αντιοξειδωτικών συστατικών πάνω στον έλεγχο της οξείδωσης (Antolovich et al, 2002). Η αντιοξειδωτική δράση ενός μόνο συστατικού του φυτικού εκχυλίσματος είναι αδύνατο να προσδιοριστεί, λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του εκχυλίσματος, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών (Erkan et al, 2008).

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αλλά καμία επίσημη μέθοδος προσδιορισμού, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η σύγκριση και η αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων. Επομένως, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των συστημάτων, έχει επιβληθεί η χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Antolovich et al, 2002, Erkan et al, 2008).

Η αντιοξειδωτική δράση των συστατικών επηρεάζεται σημαντικά από (Antolovich et al, 2002, Κυριτσάκης, 2007):

- τη μέθοδο προσδιορισμού,
- τον χημικό τους τύπο,
- τις συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόζονται κατά την παραλαβή των εκχυλισμάτων
- την πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε
- την πολικότητα του υποστρώματος (τρόφιμα ή σύστημα λιπιδίων) που χρησιμοποιήθηκε (Miura et al, 2002)
- και τη συγκέντρωση του δείγματος

Μέθοδοι προσδιορισμού

Υπάρχουν μέθοδοι που περιλαμβάνουν ένα διακριτό στάδιο οξείδωσης, πάνω στο οποίο γίνεται ακολούθως η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης, ανάλογα με την εξέλιξη της οξείδωσης, όπως για παράδειγμα η οξείδωση του λινολεϊκού οξέος, ακολουθείται από προσδιορισμό της σύζευξης διενίου. Σε αυτές ανήκουν και οι μέθοδοι που παρεμποδίζουν την παρουσία ελεύθερων ριζών (free radical-trapping methods). Σε άλλες μεθόδους προσδιορίζεται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών να περιορίζουν την οξείδωση των λιπαρών συστατικών (lipid oxidation) (Erkan et al., 2008).

Λαμβάνοντας υπόψη, ότι τα χαρακτηριστικά στοιχεία μίας οξείδωσης είναι το υπόστρωμα, το οξειδωτικό μέσο, ο εκκινητής, καθώς και τα ενδιάμεσα και τα τελικά προϊόντα, η μέτρηση καθενός από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης (Antolovich et al, 2002).

Σχετικά με τις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, κατά τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, οι μέθοδοι χωρίζονται σε:

- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays, ET)
- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays, HAT).

Οι ET μέθοδοι μετρούν την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αλλάζει χρώμα, καθώς ανάγεται στην αντίδραση με το οξειδωτικό. Οι HAT μέθοδοι εξετάζουν την κινητική των αντιδράσεων και οι συγκεντρώσεις απορρέουν από τις κινητικές καμπύλες (Huang et al, 2005).

Επειδή, τα εκχυλίσματα φυτών περιέχουν τόσο λιπόφιλα, όσο και υδρόφιλα συστατικά, η μέθοδος που χρησιμοποιείται επιδρά στην μετρούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα.

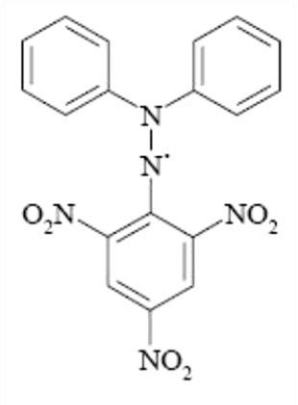
Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος ET- μεθόδων, η οποία χρησιμοποιείται και στην παρούσα μελέτη είναι αυτή του DPPH.

2.3.6.1 *Μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2–διφαινυλο-1-πικρυλο- υδραζιλίου (DPPH˙)*

Το DPPH˙ (Εικόνα 2.13) είναι μία σταθερή ρίζα, η οποία παρουσιάζει μία έντονη απορρόφηση στα 515 nm στο φάσμα του ορατού. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του αντιοξειδωτικού να αντιδρά με την ρίζα του DPPH α) δίνοντάς του ένα υδρογόνο, ή β) με το να δεσμεύεται πάνω σε αυτήν:

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$
$$DPPH^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow DPPH\text{-}A$$

Έτσι, παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 515 nm, μπορούμε να παρακολουθήσουμε την καταστροφή της ρίζας DPPH˙.



Εικόνα 2.13 Ρίζα DPPH

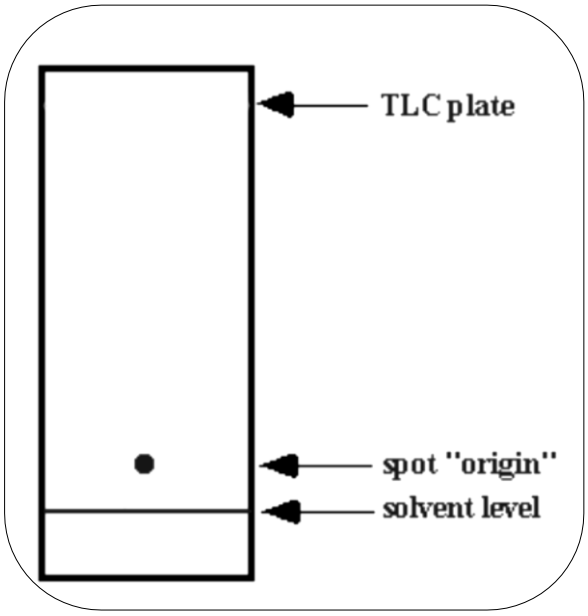
Ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρησιμοποιείται το EC_{50}, το οποίο περιγράφεται ως η ποσότητα του αντιοξειδωτικού που είναι απαραίτητη για την μείωση στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH (Antolovich et al., 2002, Erkan et al., 2008). Επίσης, παρεμφερές κριτήριο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποτελεί και το χρονικό διάστημα (TEC_{50}), το οποίο απαιτείται για να φτάσει σε σταθερή κατάσταση το EC_{50}. Οι επιδράσεις του συνδυασμού των δύο παραμέτρων, που αναφέρθηκαν, βρίσκουν έκφραση σε μία νέα παράμετρο, την αντιοξειδωτική δραστικότητα (Antolovich et al., 2002).

Μια πρώτη ποιοτική ένδειξη της αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορεί να ληφθεί μέσω *χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).* Σε αυτή τη χρωματογραφική τεχνική χρησιμοποιούνται γυάλινες ή αλουμινένιες πλάκες επιστρωμένες με μια λεπτή στοιβάδα στατικής φάσης. Η στατική φάση συνήθως είναι γέλη πυριτίου ή λιγότερο συχνά οξείδιο αργιλίου, κυτταρίνη κτλ. Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2cm (Εικόνα 2.14). Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου (Εικόνα 2.16) στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Οι διαλύτες πρέπει να έχουν τοποθετηθεί εντός του θαλάμου τουλάχιστον 10min πριν την τοποθέτηση της πλάκας ώστε να έχει κορεσθεί ο υπερκείμενος χώρος από τους ατμούς των διαλυτών. Ακολούθως, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων (περίπου 10-20min, ανάλογα με το ύψος της πλάκας) μέχρι το μέτωπό του να φτάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται σε ρεύμα αέρα.

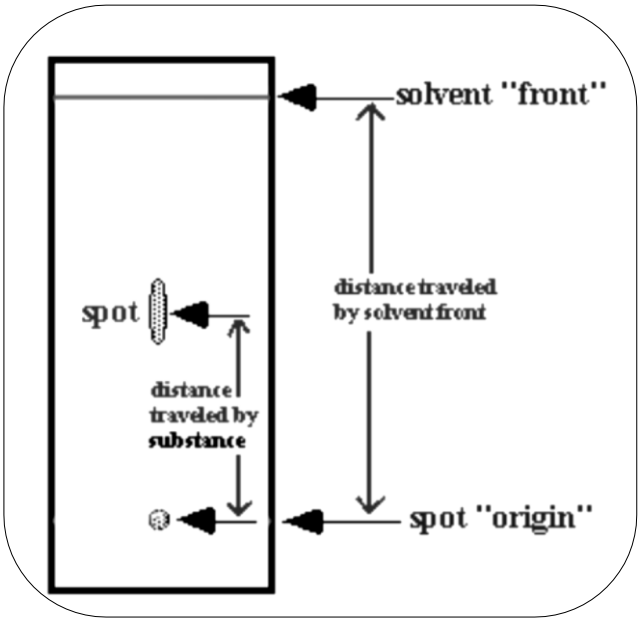
Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων (Εικόνα 2.15). Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356nm). Από το χρώμα των κηλίδων στο ορατό και την απορρόφηση στο υπεριώδες μπορεί να εξαχθούν

συμπεράσματα για την κατηγορία των ουσιών που παρατηρούμε (φλαβονοειδές, αλκαλοειδές, σάκχαρο κτλ).

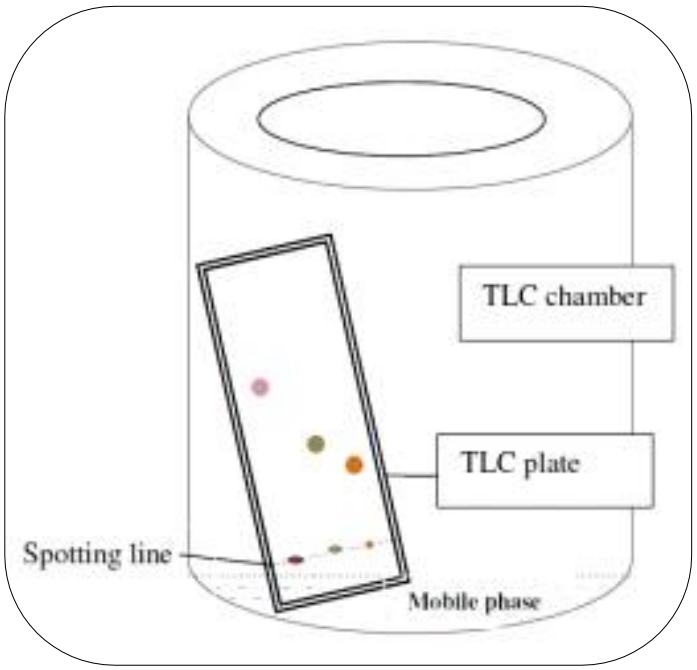
Στη συνέχεια, η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα DPPH και αναλόγως την αντιοξειδωτική δράση του υπό εξέταση δείγματος παρατηρείται ο ανάλογος αποχρωματισμός του DPPH (όσο πιο έντονα τα αντιοξειδωτικά τόσο πιο έντονος και ο αποχρωματισμός). (Vessela D. Kancheva et al., 2010)



Εικόνα 2.14 Πλάκα TLC



Εικόνα 2.15 Διακριτές κηλίδες



Εικόνα 2.16 Αεροστεγής θάλαμος

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν:

- Φλούδα και πούλπα ροδιού
- Φλούδα πορτοκαλιού
- Φλούδα μανταρινιού
- Φύλλα δάφνης
- Δενδρολίβανο

Για τα παραπάνω δείγματα πραγματοποιήθηκε ξήρανση σε ρεύμα αέρα. Μετρήθηκαν οι αρχικές και τελικές υγρασίες των προϊόντων και έγινε επιπλέον υπολογισμός των ενδιάμεσων υγρασιών με σκοπό την εύρεση των κινητικών ξήρανσης. Επιπλέον, μελετήθηκε η απόδοση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης: με πολικούς διαλύτες, με υπερήχους και με μικροκύματα. Στην εκχύλιση με πολικούς διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν ξηρά δείγματα από ξήρανση με ρεύμα αέρα ενώ στις άλλες δύο μεθόδους τα δείγματα ήταν φρέσκα (νωπά). Μελετήθηκε επίσης η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αυτών με δύο τρόπους: ποιοτικά με τη μέθοδο TLC και ποσοτικά με τη μέθοδο DPPH. Τέλος, έγινε παραλαβή των αιθέριων ελαίων του μανταρινιού με απόσταξη με υδρατμούς (Clevenger).

Σημείωση: Όλα τα φρέσκα (νωπά) δείγματα ήταν αποθηκευμένα στην κατάψυξη στους -30ºC. Τα ξηρά δείγματα ήταν αποθηκευμένα σε αεροστεγώς κλεισμένη συσκευασία στους -30ºC. Τέλος, τα εκχυλίσματα διατηρούνταν στο ψυγείο.

3.2 ΞΗΡΑΝΣΗ

3.2.1 Εξοπλισμός

Τα πειράματα της ξήρανσης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και χρησιμοποιήθηκαν:

- Πνευματικός ξηραντήρας (προβιομηχανικής κλίμακας του εργαστηρίου «Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών»)
- Μονάδα ξήρανσης υπό κενό – Φούρνος κενού (Sanyo Gallenkamp PLC, Leicester, England)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Φούρνος αέρα (Thermawatt TG30)

3.2.2 Διαδικασία - Αποτελέσματα

3.2.2.1 *Μέτρηση αρχικής και τελικής υγρασίας*

Η υγρασία μετρήθηκε ζυγίζοντας το αρχικό και το τελικό βάρος των δειγμάτων, πριν την είσοδό τους και μετά την παραμονή τους στη μονάδα ξήρανσης υπό κενό για 24 h στους 70 ºC. Ως αρχική υγρασία θεωρήθηκε η υγρασία που περιείχαν τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ ως τελική υγρασία, αυτή που περιείχαν μετά την ξήρανση υπό κενό. Το ποσοστό περιεχόμενης υγρασίας επί υγρής βάσης (kg νερού/kg νωπού στερεού) υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους των δειγμάτων πριν και μετά την ξήρανση σύμφωνα με τον τύπο:

$$X = \frac{w_{\alpha\rho\chi} - w}{w_{\alpha\rho\chi}}$$

Εικόνα 3.1 Μονάδα ξήρανσης υπό κενό – Φούρνος κενού

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ		
Δείγμα	**Αρχική υγρασία (kg νερού/kg ν.στ.) (%)**	**Τελική υγρασία(kg νερού/kg ν.στ.) (%)**
Ρόδι φλούδα	75,34 ± 0,83	1,69
Ρόδι πούλπα	63,94 ± 0,13	0,67
Πορτοκάλι φλούδα	72,73 ± 0,5	0,51
Μανταρίνι φλούδα	73,58 ± 1,38	0,95
Δάφνη φύλλα	50,40 ± 1,34	0,25
Δενδρολίβανο	65,8 ± 1,71	0,17

Πίνακας 3.1 Αρχική και τελική υγρασία

3.2.2.2 *Ξήρανση σε ρεύμα αέρα*

Η ξήρανση των δειγμάτων, εκτός της δάφνης και του δενδρολίβανου, πραγματοποιήθηκε στον εργαστηριακό ξηραντήρα ραφιών σε θερμοκρασία 50 ºC και ταχύτητα αέρα 1 m/s. Το δενδρολίβανο και η δάφνη ξηράνθηκαν στον εργαστηριακό φούρνο αέρα σε θερμοκρασία 50 ºC χωρίς ρύθμιση ταχύτητας αέρα.

Όλα τα δείγματα, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στην κατάψυξη, αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως ότου ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε ειδικούς περιέκτες στα ράφια του ξηραντήρα όπου και έγινε η ξήρανση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα δείγματα απομακρύνονταν από τον ξηραντήρα, ζυγίζονταν ώστε να καταγραφεί το βάρος τους στο συγκεκριμένο χρόνο και επανατοποθετούνταν στον εργαστηριακό ξηραντήρα. Μετά το πέρας της ξήρανσης, τα δείγματα αποθηκεύονταν σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να σταθεροποιηθούν και ζυγίζονταν ξανά. Στη συνέχεια, τα ξηρά προϊόντα τοποθετήθηκαν σε μονάδα ξήρανσης υπό κενό για 24 h στους 70 ºC ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία και καταγράφηκε το τελικό τους βάρος. Η διαδικασία αυτή έγινε για 3 επαναλήψεις.

Από τη μεταβολή του βάρους των προϊόντων υπολογίσθηκε το νερό που εξατμίστηκε και συνεπώς η μεταβολή υγρασίας του κάθε δείγματος. Από τις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν υπολογίστηκε η μέση μεταβολή υγρασίας επί ξηρής βάσης (kg νερού/kg ξηρού στερεού) κατά τη διάρκεια της ξήρανσης για κάθε δείγμα με βάση τον τύπο:

$$X = \frac{w_{\alpha\rho\chi} - w}{w_{\tau\varepsilon\lambda}}$$

Όπου X: ποσοστό υγρασίας επί ξηρής βάσης

$w_{\alpha\rho\chi}$: Αρχικό βάρος δείγματος

w: Βάρος δείγματος σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή

$w_{\tau\varepsilon\lambda}$: Τελικό βάρος ξηρού δείγματος

Με δεδομένη την υγρασία ισορροπίας μετά το πέρας της ξήρανσης X_e (kg νερού / kg ξ.στ.) και το ποσοστό αρχικής υγρασίας X_o (kg νερού / kg ξ.στ.), υπολογίστηκε η μεταβολή της θεωρητικής υγρασίας $X_{\theta\varepsilon\omega\rho}$, με βάση τον τύπο:

$$X_{\theta\varepsilon\omega\rho} = X_e + (X_o - X_e) \cdot e^{(-kt)}$$

Όπου $X_{\theta\varepsilon\omega\rho}$: θεωρητικό ποσοστό υγρασίας

X_e: ποσοστό υγρασίας ισορροπίας μετά το πέρας της ξήρανσης

X_o: ποσοστό αρχικής υγρασίας

k: σταθερά ξήρανσης

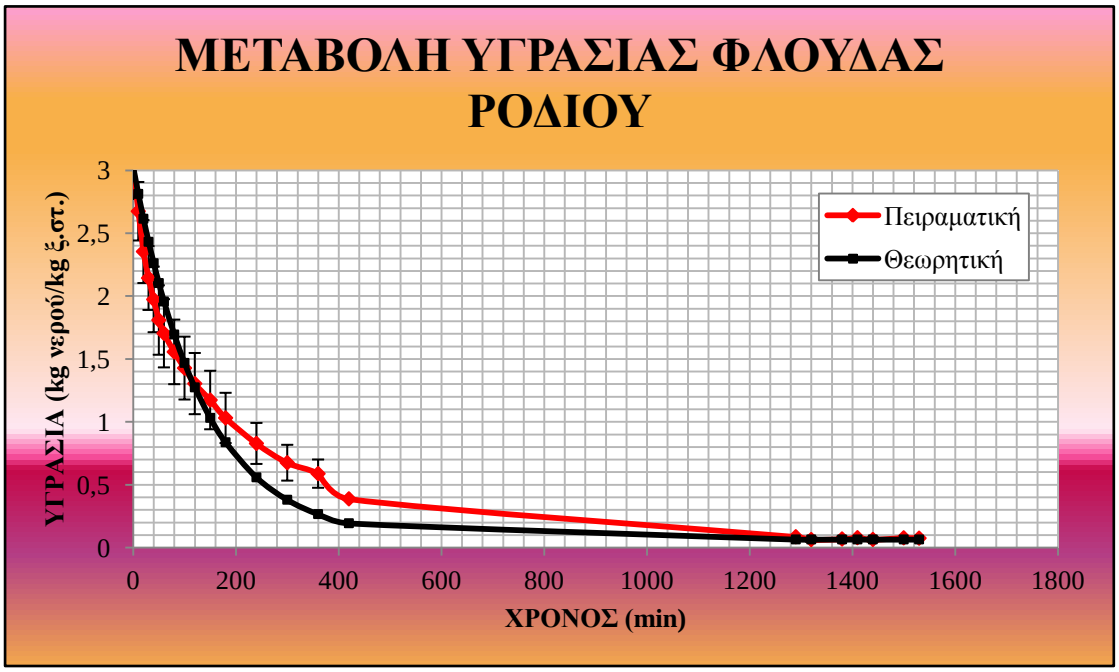
Με τη χρήση της εντολής solver του excel προέκυψαν οι σταθερές ξήρανσης (*k*) για κάθε δείγμα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

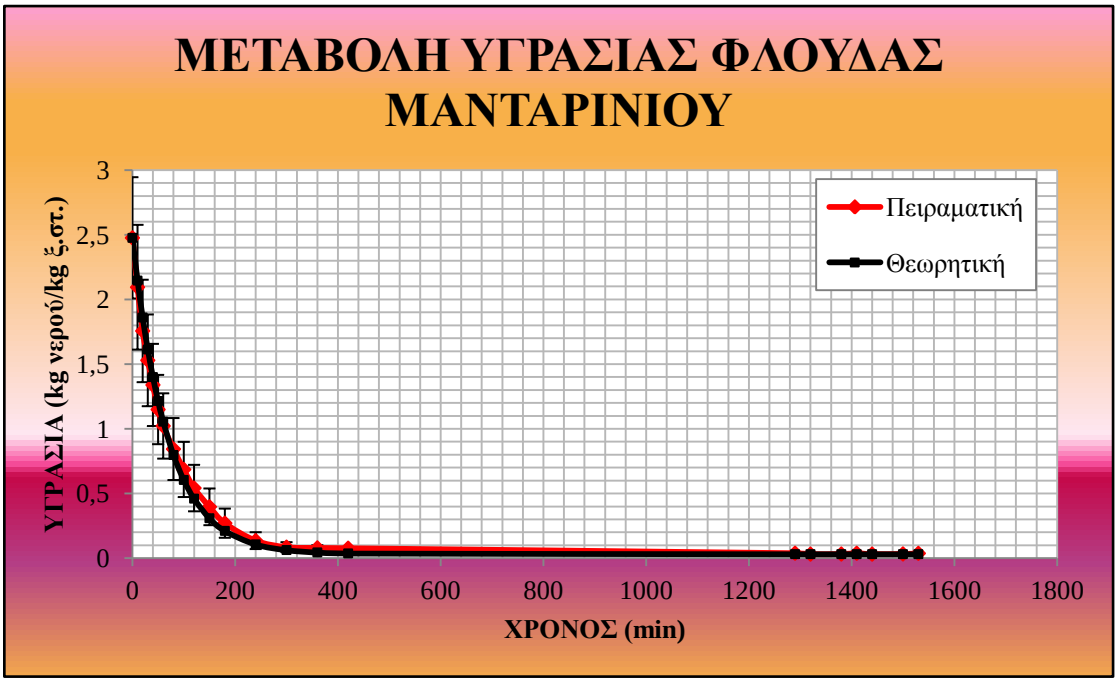
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΞΗΡΑΝΣΗΣ			
Δείγμα	**Σταθερά ξήρανσης k (min^{-1})**	**Αρχική υγρασία Xo (kg νερού/kg ξ.στ.)**	**Υγρασία ισορροπίας Xe (kg νερού/kg ξ.στ.)**
Ρόδι φλούδα	0,0075	3,0247	0,0640
Ρόδι πούλπα	0,0373	1,8755	0,0140
Πορτοκάλι φλούδα	0,0257	2,6279	0,0316
Μανταρίνι φλούδα	0,0145	2,4746	0,0306
Δάφνη φύλλα	0,0071	0,9287	0,0046
Δενδρολίβανο	0,0132	2,0533	0,0255

Πίνακας 3.2 Σταθερές ξήρανσης

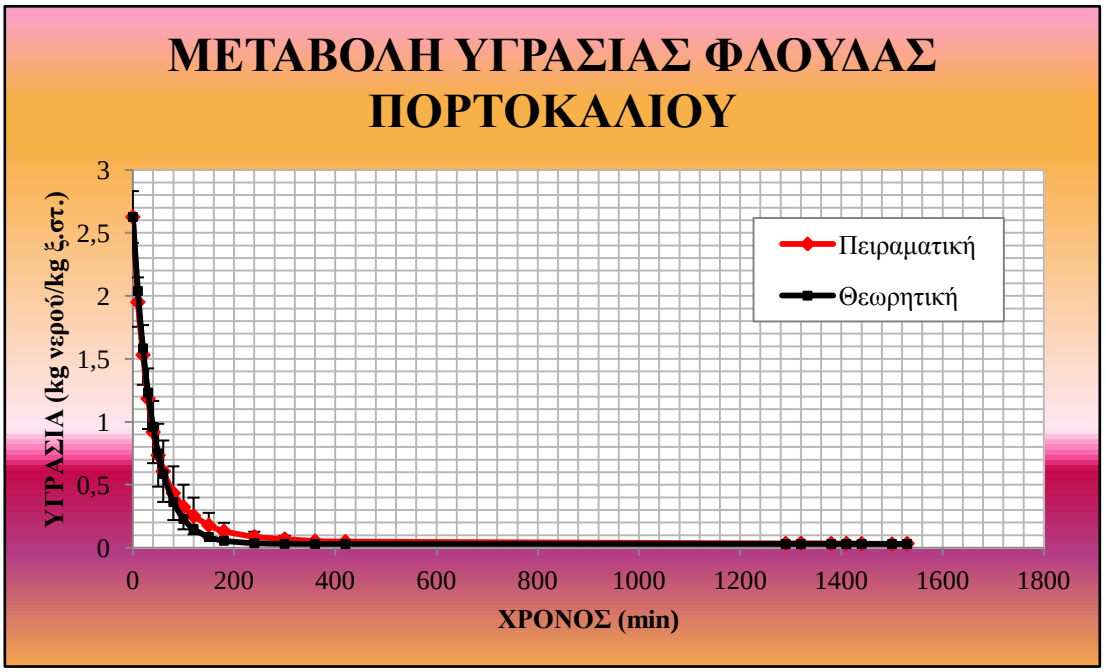
Παρακάτω παρουσιάζονται και οι καμπύλες μεταβολής της υγρασίας επί ξηρής βάσης συναρτήσει του χρόνου, καθώς και οι καμπύλες θεωρητικής υγρασίας από τις οποίες προέκυψαν και οι σταθερές ξήρανσης *k*.



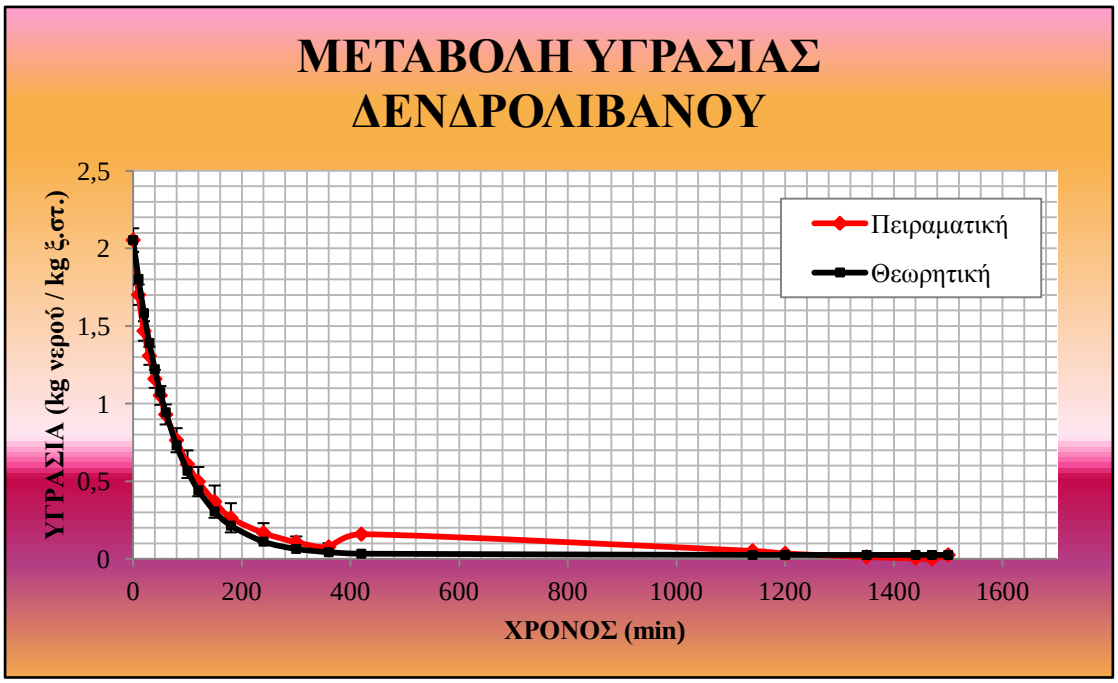
Διάγραμμα 3.1 Μεταβολή υγρασίας φλούδας ροδιού



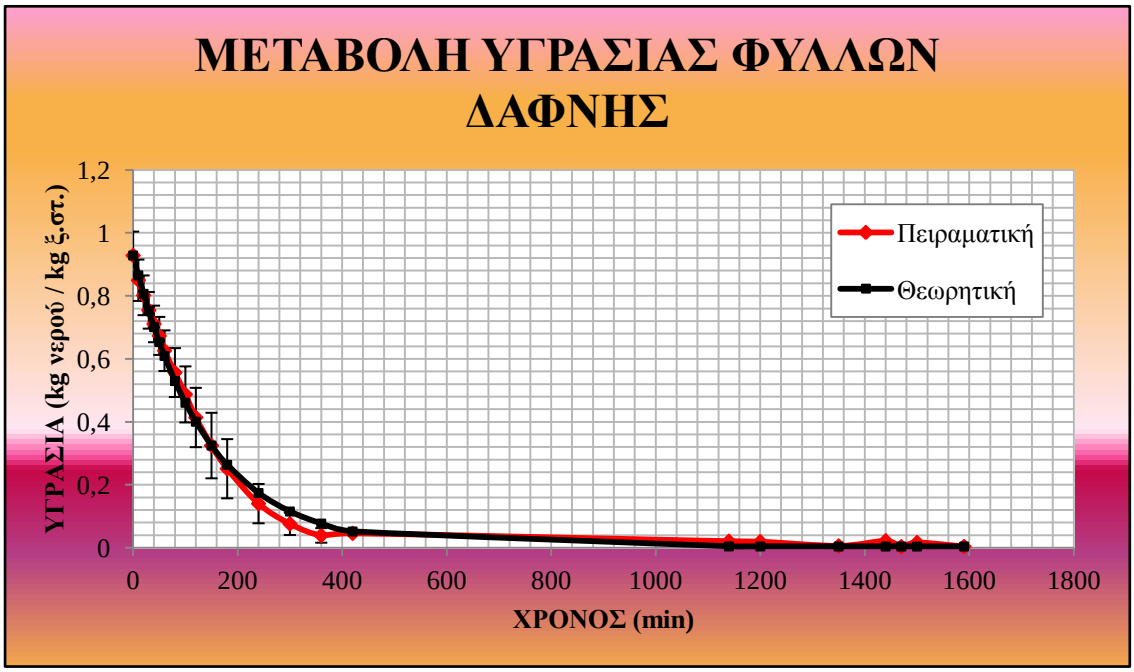
Διάγραμμα 3.2 Μεταβολή υγρασίας φλούδας μανταρινιού



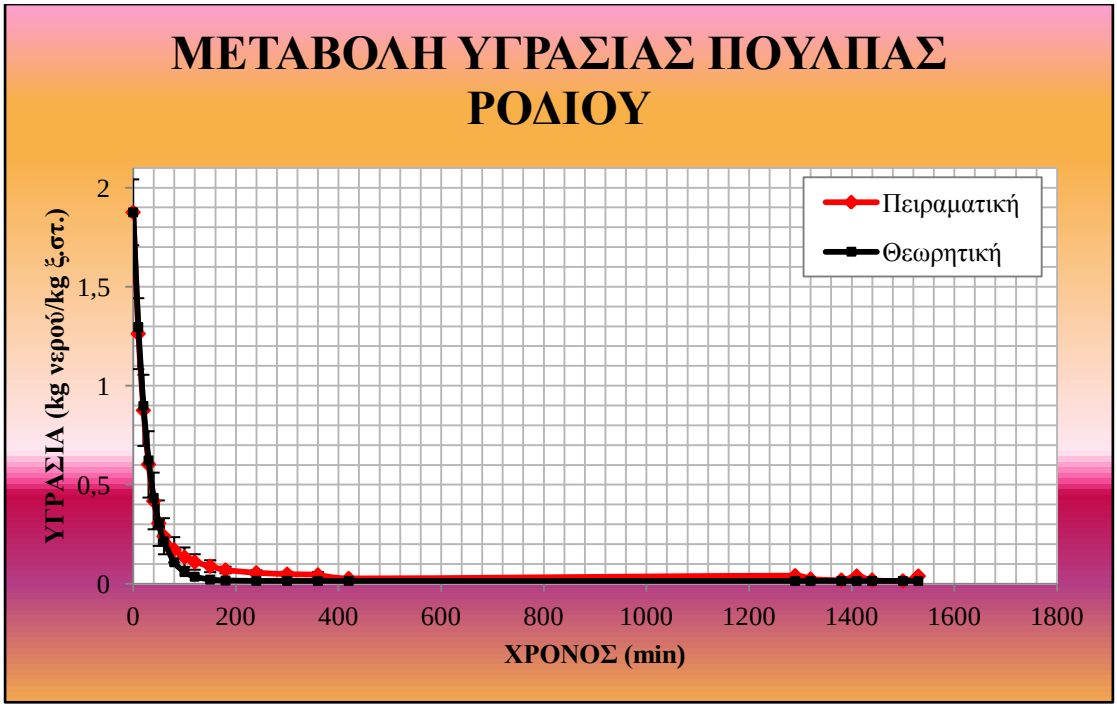
Διάγραμμα 3.3 Μεταβολή υγρασίας φλούδας πορτοκαλιού



Διάγραμμα 3.4 Μεταβολή υγρασίας δενδρολίβανου



Διάγραμμα 3.5 Μεταβολή υγρασίας φύλλων δάφνης



Διάγραμμα 3.6 Μεταβολή υγρασίας πούλπας ροδιού

Παρατηρούμε ότι η υγρασία όλων των δειγμάτων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η μεταβολή της υγρασίας είναι έντονη στην αρχή και ελαττώνεται στη συνέχεια έως ότου η υγρασία φτάσει σε ένα πλατό, όπου η μεταβολή της είναι ελάχιστη.

Η θεωρητική καμπύλη ξήρανσης που προσαρμόστηκε για κάθε δείγμα αποδεικνύει ότι οι ξηράνσεις ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά ξήρανσης ενός δείγματος τόσο ταχύτερη είναι η ξήρανση. Έτσι, στην προκειμένη περίπτωση, τα δείγματα κατά αυξανόμενη ταχύτητα ξήρανσης είναι:

Δάφνη φύλλα < Ρόδι φλούδα < Δενδρολίβανο < Μανταρίνι φλούδα < Πορτοκάλι φλούδα < Ρόδι πούλπα.

Η σειρά αυτή συμφωνεί και με τα διαγράμματα μεταβολής υγρασίας των δειγμάτων.

3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

3.3.1 Εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας

3.3.1.1 *Υλικά*

Για τις διαδοχικές εκχυλίσεις με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας χρησιμοποιήθηκαν ξηρά δείγματα από ξήρανση με ρεύμα αέρα τα οποία ήταν αεροστεγώς κλεισμένα και αποθηκευμένα στους -30 ºC. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια του εργαστηρίου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών:

- Εξάνιο
- Μεθανόλη
- Οξικός αιθυλεστέρας
- 1-Βουτανόλη
- Απιονισμένο νερό

3.3.1.2 *Εξοπλισμός*

Τα πειράματα των διαδοχικών εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Αντλία υψηλού κενού

3.3.1.3 *Διαδικασία εκχύλισης*

Όλα τα ξηρά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ομογενοποιηθεί σε μπλέντερ. Τα τριμμένα αυτά δείγματα αναμείχθηκαν με εξάνιο σε αναλογία 1/4 w/v και τοποθετήθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστήρα για ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, το μίγμα διηθήθηκε υπό κενό και το διήθημα εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση οπότε παραλήφθηκε το εκχύλισμα του εξανίου το οποίο φυλάχθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) στο ψυγείο. Στο εκχύλισμα του εξανίου περιέχονται τα τερπενοειδή και τα λιπόφιλα συστατικά των δειγμάτων που δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση.

Το στερεό υπόλειμμα από τη διήθηση αναμείχθηκε με μεθανόλη σε αναλογία 1/4 w/v και τοποθετήθηκε ξανά στον περιστροφικό εξατμιστήρα για ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια με διήθηση υπό κενό και εξάτμιση, παραλήφθηκε το εκχύλισμα της μεθανόλης το οποίο οδηγήθηκε προς εκχύλιση με τους υπόλοιπους διαλύτες.

Τα εκχυλίσματα αυτά, αναμείχθηκαν με 100 ml θερμό απιονισμένο νερό (εκτός του πορτοκαλιού που χρειάστηκε 110 ml) και αφέθηκαν να αναδεύονται έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα διαλύματα που προέκυψαν εκχυλίστηκαν 3 φορές με οξικό αιθυλεστέρα σε διαχωριστική χοάνη. Τα οργανικά

εκχυλίσματα συλλέγονταν στην ίδια φιάλη όπου πραγματοποιήθηκε ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4. Στη συνέχεια, οδηγήθηκαν προς πλήρη εξάτμιση στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στη συνέχεια στην αντλία κενού. Σημειώθηκε το καθαρό βάρος του κάθε εκχυλίσματος και αποθηκεύτηκε σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) στο ψυγείο. Η υδατική φάση, εκχυλίστηκε με 1-Βουτανόλη 3 φορές σε διαχωριστική χοάνη και ακολούθησε, όπως προηγουμένως, πλήρης εξάτμιση, ζύγιση και αποθήκευση των εκχυλισμάτων. Στον οξικό αιθυλεστέρα και στη βουτανόλη εκχυλίζονται τα φαινολικά παράγωγα.

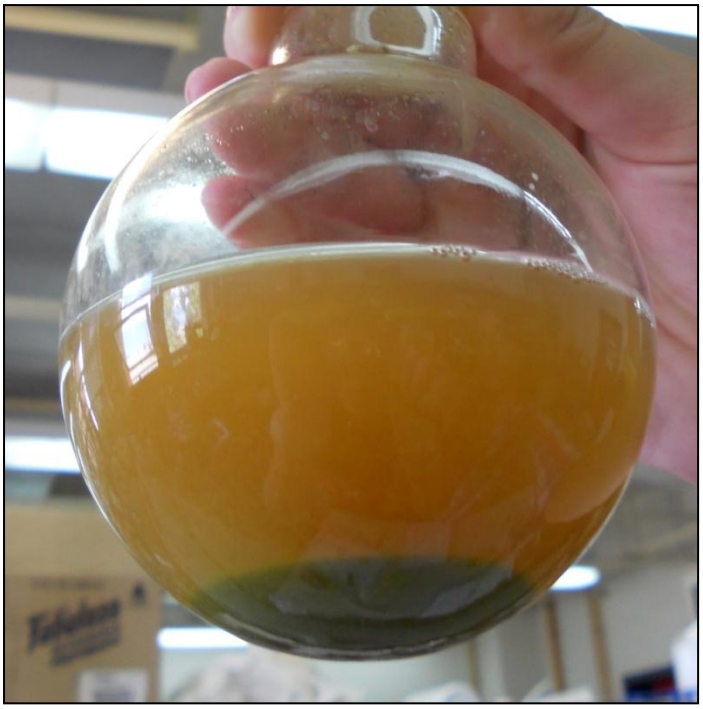
Το εκχύλισμα του νερού που απέμεινε, οδηγήθηκε και αυτό προς πλήρη εξάτμιση, ζύγιση και αποθήκευση. Σε αυτό εκχυλίζονται κατά κύριο λόγο οι πολυσακχαρίτες.

Παρατήρηση: Να σημειωθεί ότι το εκχύλισμα μεθανόλης του δενδρολίβανου δεν διαλύθηκε στο νερό και πραγματοποιήθηκε επιπλέον διήθηση για την απομάκρυνση του ιζήματος, πριν γίνουν οι εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα και βουτανόλη.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες εικόνες από την πειραματική διαδικασία:

Εικόνα 3.2: Περιστροφικός εξατμιστήρας

Εικόνα 3.3: Εκχύλιση δενδρολίβανου με 1-Βουτανόλη



Εικόνα 3.4: Ίζημα δενδρολίβανου

Εικόνα 3.5: Εκχύλιση δενδρολίβανου με οξικό αιθυλεστέρα

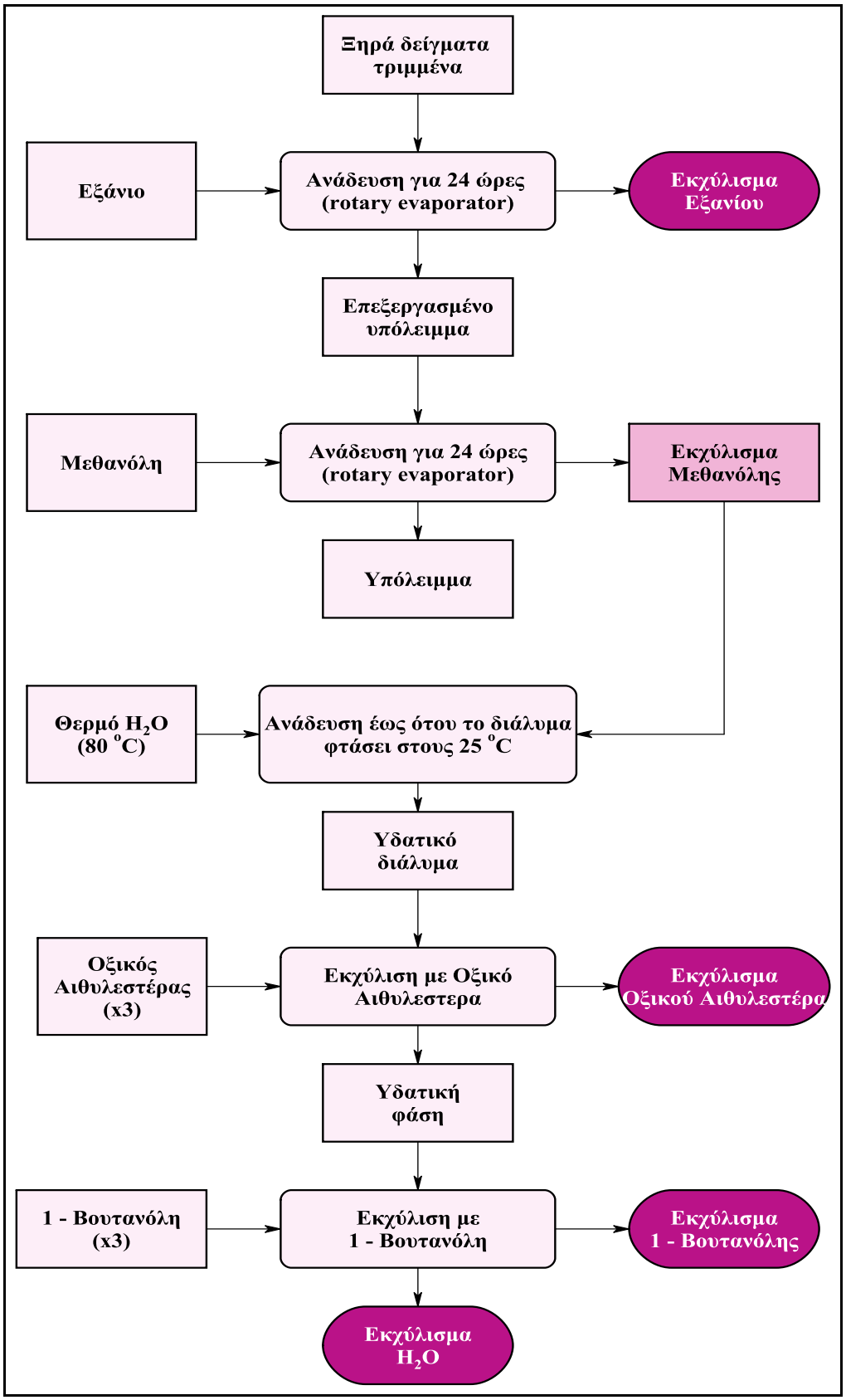
Εικόνα 3.6: Εκχύλιση φλούδας ροδιού με 1-βουτανόλη

Εικόνα 3.7: Εκχύλιση φλούδας ροδιού με οξικό αιθυλεστέρα

Εικόνα 3.8: Εκχύλιση φλούδας μανταρινιού με 1-βουτανόλη

3.3.1.4 *Διάγραμμα ροής*

Το διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ροής διαδοχικών (polar) εκχυλίσεων

3.3.1.5 *Αποτελέσματα εκχύλισης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας*

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι ποσότητες των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και οι αποδόσεις των εκχυλίσεων:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ						
Δείγμα	**Δείγμα (g)**	**Εξάνιο (ml)**	**Μεθανόλη (ml)**	**Οξικός αιθυλεστέρας (ml)**	**1-Βουτανόλη (ml)**	**Νερό (ml)**
Ρόδι φλούδα	25	100	100	240	120	100
Ρόδι πούλπα	25	100	100	240	120	100
Πορτοκάλι φλούδα	25	100	100	280	120	110
Μανταρίνι φλούδα	25	100	100	320	120	100
Δάφνη φύλλα	25	100	100	180	120	100
Δενδρολίβανο	40	160	160	240	180	100

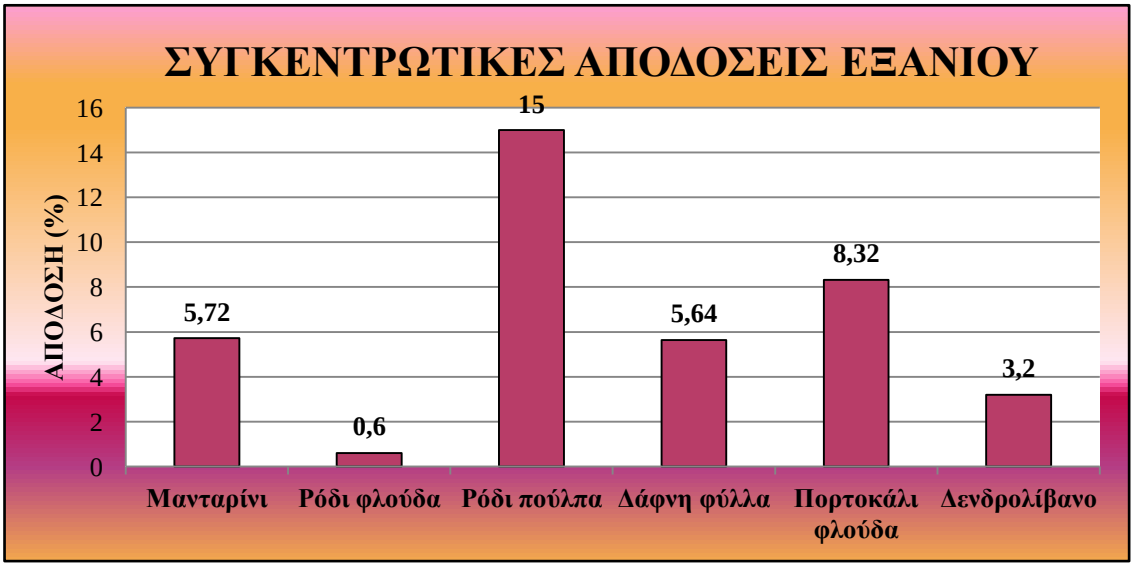
Πίνακας 3.3: Ποσότητες χρησιμοποιούμενων υλικών

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΔΟΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΕΩΝ					
Δείγμα	**Εξάνιο (%)**	**Μεθανόλη (%)**	**Οξικός αιθυλεστέρας (%)**	**1-Βουτανόλη (%)**	**Νερό (%)**
Ρόδι φλούδα	0,6	37,72	2,44	11,76	26,08
Ρόδι πούλπα	15	32,72	0,52	5,04	20,96
Πορτοκάλι φλούδα	8,32	40,16	1,28	6,96	31,44
Μανταρίνι φλούδα	5,72	30,16	1,32	6,36	29,84
Δάφνη φύλλα	5,64	14,32	2	3,52	7,44
Δενδρολίβανο	3,2	8,125	0,05	1,2	6,48

Πίνακας 3.4: Αποδόσεις διαδοχικών εκχυλίσεων (polar)

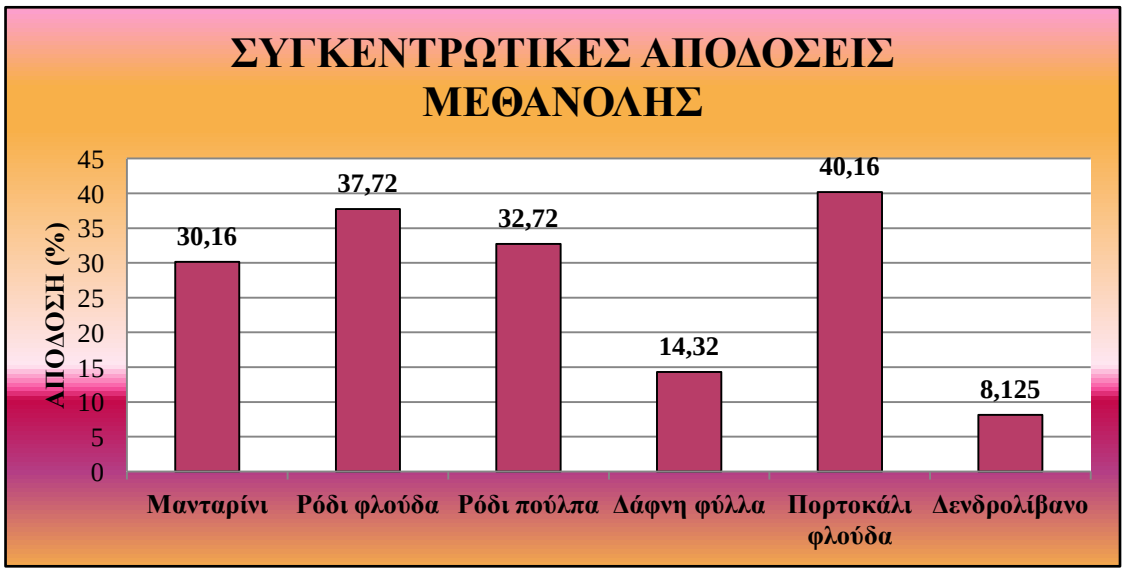
Παρατηρούμε ότι τη μεγαλύτερη απόδοση στο διαλύτη εξάνιο, εμφανίζει η πούλπα του ροδιού με ποσοστό 15%. Αντίστοιχα, στη μεθανόλη, η οποία δεσμεύει τα πολικά μόρια, εκχυλίζονται σε μεγάλο ποσοστό οι φλούδες του πορτοκαλιού και του ροδιού με ποσοστά 40,16 και 37,72 % αντίστοιχα. Στον οξικό αιθυλεστέρα, ο οποίος είναι λιγότερο πολικός διαλύτης από τη μεθανόλη, εκχυλίζεται περισσότερο η φλούδα του ροδιού με ποσοστό 2,44 % και ακολουθεί η δάφνη με 2 %. Στην 1-βουτανόλη εκχυλίζεται περισσότερο η φλούδα του ροδιού (11,76 %) ενώ στο νερό η φλούδα πορτοκαλιού (31,44 %) και μανταρινιού (29,84 %).

Οι αποδόσεις ανά διαλύτη όσον αφορά την ποσότητα εκχυλίσματος παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων:



Διάγραμμα 3.7 Συγκεντρωτικές αποδόσεις εξανίου

Παρατηρούμε ότι στο εξάνιο εκχυλίζεται πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα δείγματα η πούλπα του ροδιού με ποσοστό 15%. Ακολουθεί η φλούδα του πορτοκαλιού (8,32%). Η φλούδα του μανταρινιού και τα φύλλα δάφνης εκχυλίζονται με αρκετά μικρότερη απόδοση (5,72 και 5,64% αντίστοιχα) ενώ ακόμα μικρότερη απόδοση εμφανίζει το δενδρολίβανο με ποσοστό 3,2%. Τέλος, η φλούδα του ροδιού εμφανίζει τη μικρότερη απόδοση (0,6%).



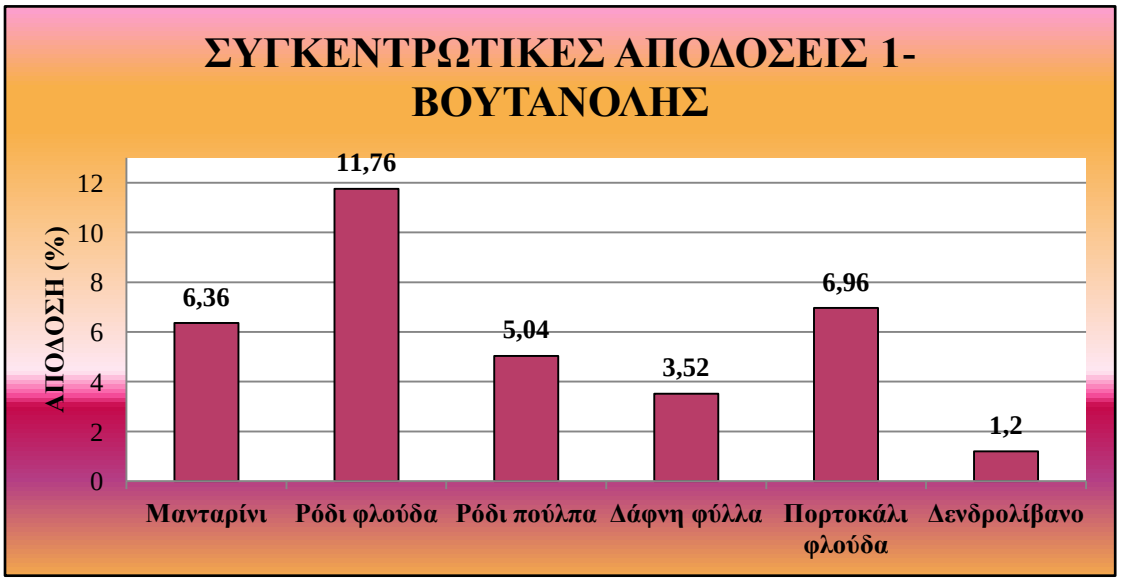
Διάγραμμα 3.8 Συγκεντρωτικές αποδόσεις μεθανόλης

Παρατηρούμε ότι στη μεθανόλη εκχυλίζονται όλα τα δείγματα με μεγάλο ποσοστό εκτός του δενδρολίβανου (8,125%). Τη μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζει η φλούδα του πορτοκαλιού με ποσοστό 40,16%. Ακολουθεί η φλούδα του ροδιού

(37,72%), η πούλπα του ροδιού (32,72%) και η φλούδα του μανταρινιού (30,16%). Τέλος, τα φύλλα της δάφνης εκχυλίζονται με ποσοστό 14,32%. Όλα τα ποσοστά ωστόσο είναι αρκετά υψηλά.

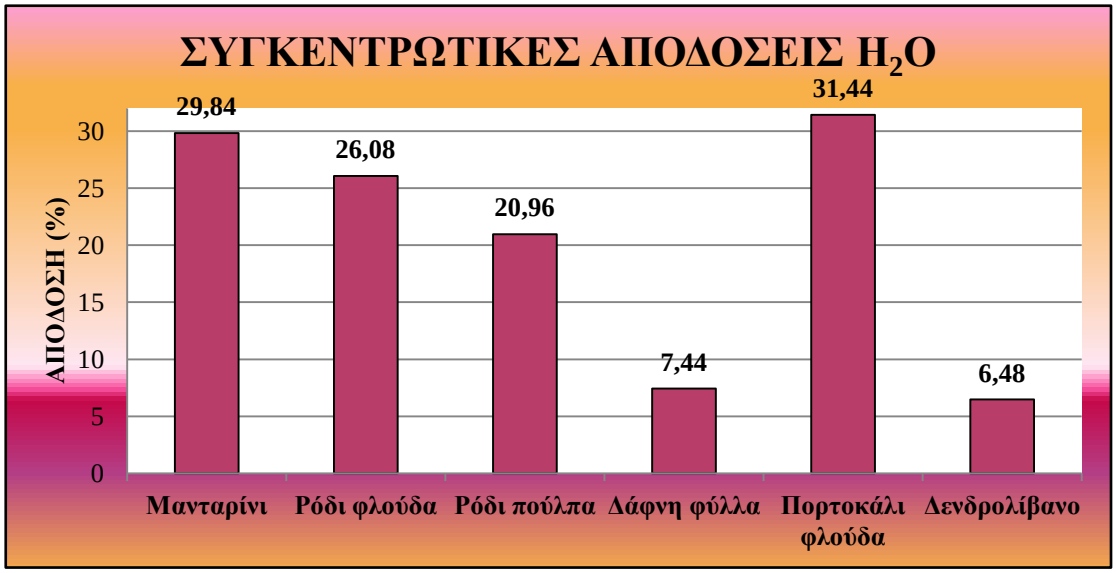
Διάγραμμα 3.9 Συγκεντρωτικές αποδόσεις οξικού αιθυλεστέρα

Παρατηρούμε ότι στον οξικό αιθυλεστέρα εκχυλίζονται πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα δείγματα η φλούδα του ροδιού και τα φύλλα της δάφνης (με ποσοστά 2,44 και 2% αντίστοιχα). Ακολουθούν οι φλούδες του μανταρινιού και του πορτοκαλιού με ποσοστά 1,32 και 1,28% αντίστοιχα. Τέλος, η πούλπα του ροδιού και το δενδρολίβανο εμφανίζουν τη χαμηλότερη απόδοση (0,52 και 0,05% αντίστοιχα). Όλα τα ποσοστά ωστόσο είναι πολύ μικρά.



Διάγραμμα 3.10 Συγκεντρωτικές αποδόσεις 1-βουτανόλης

Παρατηρούμε ότι στην 1-βουτανόλη τη μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζει η φλούδα του ροδιού με ποσοστό 11,76%. Ακολουθούν οι φλούδες του πορτοκαλιού και του μανταρινιού με ποσοστά 6,96 και 6,36% αντίστοιχα. Η πούλπα του ροδιού (5,04%) και τα φύλλα δάφνης (3,52%) εμφανίζουν ακόμα μικρότερες αποδόσεις. Τέλος, το δενδρολίβανο εκχυλίζεται με ποσοστό μόλις 1,2%, πολύ μικρότερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα.



Διάγραμμα 3.11 Συγκεντρωτικές αποδόσεις H_2O

Παρατηρούμε ότι στο νερό εκχυλίζονται όλα τα δείγματα με αρκετά μεγάλο ποσοστό εκτός του δενδρολίβανου (8,125%) και της δάφνης (7,44%). Τη μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζει η φλούδα του πορτοκαλιού με ποσοστό 31,44%. Ακολουθούν η φλούδα του μανταρινιού (29,84%), η φλούδα του ροδιού (26,08%) και η πούλπα του ροδιού (20,96%). Όλα τα ποσοστά ωστόσο είναι υψηλά.

3.3.2 Εκχύλιση με μικροκύματα

3.3.2.1 *Υλικά*

Για τις εκχυλίσεις με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα (νωπά) δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους -30 ºC, τα οποία είχαν αφεθεί έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό.

3.3.2.2 *Εξοπλισμός*

Τα πειράματα των εκχυλίσεων με μικροκύματα πραγματοποιήθηκαν στο Οριζόντιο εργαστήριο του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, ενώ η απομάκρυνση του νερού πραγματοποιήθηκε με ξήρανση με κατάψυξη στο εργαστήριο Σχεδιασμού

και Ανάλυσης Διεργασιών της Σχολής Χημικών Μηχανικών. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

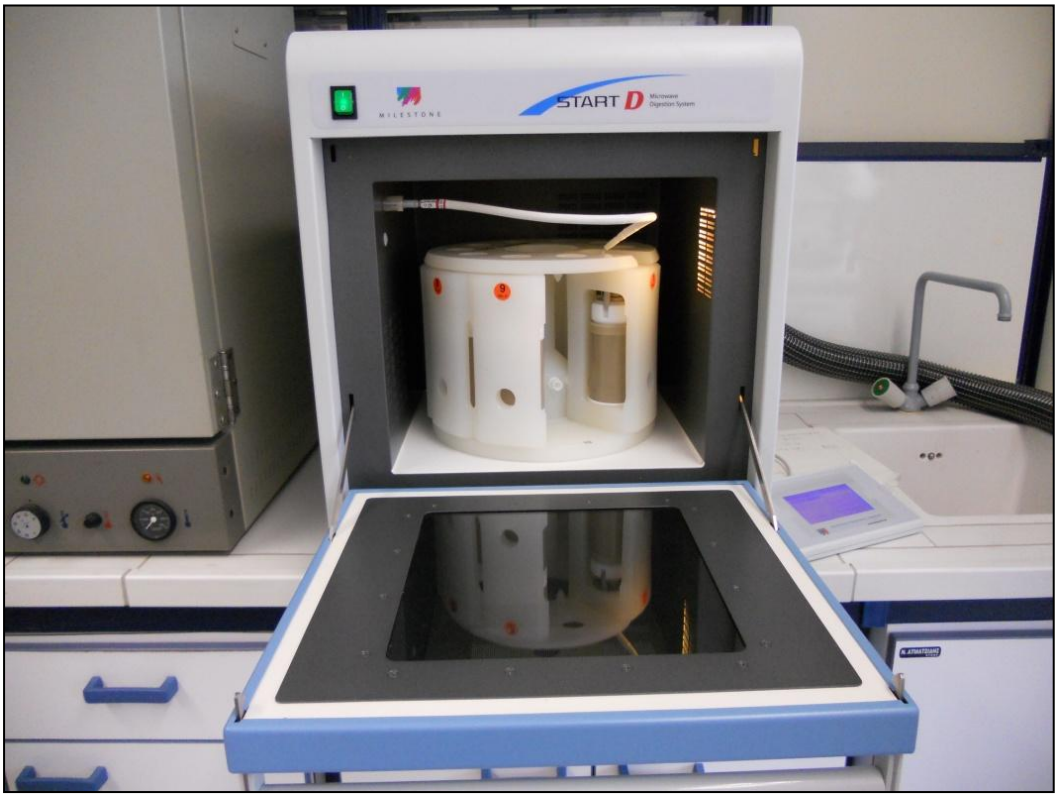
- Microwave (Digestion System, Start D, Milestone)
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Μονάδα ξήρανσης με κατάψυξη (Leybold – Heraeus GT 2A, Koln, Germany)

3.3.2.3 *Διαδικασία εκχύλισης*

Ζυγίστηκε περίπου 1 g φρέσκων (νωπών) δειγμάτων, τα οποία κόπηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν με 10 ml απιονισμένου νερού σε ειδικό δοχείο εκχύλισης του επιστημονικού φούρνου μικροκυμάτων. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στους 55 ºC και σε ισχύ 400 Watt με διάρκεια 2 h. Η διάρκεια αυτή αποτελούνταν από τρία στάδια:

1. Προθέρμανση στους 55 ºC για 5 min
2. Διατήρηση στους 55 ºC για 85 min
3. Εξαερισμός ώστε τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min

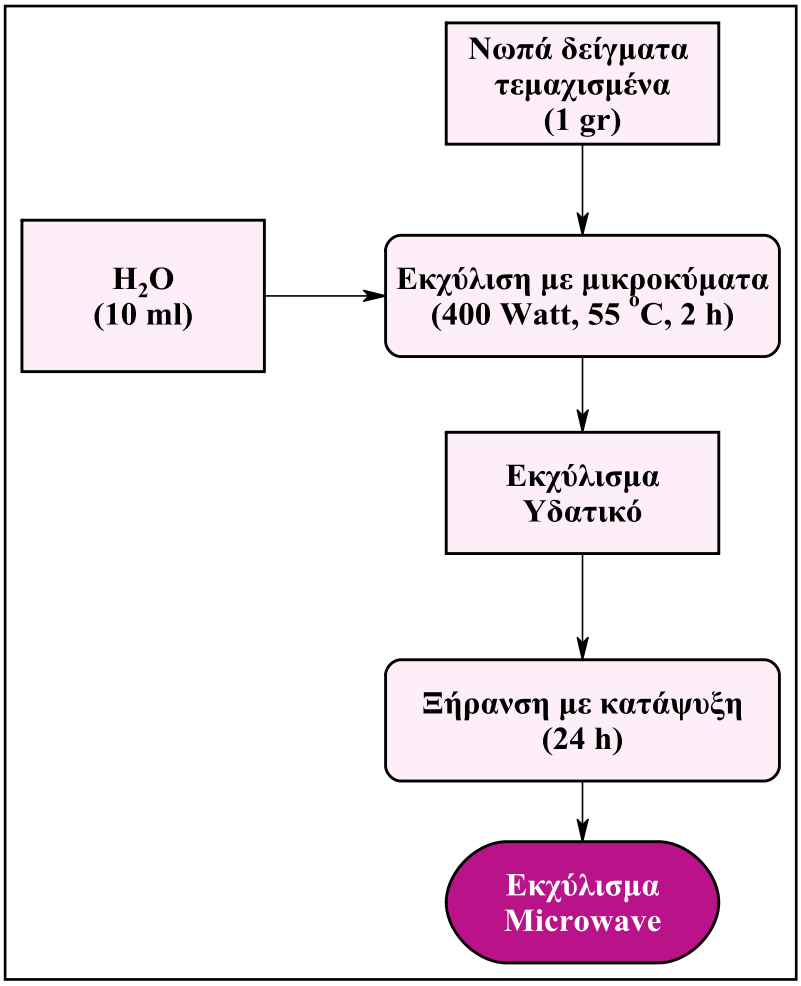
Μετά το πέρας της εκχύλισης τα δείγματα διηθήθηκαν και το εκχύλισμα του νερού τοποθετήθηκε σε περιέκτες στην κατάψυξη στους -30 ºC και ακολούθησε ξήρανση με κατάψυξη για 24 h, για την παραλαβή του καθαρού εκχυλίσματος, χωρίς να υπάρχει αλλοίωση των συστατικών του.



Εικόνα 3.9: Εκχύλιση με μικροκύματα

3.3.2.4 *Διάγραμμα ροής*

Το διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:



Σχήμα 3.2 Διάγραμμα ροής εκχύλισης με μικροκύματα (microwave)

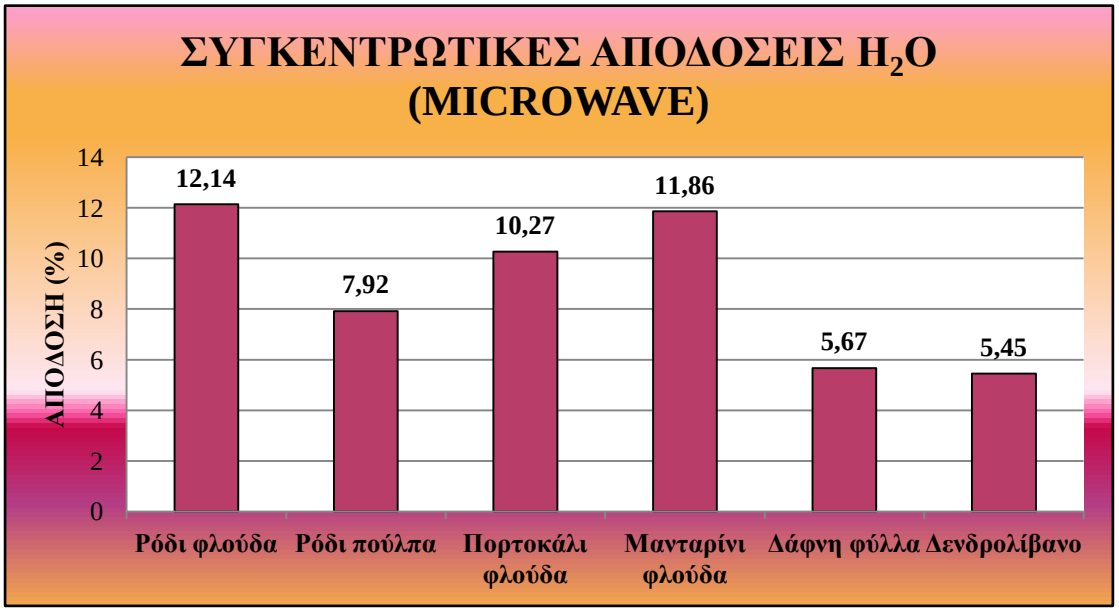
3.3.2.5 *Αποτελέσματα εκχύλισης με μικροκύματα*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η απόδοση της εκχύλισης με μικροκύματα για κάθε δείγμα:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΔΟΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ	
Δείγμα	**Απόδοση (%)**
Ρόδι φλούδα	12,14
Ρόδι πούλπα	7,92
Πορτοκάλι φλούδα	10,27
Μανταρίνι φλούδα	11,86
Δάφνη φύλλα	5,67
Δενδρολίβανο	5,45

Πίνακας 3.5: Αποδόσεις εκχυλίσεων με μικροκύματα (microwave)

Οι αποδόσεις όσον αφορά την ποσότητα εκχυλίσματος παρουσιάζονται σε μορφή διαγράμματος:



Διάγραμμα 3.12: Συγκεντρωτικές αποδόσεις H_2O (microwave)

Παρατηρούμε ότι μέσω εκχύλισης με μικροκύματα στο H_2O εκχυλίζονται περισσότερο η φλούδα του ροδιού και η φλούδα του μανταρινιού με ποσοστά 12,14 και 11,86 % αντίστοιχα. Γενικά, η απόδοση του συγκεκριμένου τρόπου εκχύλισης είναι σχετικά χαμηλή και απαιτεί διαδικασία βελτιστοποίησης των συνθηκών (θερμοκρασία, ισχύς μικροκυμάτων, χρόνος εκχύλισης, όγκος διαλύτη).

3.3.3 Εκχύλιση με υπερήχους

3.3.3.1 *Υλικά*

Για τις εκχυλίσεις με υπερήχους χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα (νωπά) δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους -30 ºC, τα οποία αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν:

- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη (CH_3CH_2OH)

3.3.3.2 *Εξοπλισμός*

Τα πειράματα των εκχυλίσεων με υπερήχους και για τους δύο διαλύτες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Για την απομάκρυνση του νερού πραγματοποιήθηκε ξήρανση με κατάψυξη στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Λουτρό υπερήχων
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Μονάδα ξήρανσης με κατάψυξη (Leybold – Heraeus GT 2A, Koln, Germany)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Αντλία εξάτμισης

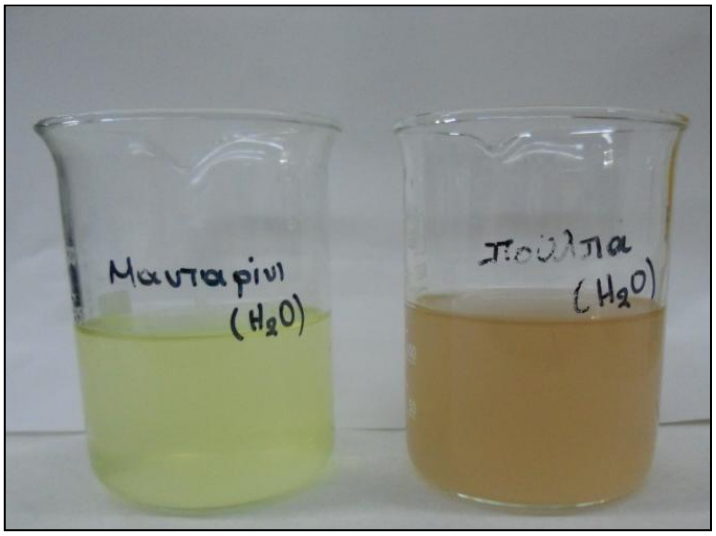
3.3.3.3 *Διαδικασία εκχύλισης*

Ζυγίστηκαν περίπου 5 g φρέσκων (νωπών) δειγμάτων, τα οποία κόπηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν με 150 ml του κάθε διαλύτη σε σφαιρικές φιάλες με πώμα. Οι φιάλες αυτές τοποθετήθηκαν στον λουτρό υπερήχων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 180 min στα 40 MHz. Κάθε 60 min γινόταν αλλαγή του νερού στο λουτρό ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία κοντά στους 25 ºC.

Μετά το πέρας της εκχύλισης τα δείγματα διηθήθηκαν και έγινε απομάκρυνση των διαλυτών. Το νερό απομακρύνθηκε με ξήρανση με κατάψυξη για 24 h, ενώ η αιθανόλη (CH_3CH_2OH) με εξάτμιση στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες εικόνες από την πειραματική διαδικασία:

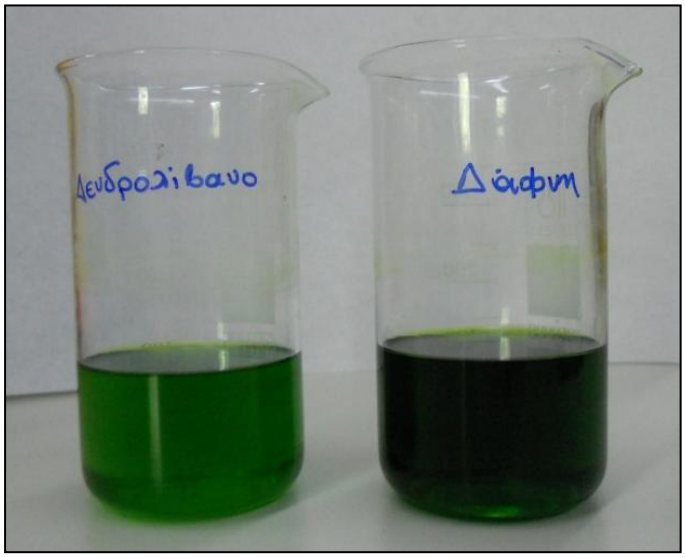
Εικόνα 3.10: Εκχύλιση με υπερήχους



Εικόνα 3.11: Φλούδα μανταρινιού και πούλπα ροδιού μετά το πέρας της εκχύλισης με υπερήχους με H_2O

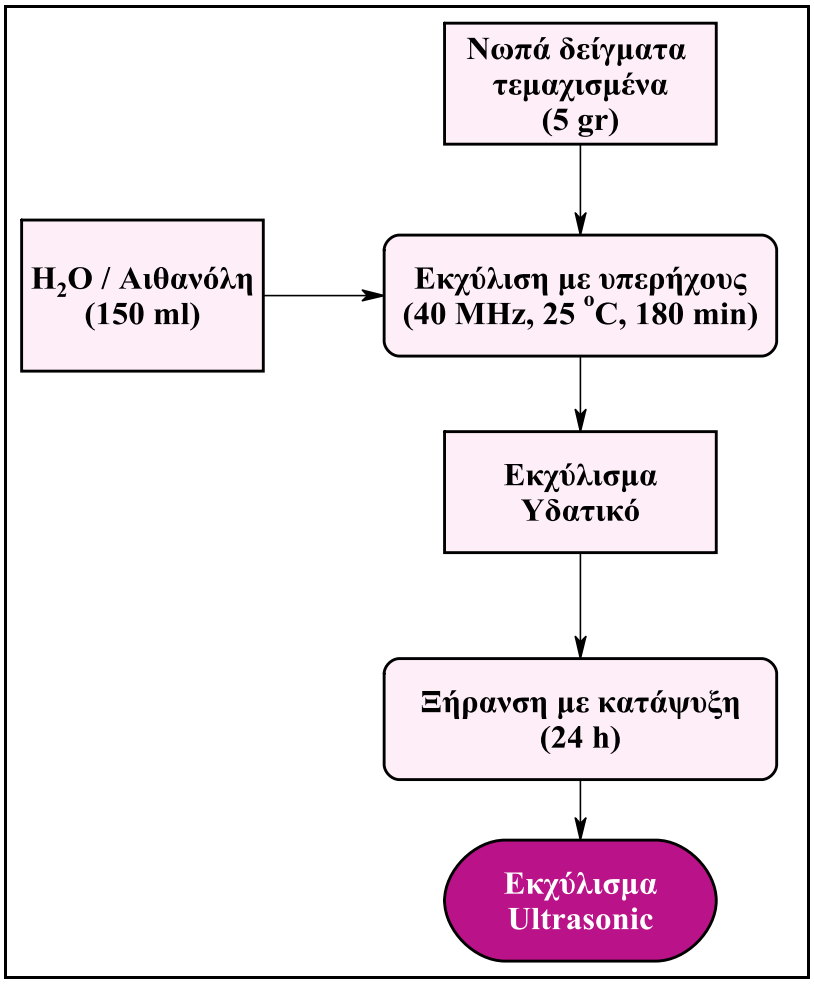
Εικόνα 3.12 Φλούδα μανταρινιού μετά το πέρας της εκχύλισης με υπερήχους με αιθανόλη

Εικόνα 3.13 Φλούδα ροδιού μετά το πέρας της εκύλισης με υπερήχους με αιθανόλη



Εικόνα 3.14 Δενδρολίβανο και φύλλα δάφνης μετά το πέρας της εκχύλισης με υπερήχους με αιθανόλη

3.3.3.4 *Διάγραμμα ροής*



Σχήμα 3.3: Διάγραμμα ροής εκχύλισης με υπερήχους (ultrasonic)

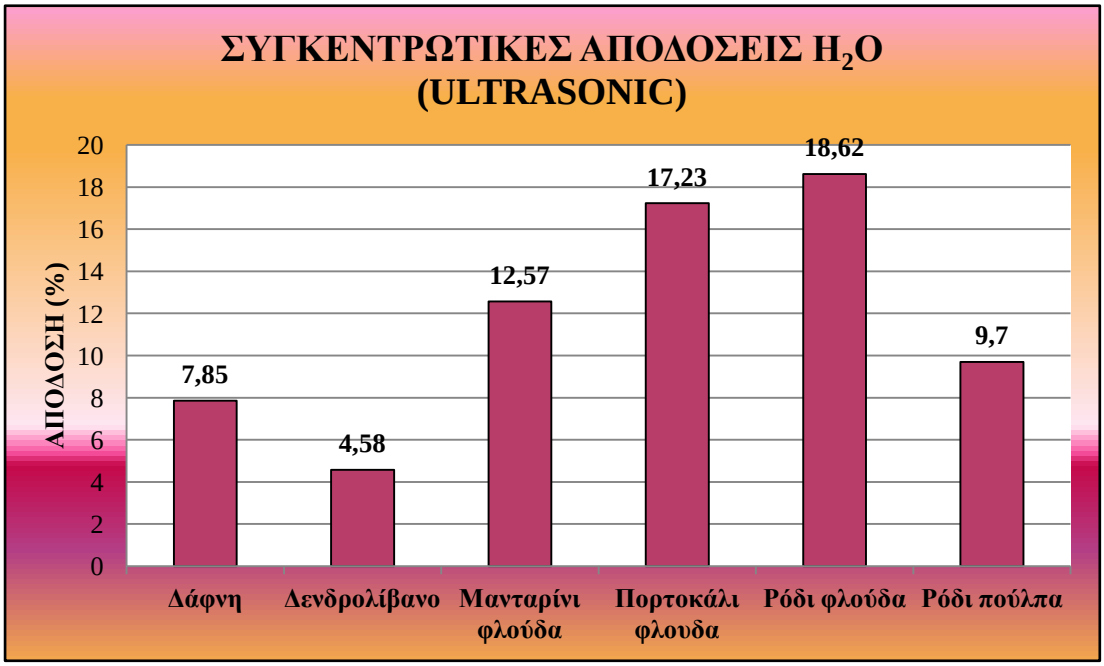
3.3.3.5 *Αποτελέσματα εκχύλισης με υπερήχους*

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις των εκχυλίσεων με υπερήχους των δύο διαλυτών για κάθε δείγμα:

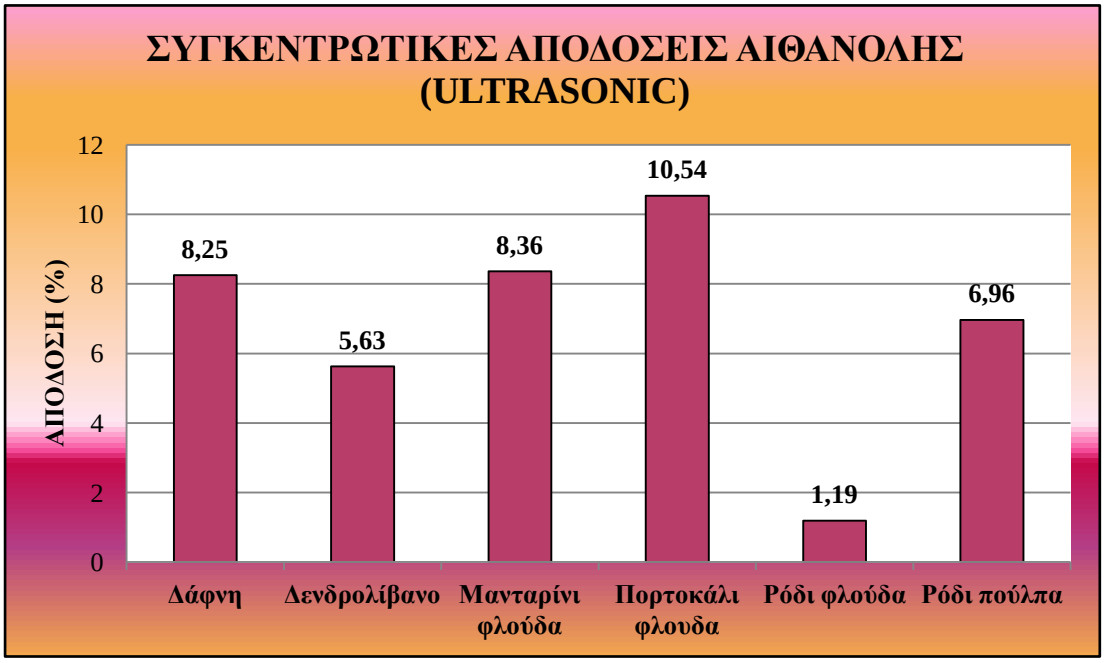
ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΔΟΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ		
Δείγμα	**Νερό (%)**	**Αιθανόλη (%)**
Ρόδι φλούδα	18,62	1,19
Ρόδι πούλπα	9,70	6,96
Πορτοκάλι φλούδα	17,23	10,54
Μανταρίνι φλούδα	12,57	8,36
Δάφνη φύλλα	7,85	8,25
Δενδρολίβανο	4,58	5,63

Πίνακας 3.6 Αποδόσεις εκχυλίσεων με υπερήχους (ultrasonic)

Οι αποδόσεις ανά διαλύτη όσον αφορά την ποσότητα εκχυλίσματος παρουσιάζονται σε μορφή διαγραμμάτων:



Διάγραμμα 3.13: Συγκεντρωτικές αποδόσεις H_2O (ultrasonic)



Διάγραμμα 3.14 Συγκεντρωτικές αποδόσεις αιθανόλης (ultrasonic)

Παρατηρούμε ότι στην αιθανόλη, εκχυλίζεται περισσότερο η φλούδα του πορτοκαλιού με ποσοστό 10,54%. Σχεδόν στο ίδιο ποσοστό εκχυλίζονται τα φύλλα δάφνης και η φλούδα του μανταρινιού (8,25 και 8,36% αντίστοιχα), ενώ πολύ μικρή

απόδοση παρουσιάζει η φλούδα του ροδιού (1,19%). Στο H_2O εκχυλίζονται περισσότερο η φλούδα του ροδιού με ποσοστό 18,62% και η φλούδα του πορτοκαλιού με 17,23%.

3.3.4 Απόσταξη με υδρατμούς (Clevenger)

3.3.4.1 *Υλικά*

Για την απόσταξη με υδρατμούς (Clevenger) χρησιμοποιήθηκαν φρέσκες (νωπές) φλούδες μανταρινιού που ήταν αποθηκευμένες στους -30 ºC, οι οποίες αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η απόσταξη έγινε με απιονισμένο νερό.

3.3.4.2 *Εξοπλισμός*

Τα πειράματα της απόσταξης με υδρατμούς (Clevenger) της φλούδας του μανταρινιού πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger

3.3.4.3 *Διαδικασία απόσταξης με υδρατμούς - Αποτελέσματα*

Ζυγίστηκαν περίπου 100 g φρέσκων (νωπών) φλούδων μανταρινιού , οι οποίες κόπηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν με 200 ml απιονισμένου νερού σε σφαιρική φιάλη η οποία συνδέθηκε με τη συσκευή Clevenger όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.15. Η απόσταξη διήρκησε 2 h.

Μετά το πέρας της απόσταξης οι φλούδες του μανταρινιού διηθήθηκαν και έγινε απομόνωση του αιθέριου ελαίου με πιπέτα καθώς αποτελούσε διαφορετική φάση από του νερού. (Εικόνα 3.16)

Το καθαρό βάρος του αιθέριου ελαίου είναι 0,14 gr. Αυτό σημαίνει ότι η απόδοση της απόσταξης με υδρατμούς είναι **0,14%**. Να σημειωθεί ωστόσο ότι το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά και για μόνο ένα από τα μελετούμενα είδη, καθώς η συσκευή Clevenger καταστράφηκε και δεν ήταν δυνατή η άμεση αποκατάστασή της ώστε να συνεχιστούν τα πειράματα.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες εικόνες από την πειραματική διαδικασία:

Εικόνα 3.15 Συσκευή Clevenger

Εικόνα 3.16 Αιθέριο έλαιο μανταρινιού πριν την απομόνωσή του

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

3.4.1 Ποιοτικός προσδιορισμός TLC

3.4.1.1 *Υλικά*

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο TLC εξετάστηκαν όλα τα εκχυλίσματα που είχαν παραχθεί με τις τρείς διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης που μελετήθηκαν παραπάνω διαλυμένα σε μεθανόλη.

Στο θάλαμο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες:

- Διχλωρομεθάνιο για τα εκχυλίσματα του εξανίου
- Μεθανόλη για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα

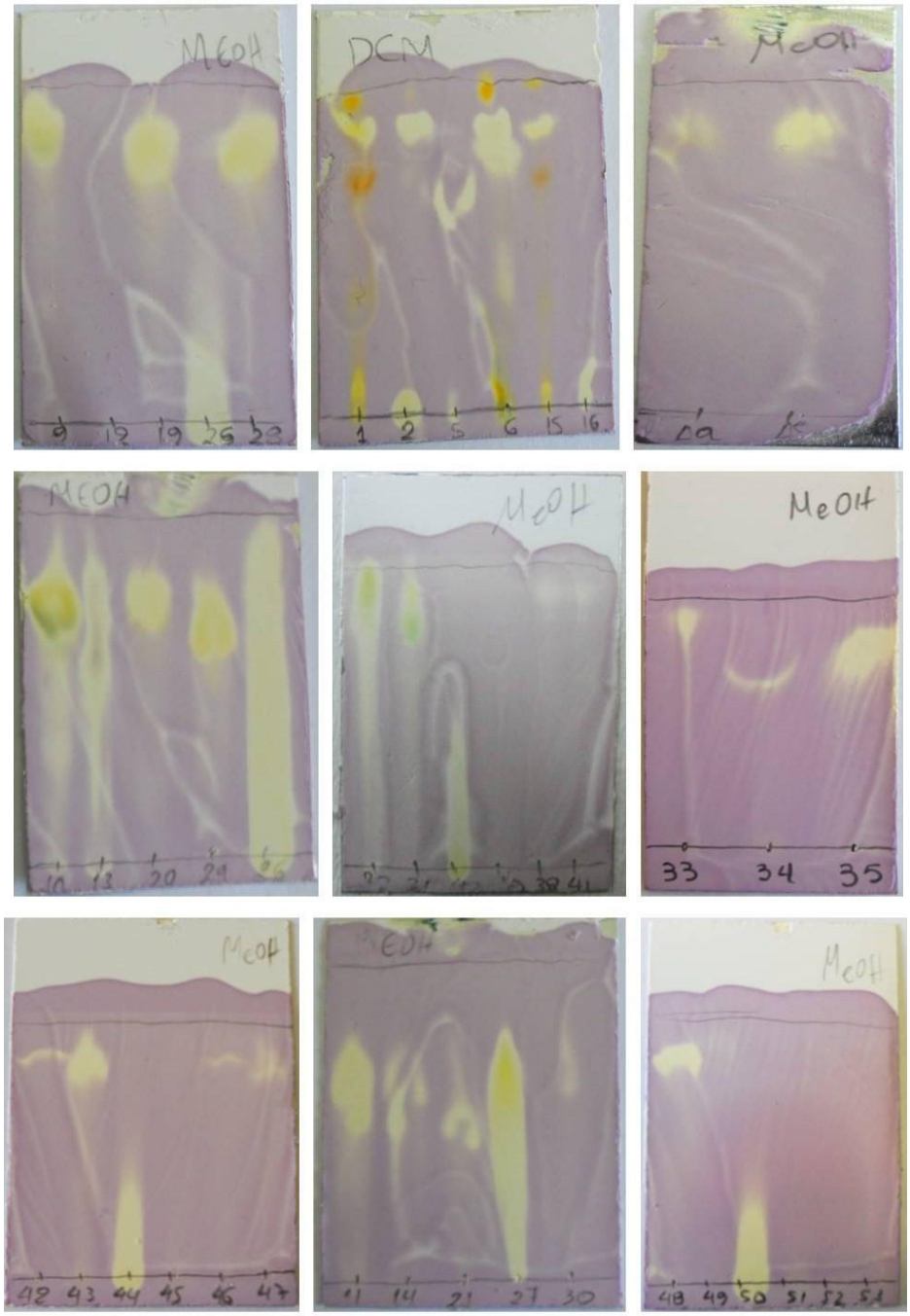
Για την ποιοτική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων έγινε ψεκασμός με διάλυμα μεθανόλης – DPPH συγκέντρωσης 0,3 mg/ml. Η ταχύτητα με την οποία η κηλίδα αποκτά κίτρινο χρώμα (αποχρωματισμός DPPH) αποτελεί ένδειξη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.

3.4.1.2 *Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο TLC*

Τα διαλύματα των υπό εξέταση δειγμάτων τοποθετήθηκαν υπό τη μορφή κηλίδων στην αρχή της ειδικής πλάκας (silica) σε απόσταση περίπου 1 cm μεταξύ

τους. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετήθηκε όρθια εντός του αεροστεγούς θαλάμου με 10 ml του κατάλληλου διαλύτη. Ο διαλύτης αφέθηκε να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων έως ότου το μέτωπό του φθάσει περίπου 2 cm πριν το τέλος της πλάκας. Η πλάκα στη συνέχεια αποσύρθηκε από το θάλαμο και αφέθηκε να στεγνώσει. Η παρατήρηση των κηλίδων έγινε σε θάλαμο υπεριώδους φωτός (UV) και στη συνέχεια η πλάκα ψεκάστηκε με το διάλυμα μεθανόλης - DPPH και παρατηρήθηκε ο αποχρωματισμός. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μορφή πινάκων για τα εκχυλίσματα της κάθε μεθόδου, τα οποία κατατάχθηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ένταση του αποχρωματισμού του διαλύματος DPPH.

Οι χρωματογραφίες από τις οποίες δημιουργήθηκαν οι πίνακες των αποτελεσμάτων είναι οι εξής:



Εικόνα 3.17 Χρωματογραφίες TLC

3.4.1.3 *Αποτελέσματα TLC*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου TLC σε μορφή πινάκων για την κάθε μέθοδο εκχύλισης. Στους παρακάτω πίνακες ο πολύ έντονος αποχρωματισμός του DPPH αντιστοιχεί σε έντονη δράση, ο ελάχιστος αποχρωματισμός σε ελάχιστη δράση ενώ η ενδιάμεση κατάσταση σε μέτρια αντιοξειδωτική δράση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ TLC					
ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΕΩΝ					
Κωδικός	**Δείγμα**	**Διαλύτης**	**Έντονη δράση**	**Μέτρια δράση**	**Ελάχιστη δράση**
1	Μανταρίνι φλούδα	Εξάνιο (C_6H_{14})			✓
2	Ρόδι φλούδα			✓	
5	Ρόδι πούλπα			✓	
6	Δάφνη φύλλα			✓	
15	Πορτοκάλι φλούδα			✓	
16	Δενδρολίβανο			✓	
28	Μανταρίνι φλούδα	Οξικός αιθυλεστέρας ($C_4H_8O_2$)	✓		
25	Ρόδι φλούδα		✓		
12	Ρόδι πούλπα				✓
9	Δάφνη φύλλα		✓		
19	Πορτοκάλι φλούδα		✓		
33	Δενδρολίβανο				✓
29	Μανταρίνι φλούδα	1-Βουτανόλη (C_4H_9OH)	✓		
26	Ρόδι φλούδα		✓		
13	Ρόδι πούλπα			✓	
10	Δάφνη φύλλα		✓		
20	Πορτοκάλι φλούδα		✓		
34	Δενδρολίβανο				✓
30	Μανταρίνι φλούδα	Νερό (H_2O)			✓
27	Ρόδι φλούδα		✓		
14	Ρόδι πούλπα				✓
11	Δάφνη φύλλα		✓		
21	Πορτοκάλι φλούδα				✓
35	Δενδρολίβανο			✓	

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα TLC για τις διαδοχικές εκχυλίσεις

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ TLC					
ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ					
Κωδικός	**Δείγμα**	**Διαλύτης**	**Έντονη δράση**	**Μέτρια δράση**	**Ελάχιστη δράση**
38	Μανταρίνι φλούδα	Αιθανόλη (C_2H_5OH)			✓
40	Ρόδι φλούδα		✓		
39	Ρόδι πούλπα				✓
31	Δάφνη φύλλα			✓	
41	Πορτοκάλι φλούδα				✓
32	Δενδρολίβανο		✓		
46	Μανταρίνι φλούδα	Νερό (H_2O)			✓
44	Ρόδι φλούδα		✓		
45	Ρόδι πούλπα				✓
43	Δάφνη φύλλα			✓	
47	Πορτοκάλι φλούδα				✓
42	Δενδρολίβανο				✓

Πίνακας 3.8 Αποτελέσματα TLC για την εκχύλιση με υπερήχους (ultrasonic)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ TLC				
ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ				
Κωδικός	**Δείγμα**	**Έντονη δράση**	**Μέτρια δράση**	**Ελάχιστη δράση**
52	Μανταρίνι φλούδα			✓
50	Ρόδι φλούδα	✓		
51	Ρόδι πούλπα			✓
49	Δάφνη φύλλα			✓
53	Πορτοκάλι φλούδα			✓
48	Δενδρολίβανο		✓	

Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα TLC για την εκχύλιση με μικροκύματα (microwave)

3.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DPPH

3.4.2.1 *Υλικά*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH εξετάστηκαν όλα τα εκχυλίσματα που παρουσίαζαν με τη μέθοδο TLC έντονη αντιοξειδωτική δράση με εξαίρεση το δείγμα του πορτοκαλιού, καθώς είναι ήδη αρκετά μελετημένο στη βιβλιογραφία. Εξετάστηκε επίσης και το εκχύλισμα της φλούδας του ροδιού των διαδοχικών εκχυλίσεων με διαλύτη εξάνιο, παρ' ότι παρουσίαζε μέτρια δράση από τον ποιοτικό έλεγχο, προκειμένου να είναι πλήρης η μελέτη όλων των παραληφθέντων εκχυλισμάτων της φλούδας του ροδιού. Τέλος, εξετάστηκε και το εκχύλισμα της πούλπας του ροδιού από τις διαδοχικές εκχυλίσεις

με διαλύτη νερό, παρ' ότι στον ποιοτικό έλεγχο με TLC φαινόταν ότι παρουσίαζε ελάχιστη δράση, προκειμένου να ελεγχθεί η σχέση μεταξύ ποιοτικής εκτίμησης και ποσοτικού προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης με τη φωτομετρική μέθοδο. Όλα τα εκχυλίσματα ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται παρακάτω.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεθανόλης – DPPH συγκέντρωσης 0,03 mg/ml.

3.4.2.2 *Εξοπλισμός*

Η δημιουργία των αντίστοιχων αραιώσεων των δειγμάτων που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών, ενώ η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης σε υπεριώδες φως έγινε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Ζυγός ακριβείας (Kern ABS/ABJ, Balingen, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου

3.4.2.3 *Διαδικασία προσδιορισμού με τη μέθοδο DPPH*

Τα δείγματα που παρουσίαζαν ενδιαφέρον σύμφωνα με την ποιοτική μέθοδο TLC, στα οποία έγινε μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας είναι 14. Πιο συγκεκριμένα:

- Όλα τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού (εξανίου, οξικού αιθυλεστέρα, 1-βουτανόλης, H_2O, αιθανόλης, H_2O (ultrasonic) και H_2O (microwave))
- Το εκχύλισμα της πούλπας του ροδιού με H_2O
- Τα εκχυλίσματα της φλούδας του μανταρινιού με οξικό αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλη
- Τα εκχυλίσματα των φύλλων της δάφνης με οξικό αιθυλεστέρα, 1-βουτανόλη και H_2O
- Το εκχύλισμα του δενδρολίβανου με αιθανόλη

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε αντίδραση του εκάστοτε εκχυλίσματος με διάλυμα DPPH – μεθανόλης περιεκτικότητας 0,03 mg/ml. Το διάλυμα αυτό παρασκευαζόταν κάθε φορά λίγο πριν την ανάμειξη με τα εκχυλίσματα έτσι ώστε να αποφευχθούν σφάλματα λόγω του αυθόρμητου αποχρωματισμού του DPPH. Ως μέτρο σύγκρισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης *AE* ο οποίος ορίζεται ως το αντίστροφο του EC_{50}, της ποσότητας δηλαδή του εκχυλίσματος που είναι απαραίτητη για την μείωση στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης του DPPH. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη η τιμή του AE τόσο πιο έντονη είναι η αντιοξειδωτική δράση. (Aikaterini Termentzi et al., 2006)

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (515 nm) όπου η απορρόφηση ελαττωνόταν με την πάροδο της αντίδρασης. Για την αντιστοίχηση των απορροφήσεων αυτών με συγκεντρώσεις (mg/ml) ήταν απαραίτητη η δημιουργία μιας καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 3.15) (Aikaterini Termentzi et al., 2006). Προκειμένου να δημιουργηθεί αυτή η καμπύλη των πέντε σημείων, μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο τέσσερις διαφορετικές γνωστές συγκεντρώσεις διαλύματος DPPH-Μεθανόλης και ένα τυφλό δείγμα μόνο με μεθανόλη. (Πίνακας 3.10)

Για τον υπολογισμό του EC_{50}, χρησιμοποιήθηκαν τρείς αραιώσεις (σημεία) με μεθανόλη, του εκάστοτε εκχυλίσματος. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις μετατράπηκαν μέσω της καμπύλης αναφοράς σε συγκεντρώσεις (Διαγράμματα 3.16 έως 3.29) και υπολογίστηκε το EC_{50}. Οι αραιώσεις των δειγμάτων επιλέχθηκαν ώστε τα 3 σημεία να απέχουν σημαντικά μεταξύ τους για να είναι όσο το δυνατόν πιο σωστή η ευθεία. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.11.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία αυτή καθ' αυτή, για τη δημιουργία των αραιώσεων, αφού ζυγίστηκε η αντίστοιχη ποσότητα για κάθε εκχύλισμα σε δοκιμαστικό σωλήνα, προστέθηκε μεθανόλη. Στη συνέχεια, 0,1 ml του διαλύματος της εκάστοτε συγκέντρωσης προστέθηκαν σε 3,9 ml διαλύματος DPPH σε μεθανόλη συγκέντρωσης 0,03 mg/ml σε ειδική κυψελίδα (πλαστική) και ανακινήθηκαν καλά. Η πρώτη μέτρηση έγινε τη στιγμή της ανάμειξης του διαλύματος DPPH με το δείγμα (0 min), η δεύτερη μετά από 5 min και οι υπόλοιπες μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε 10 min έως τα 60 min.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ DPPH ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	
Συγκέντρωση (mg/ml)	**Απορρόφηση**
0 (τυφλό δείγμα μεθανόλης)	0,001
0,0075	0,242
0,015	0,519
0,0225	0,746
0,03	1,045

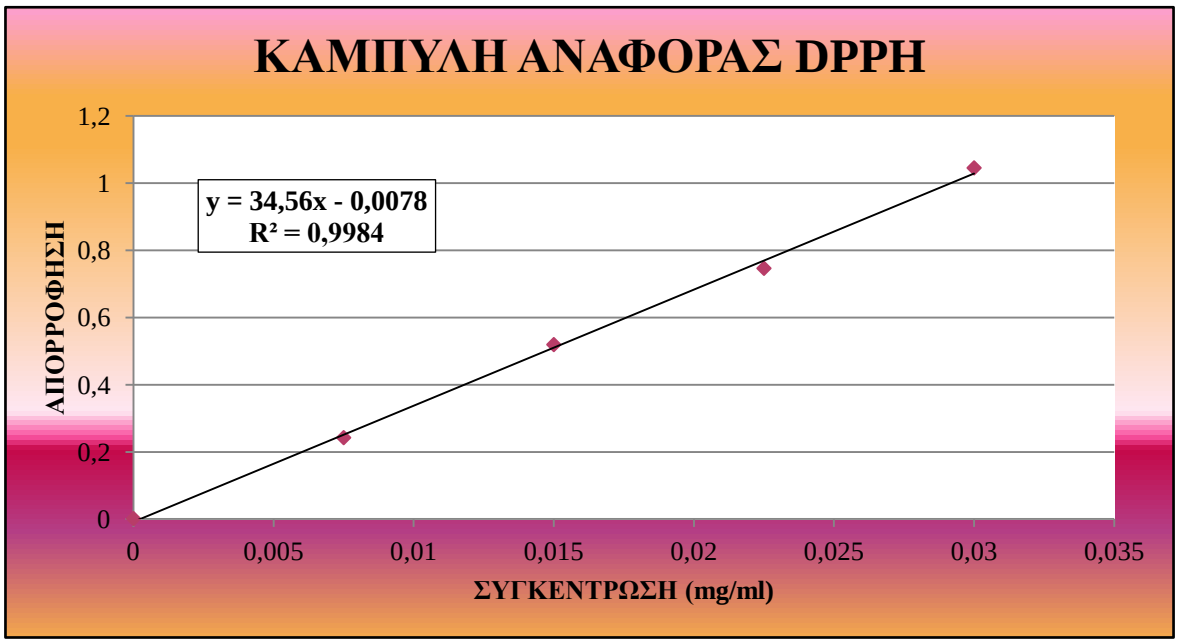
Πίνακας 3.10 Συγκεντρώσεις διαλύματος DPPH για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ				
Κωδικός	**Δείγμα**	**Διαλύτης**	**Α/Α**	**Συγκέντρωση (mg/ml)**
ΣΣ2	Φλούδα ροδιού	Εξάνιο	1	1,5
			2	3,0
			3	3,4
ΣΣ25	Φλούδα ροδιού	Οξικός αιθυλεστέρας	1	0,175
			2	0,0875
			3	0,04375
ΣΣ26	Φλούδα ροδιού	1-Βουτανόλη	1	0,35
			2	0,175
			3	0,0875
ΣΣ27	Φλούδα ροδιού	H_2O	1	0,37
			2	0,17
			3	0,085
ΣΣ40	Φλούδα ροδιού	Αιθανόλη (ultrasonic)	1	0,3
			2	0,115
			3	0,046
ΣΣ44	Φλούδα ροδιού	H_2O (ultrasonic)	1	0,25
			2	0,125
			3	0,05
ΣΣ50	Φλούδα ροδιού	H_2O (microwave)	1	0,5
			2	0,25
			3	0,125
			4	0,05
ΣΣ14	Πούλπα ροδιού	H_2O	1	250
			2	125
			3	50
ΣΣ28	Φλούδα μανταρινιού	Οξικός αιθυλεστέρας	1	4
			2	3
			3	1,8
ΣΣ29	Φλούδα μανταρινιού	1-Βουτανόλη	1	5,2
			2	3,4
			3	1,7
ΣΣ9	Φύλλα δάφνης	Οξικός αιθυλεστέρας	1	2,6
			2	1,95
			3	1,3
ΣΣ10	Φύλλα δάφνης	1-Βουτανόλη	1	2,5
			2	1,25
			3	0,625
ΣΣ11	Φύλλα δάφνης	H_2O	1	1,6
			2	2,5
			3	1,25
ΣΣ32	Δενδρολίβανο	Αιθανόλη (ultrasonic)	1	2
			2	1,75
			3	0,875

Πίνακας 3.11 Επιλεγμένες αραιώσεις εκχυλισμάτων

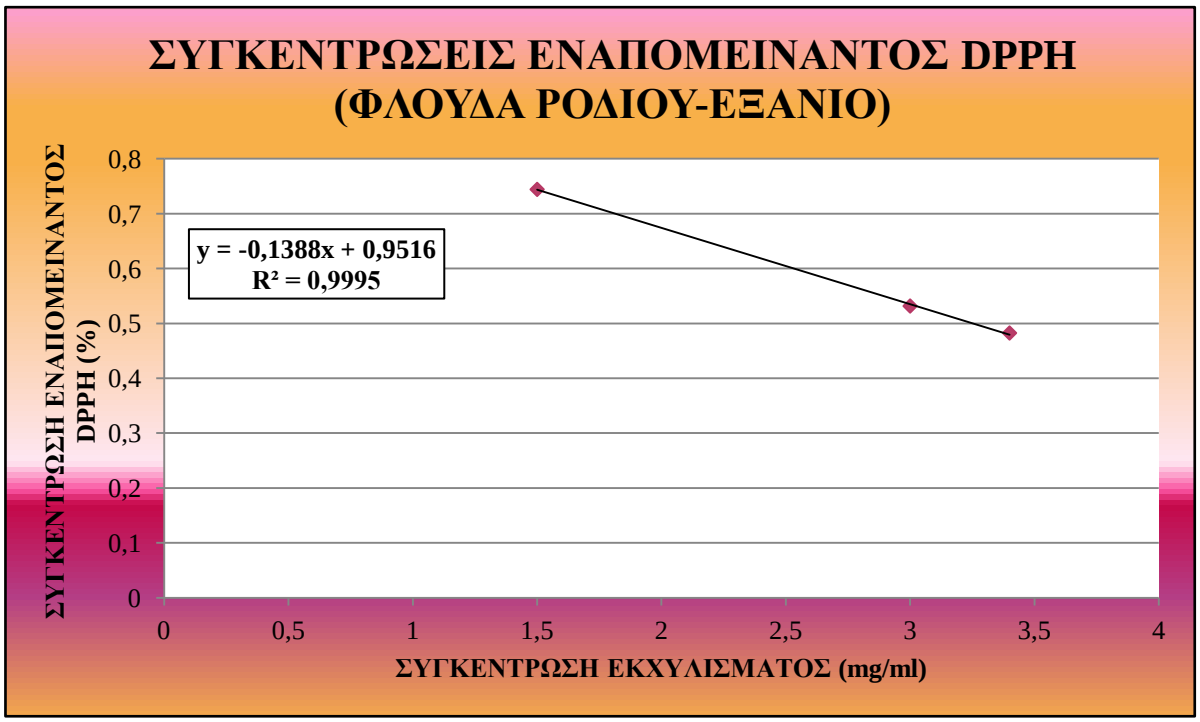
3.4.2.4 *Αποτελέσματα DPPH*

Η καμπύλη αναφοράς του DPPH, με βάση την οποία έγινε η αντιστοίχηση των απορροφήσεων σε συγκεντρώσεις είναι:

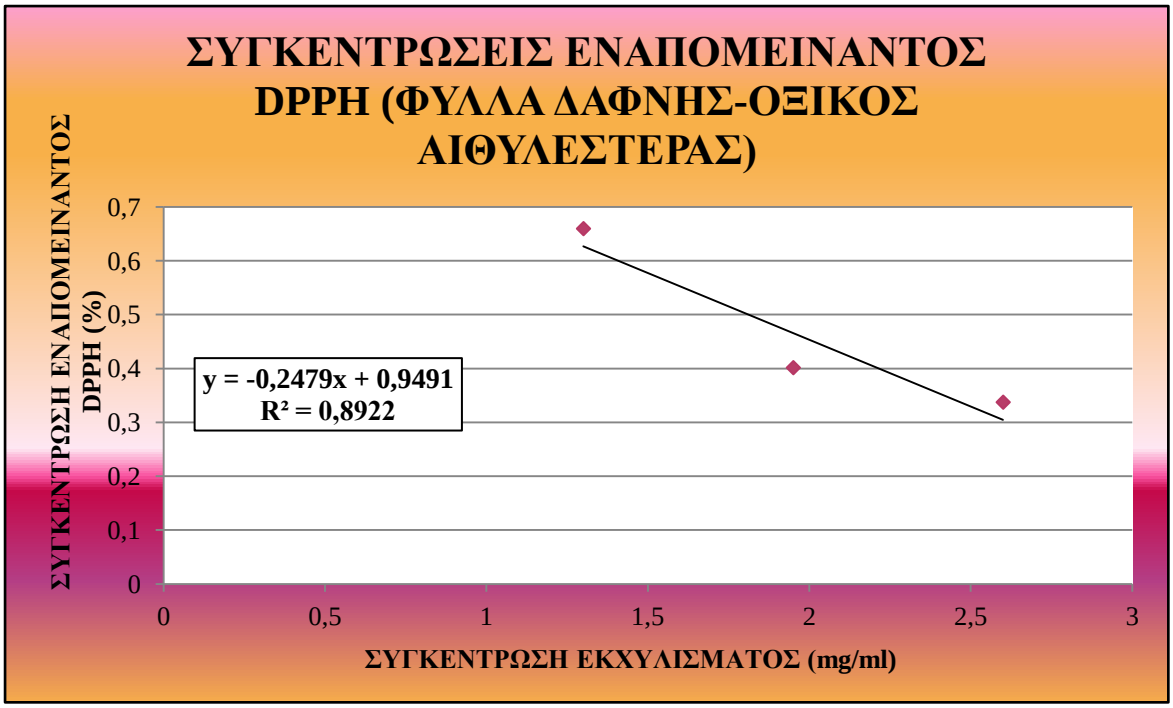


Διάγραμμα 3.15 Καμπύλη αναφοράς DPPH

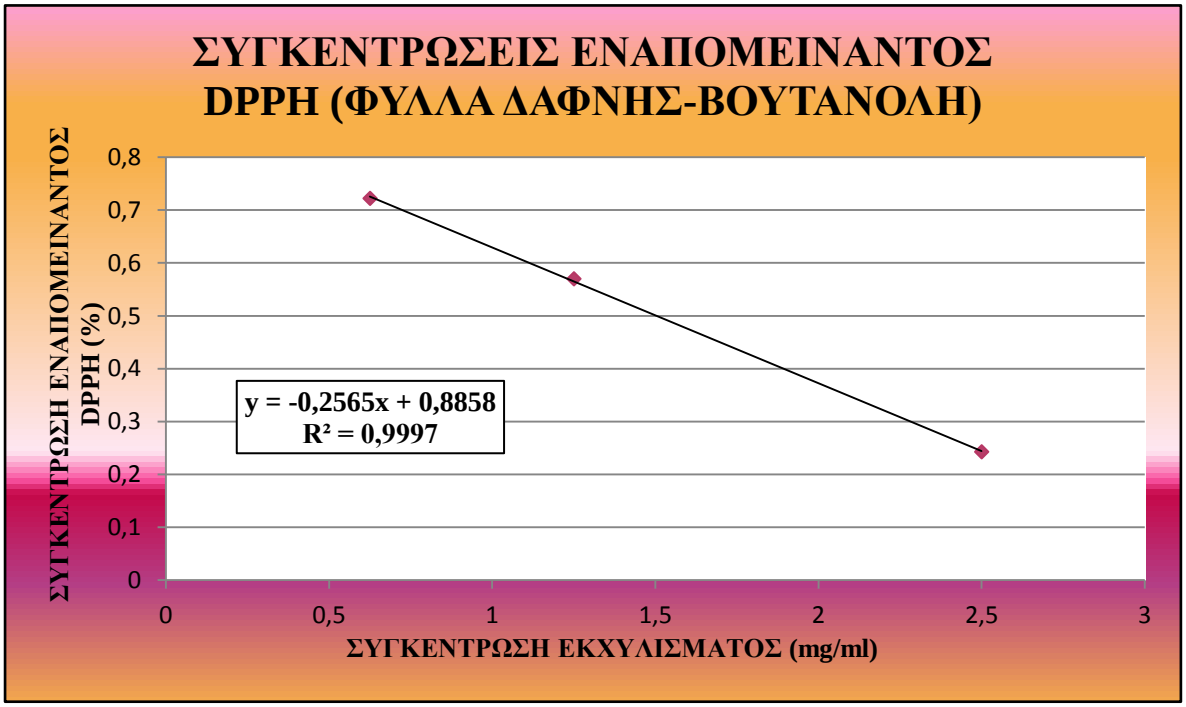
Οι συγκεντρώσεις του εναπομείναντος DPPH για κάθε δείγμα δίνονται παρακάτω:



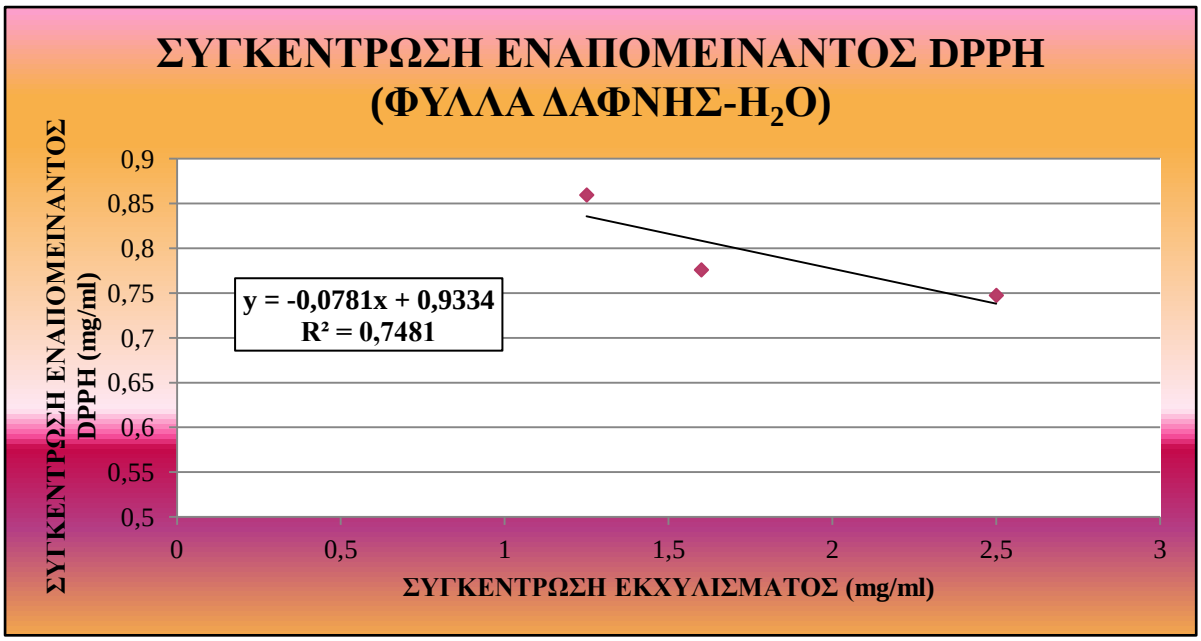
Διάγραμμα 3.16 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη εξάνιο



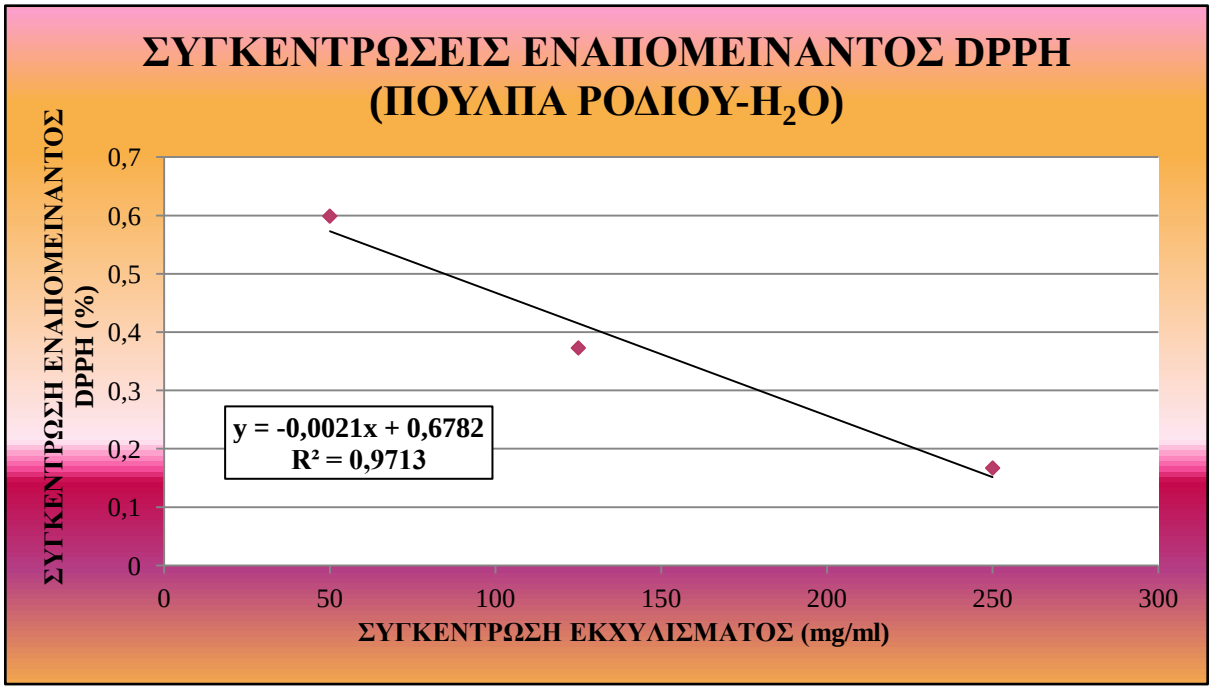
Διάγραμμα 3.17 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φύλλων δάφνης με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα



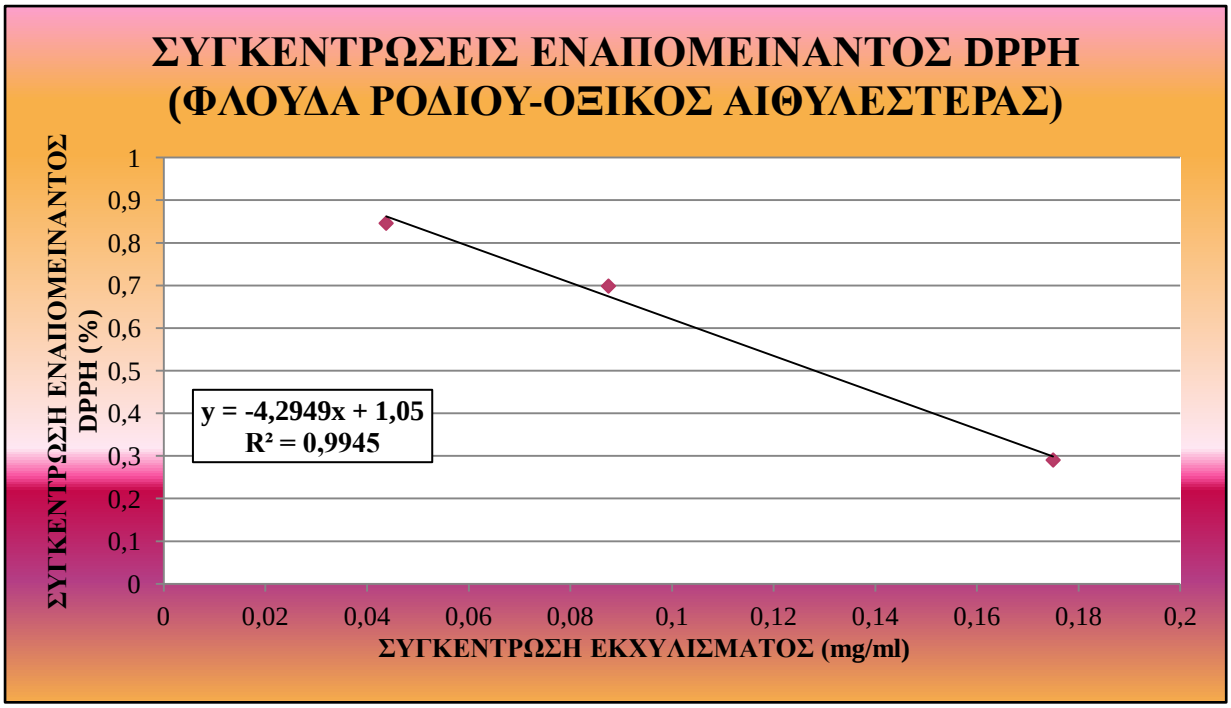
Διάγραμμα 3.18 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φύλλων δάφνης με διαλύτη 1-βουτανόλη



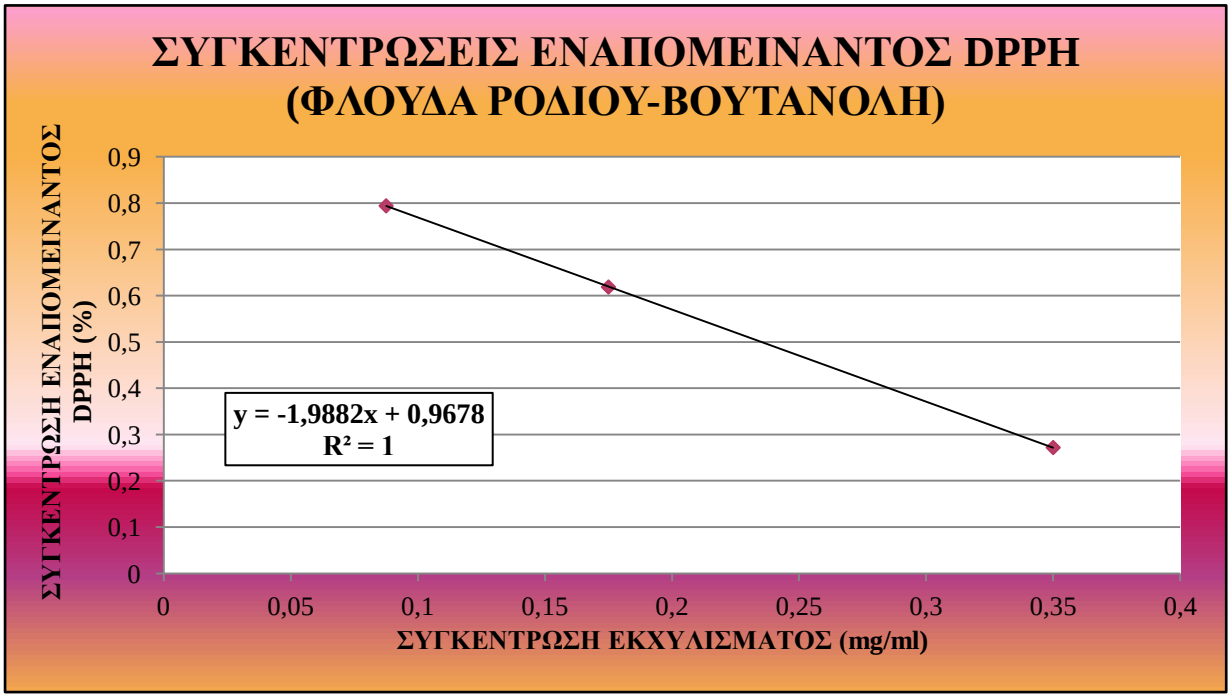
Διάγραμμα 3.19 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φύλλων δάφνης με διαλύτη H_2O



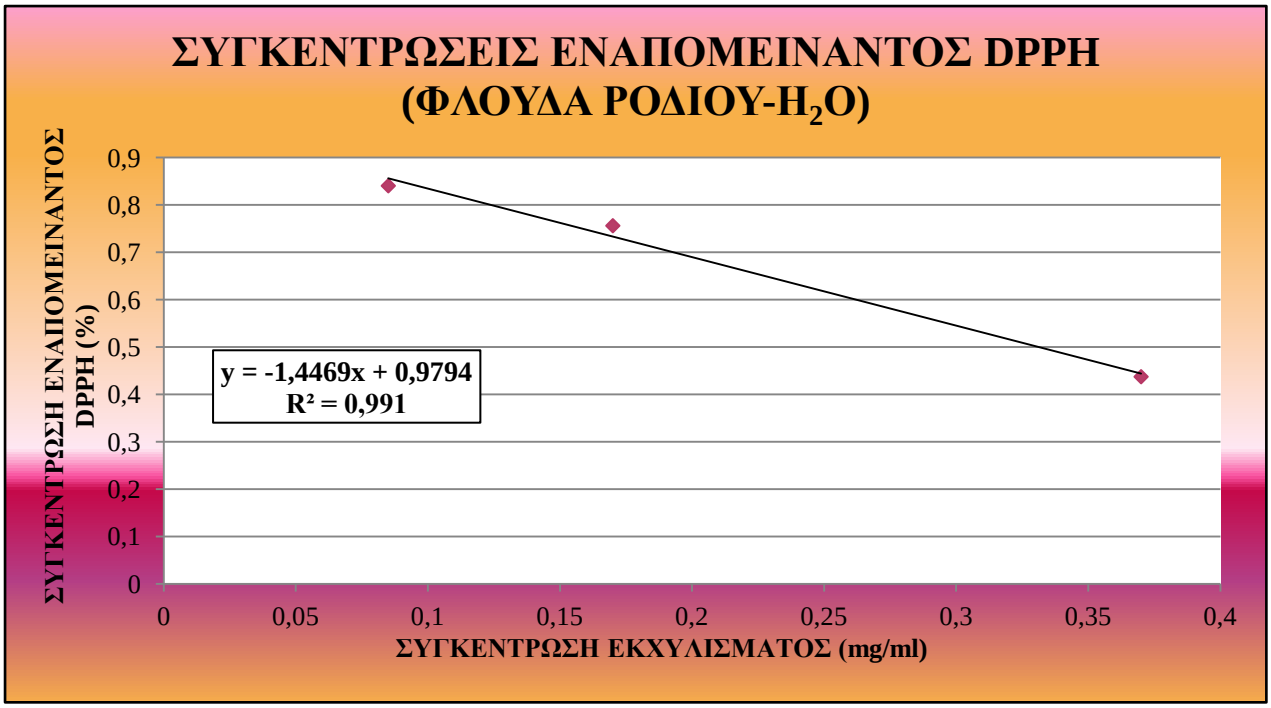
Διάγραμμα 3.20 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα πούπλας ροδιού με διαλύτη H_2O



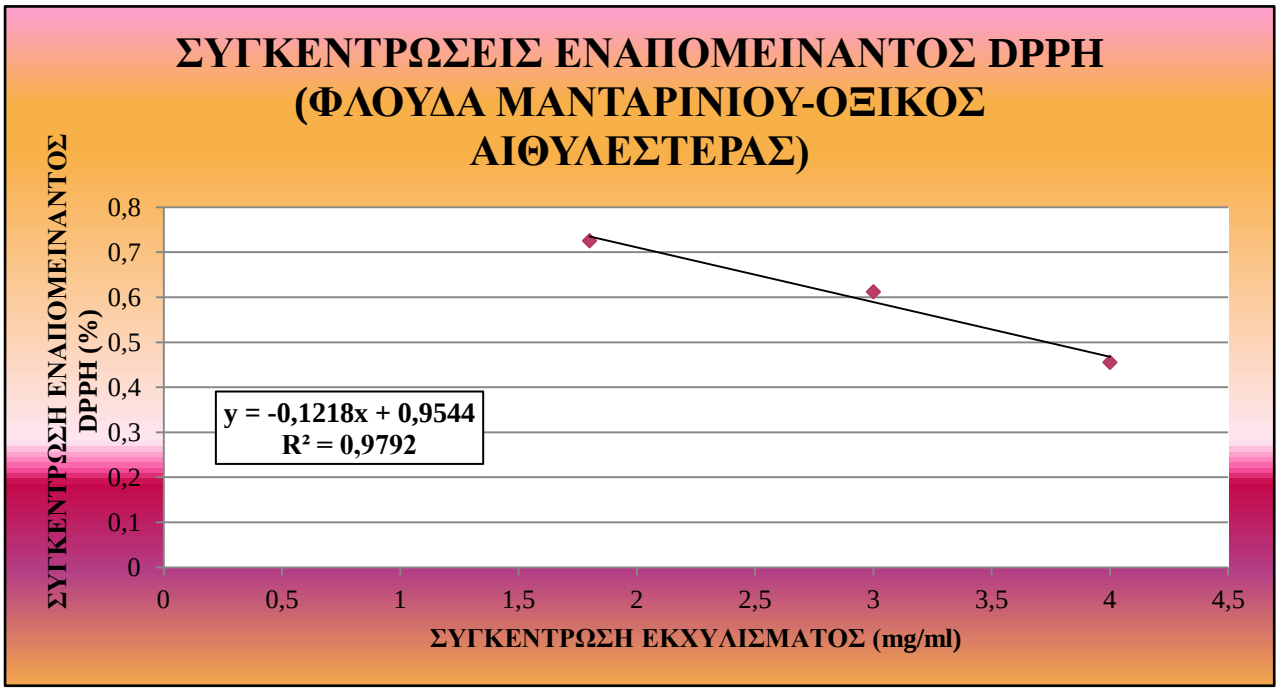
Διάγραμμα 3.21 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα



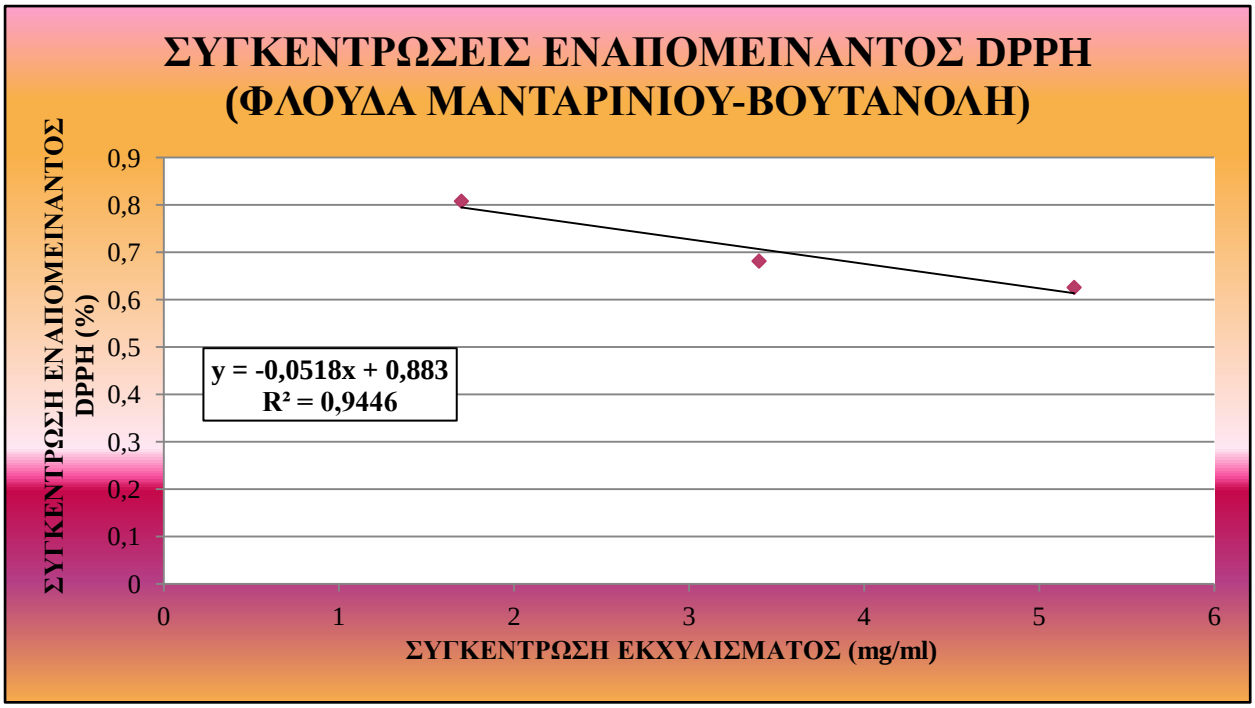
Διάγραμμα 3.22 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη 1-βουτανόλη



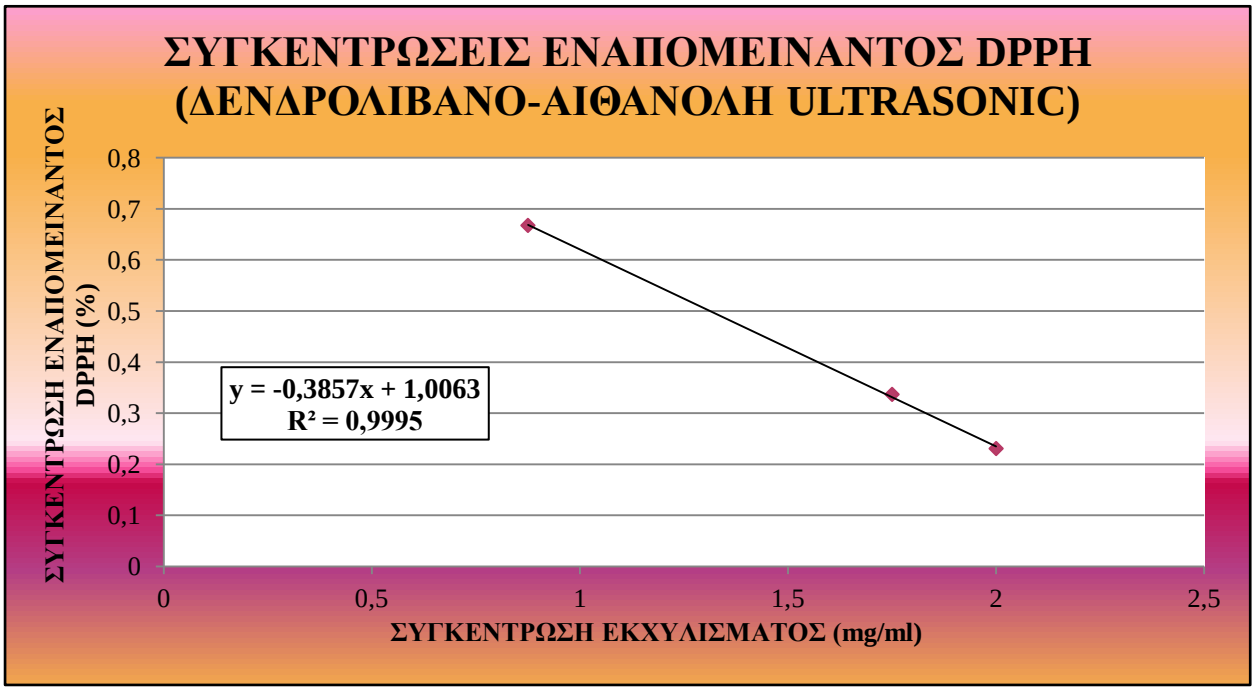
Διάγραμμα 3.23 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη H_2O



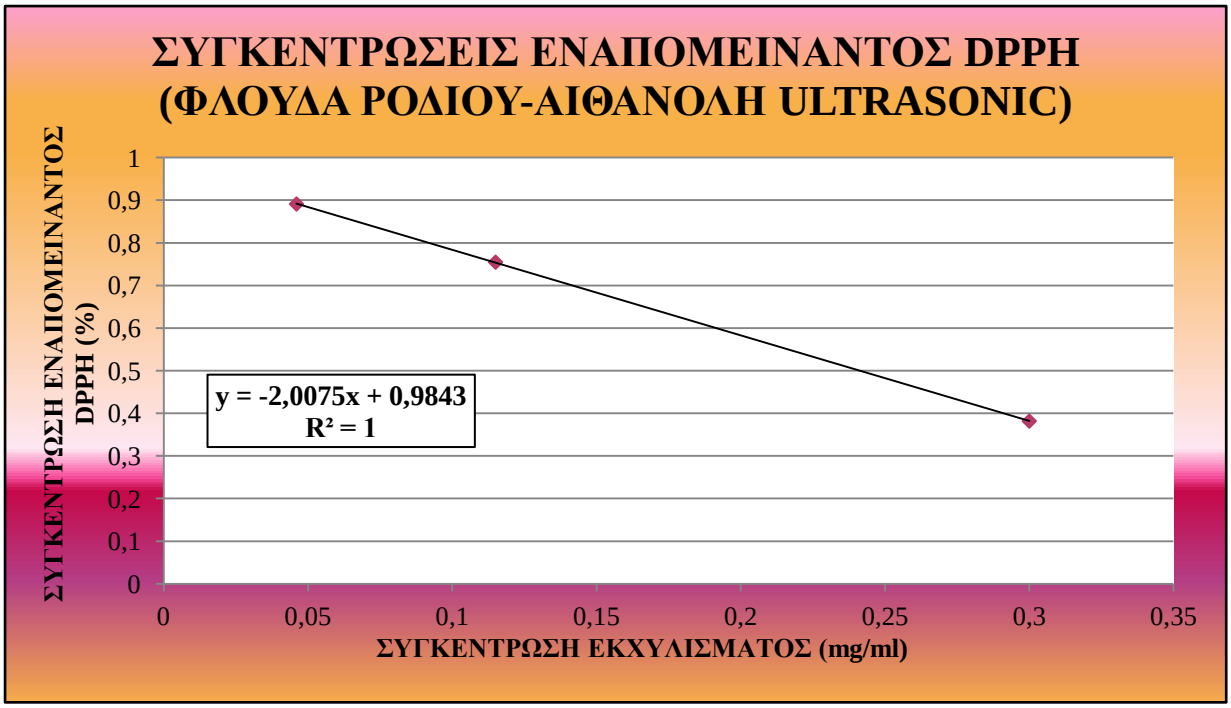
Διάγραμμα 3.24 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας μανταρινιού με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα



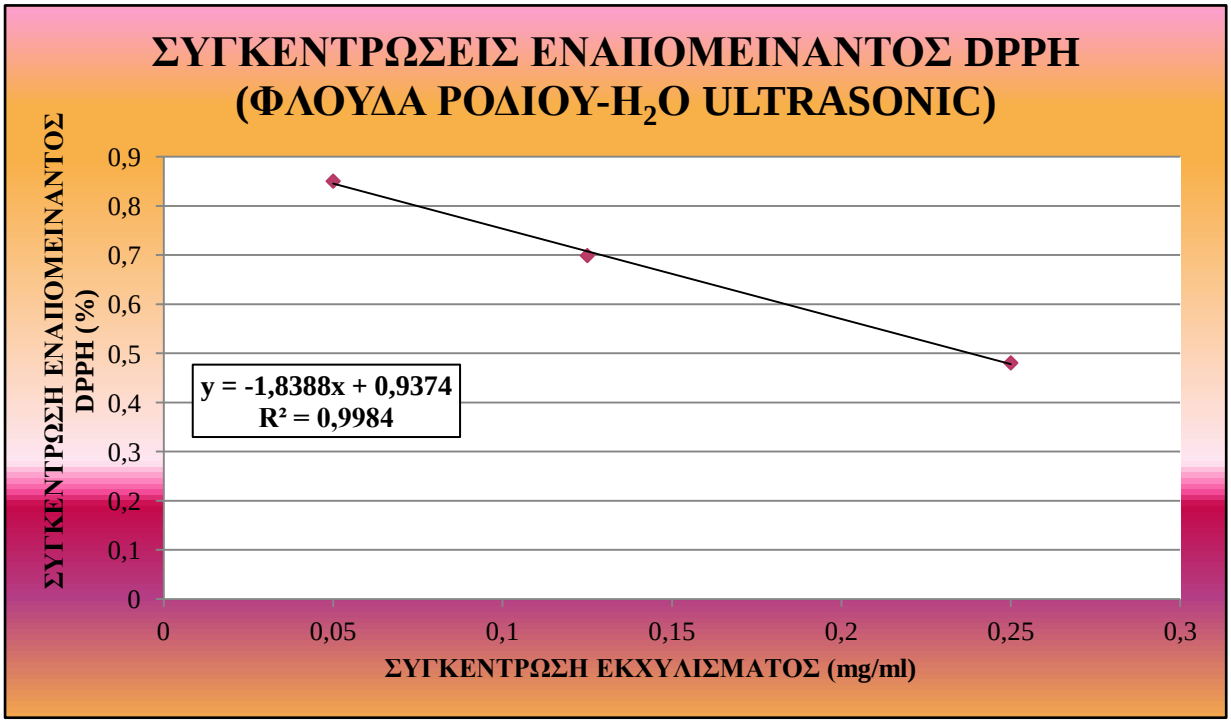
Διάγραμμα 3.25 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας μανταρινιού με διαλύτη 1-βουτανόλη



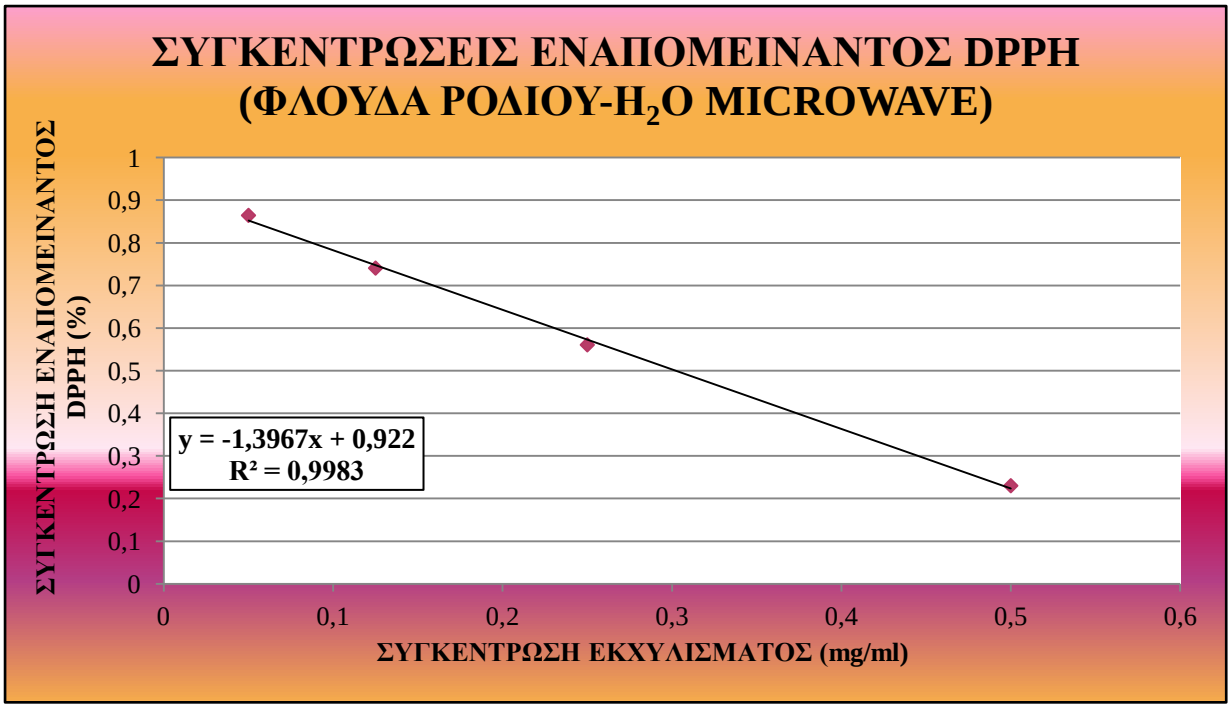
Διάγραμμα 3.26 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα δενδρολίβανου με διαλύτη αιθανόλη μέσω εκχύλισης με υπερήχους



Διάγραμμα 3.27 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη αιθανόλη μέσω εκχύλισης με υπερήχους



Διάγραμμα 3.28 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη H_2O μέσω εκχύλισης με υπερήχους



Διάγραμμα 3.29 Συγκεντρώσεις εναπομείναντος DPPH για το εκχύλισμα φλούδας ροδιού με διαλύτη H_2O μέσω εκχύλισης με μικροκύματα

Από τα παραπάνω διαγράμματα και σύμφωνα με τις εκάστοτε εξισώσεις προέκυψαν οι EC_{50} και *AE* για συγκέντρωση εναπομείναντος DPPH 50%.

Παρακάτω φαίνονται οι EC_{50} και *AE* σε μορφή πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ EC_{50} ΚΑΙ ΑΕ				
Κωδικός	**Δείγμα**	**Διαλύτης**	**EC_{50}**	**ΑΕ**
ΣΣ2	Φλούδα ροδιού	Εξάνιο	3,2536	0,3074
ΣΣ25	Φλούδα ροδιού	Οξικός αιθυλεστέρας	0,1281	7,8089
ΣΣ26	Φλούδα ροδιού	1-Βουτανόλη	0,2353	4,2501
ΣΣ27	Φλούδα ροδιού	H_2O	0,3313	3,0181
ΣΣ40	Φλούδα ροδιού	Αιθανόλη	0,2412	4,1452
ΣΣ44	Φλούδα ροδιού	H_2O (ultrasonic)	0,2379	4,2039
ΣΣ50	Φλούδα ροδιού	H_2O (microwave)	0,3021	3,3097
ΣΣ14	Πούλπα ροδιού	H_2O	84,8571	0,0118
ΣΣ28	Μανταρίνι φλούδα	Οξικός αιθυλεστέρας	3,7307	0,2680
ΣΣ29	Μανταρίνι φλούδα	1-Βουτανόλη	7,3938	0,1352
ΣΣ9	Φύλλα δάφνης	Οξικός αιθυλεστέρας	1,8116	0,5520
ΣΣ10	Φύλλα δάφνης	1-Βουτανόλη	1,5041	0,6649
ΣΣ11	Φύλλα δάφνης	H_2O	5,5493	0,1802
ΣΣ32	Δενδρολίβανο	Αιθανόλη	1,3127	0,7618

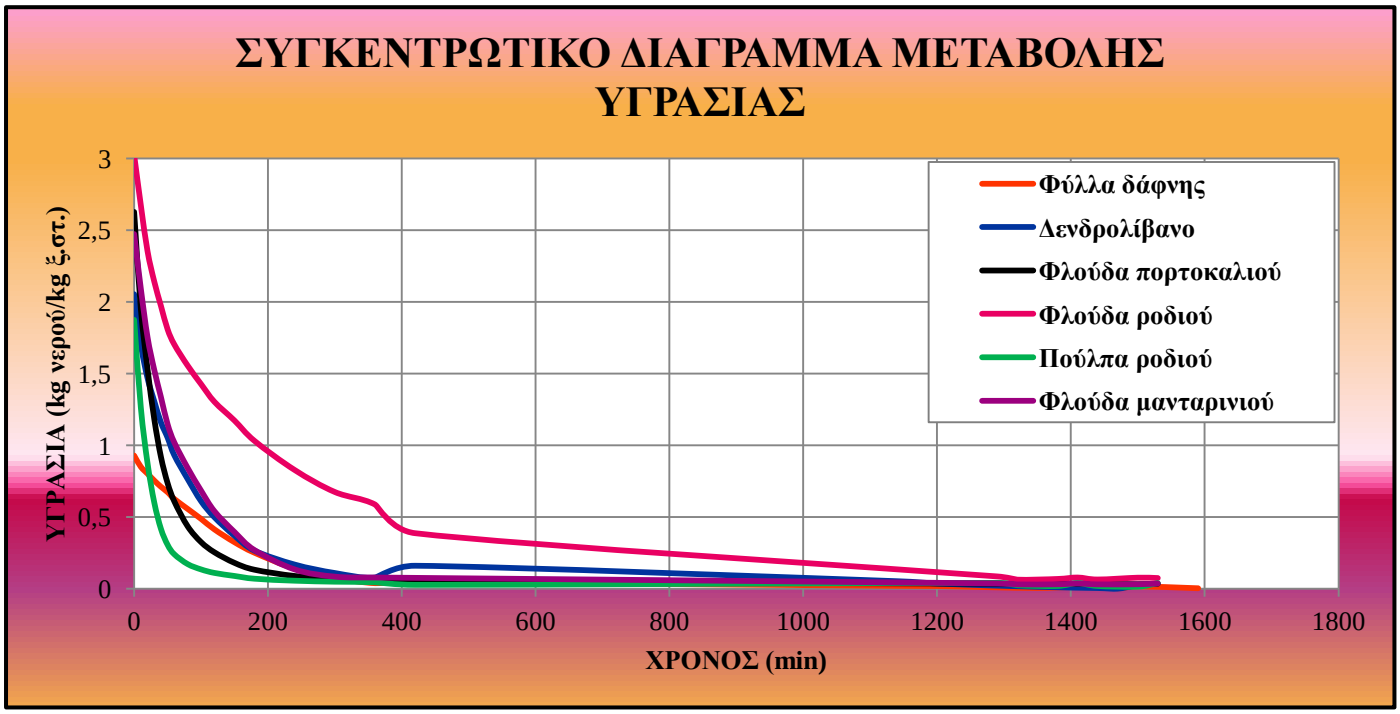
Πίνακας 3.12 Τιμές EC_{50} και ΑΕ

Παρατηρούμε ότι τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση γενικά την εμφανίζουν τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού, καθώς έχουν τις μεγαλύτερες τιμές του δείκτη *AE*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΞΗΡΑΝΣΗΣ

Για να είναι δυνατή η σύγκριση του χρόνου ξήρανσης των δειγμάτων παρατίθεται το συγκεντρωτικό διάγραμμα μεταβολής υγρασίας (Διάγραμμα 4.1).



Διάγραμμα 4.1 Συγκεντρωτικό διάγραμμα μεταβολής υγρασίας

Παρατηρούμε ότι η υγρασία όλων των δειγμάτων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η μεταβολή της υγρασίας είναι έντονη στην αρχή και ελαττώνεται στη συνέχεια έως ότου φτάσει σε ένα πλατό, όπου η μεταβολή της είναι ελάχιστη. Η ελάττωση αυτή του ρυθμού ξήρανσης, οφείλεται στη μείωση του ρυθμού μεταφοράς υγρασίας στο εσωτερικό του δείγματος. Αυτό συμβαίνει διότι, με την πάροδο του χρόνου, μειώνεται η περιεχόμενη υγρασία και αυξάνεται η αντίσταση, με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η μεταφορά υγρασίας στο εσωτερικό του δείγματος, χωρίς όμως να επηρεάζεται ο ρυθμός εξάτμισης από την επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ξηρών περιοχών και την ελάττωση του ρυθμού ξήρανσης μέχρι την υγρασία ισορροπίας.

Το χρονικό διάστημα έντονου ρυθμού ξήρανσης, καθώς και οι σταθερές ξήρανσης που προκύπτουν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων για το κάθε δείγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΝΤΟΝΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΞΗΡΑΝΣΗΣ		
Δείγμα	**Σταθερά ξήρανσης k (min^{-1})**	**Χρονικό διάστημα έντονου ρυθμού ξήρανσης(min)**
Ρόδι φλούδα	0,0075	400
Ρόδι πούλπα	0,0373	120
Πορτοκάλι φλούδα	0,0257	220
Μανταρίνι φλούδα	0,0145	240
Δάφνη φύλλα	0,0071	280
Δενδρολίβανο	0,0132	280

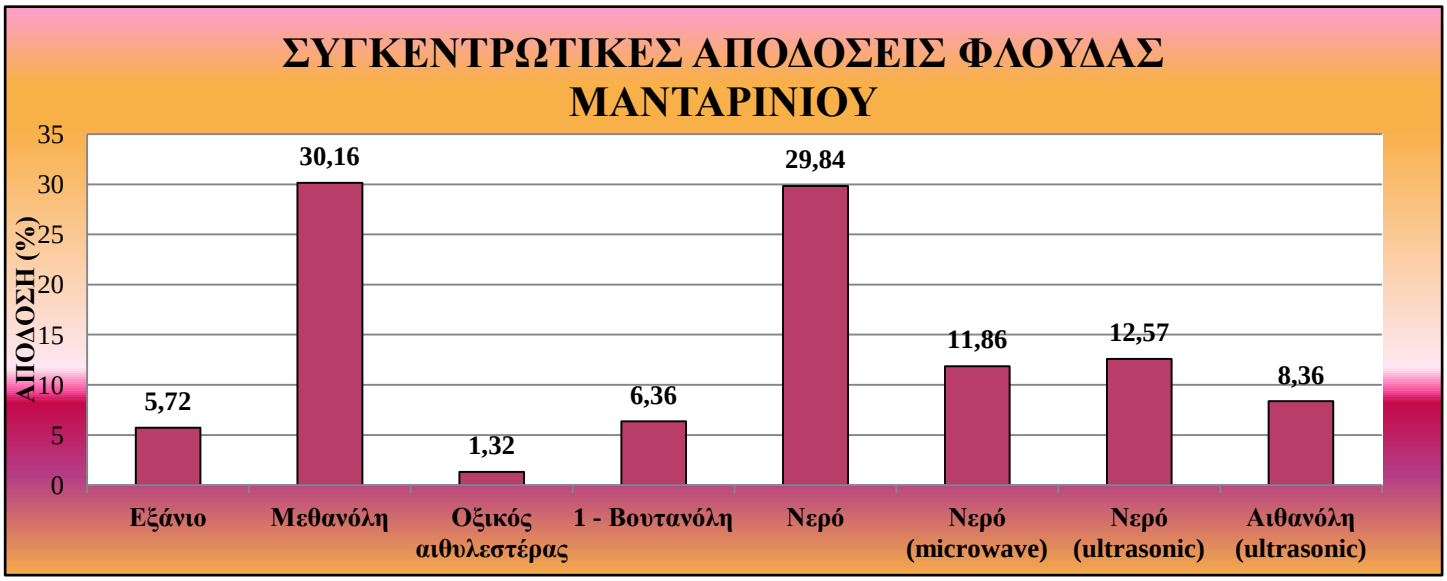
Πίνακας 4.1 Έντονος ρυθμός ξήρανσης

Οι ξηράνσεις που πραγματοποιήθηκαν, ακολουθούν κινητική πρώτης τάξης, το οποίο σημαίνει ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά ξήρανσης ενός δείγματος τόσο ταχύτερη είναι η ξήρανση. Αυτό αποδεικνύεται και από τον Πίνακα 4.1 όπου, όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά *k* της ξήρανσης, τόσο μικρότερο είναι το χρονικό διάστημα του έντονου ρυθμού ξήρανσης. Αυτό σημαίνει ότι φτάνει σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα στο πλατό της ελάχιστης μεταβολής υγρασίας και συνεπώς τόσο η ξήρανση ολοκληρώνεται πιο γρήγορα.

4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Στη σύγκριση των αποδόσεων μεγάλη σημασία έχουν εκτός από το μελετούμενο δείγμα και η φύση των διαφορετικών διαλυτών ή των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης. Όσον αφορά την εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, το εξάνιο, που αποτελεί και το πρώτο στάδιο της εκχύλισης, είναι ένας άπολος διαλύτης. Αυτό σημαίνει ότι θα δεσμεύσει τα άπολα φυτοχημικά συστατικά του μελετούμενου δείγματος, όπως π.χ. τα τερπένια. Αντίθετα, η μεθανόλη είναι πολικός διαλύτης και δεσμέυει τα πολικά συστατικά του δείγματος., όπως τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες. Το νερό, στο οποίο διαλύθηκε το υπόλειμμα μετά την εξάτμιση της μεθανόλης, διαλύει όλα τα πολικά συστατικά του μίγματος. Στον οξικό αιθυλεστέρα και την 1-βουτανόλη εκχυλίζονται τα λιγότερο πολικά συστατικά του υδατικού διαλύματος (όπως τα πολυφαινολικά και τα φλαβονοειδή) ενώ στο νερό παραμένουν διαλυμένα τα περισσότερο υδρόφιλα συστατικά όπως οι πολυσακχαρίτες. (Armata M. et al., 2008) Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα (αποδόσεις) των εκχυλίσεων ανά δείγμα:

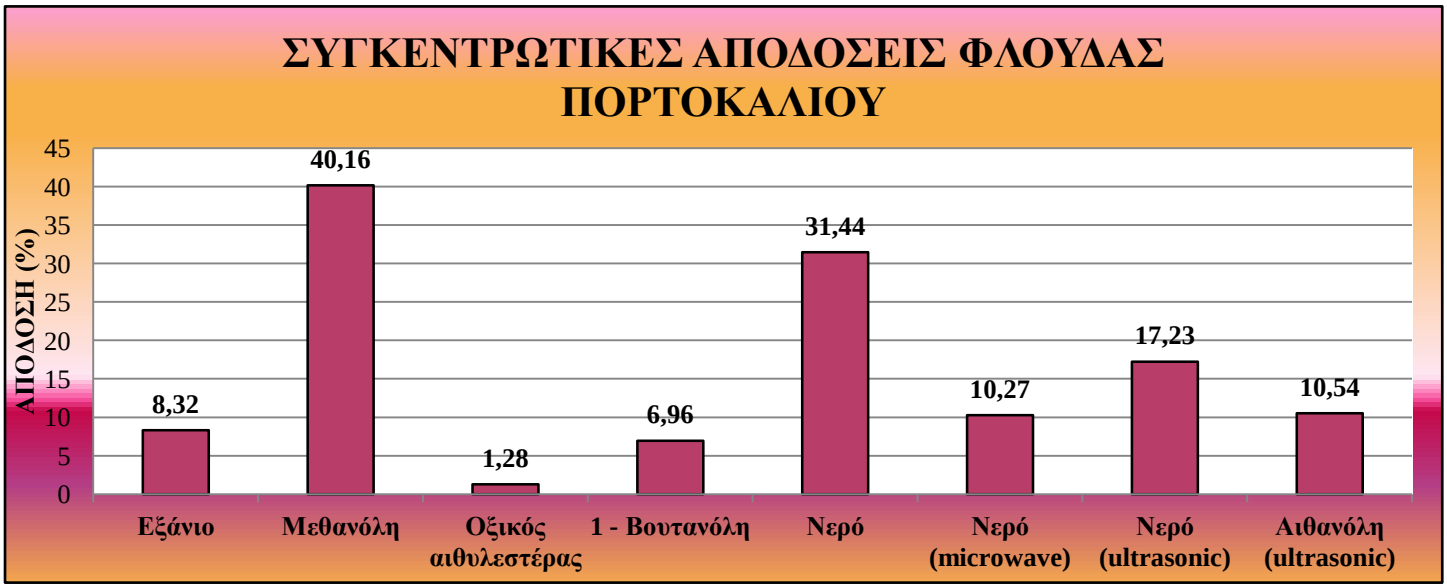
Για τη φλούδα του μανταρινιού:



Διάγραμμα 4.2 Συγκεντρωτικές αποδόσεις φλούδας μανταρινιού

Παρατηρούμε ότι, όσον αφορά τη φλούδα του μανταρινιού, στη μεθανόλη εκχυλίζονται σημαντικά περισσότερα συστατικά από ότι στο εξάνιο. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (29,84%) όπως είναι αναμενόμενο εφόσον η φλούδα του μανταρινιού περιέχει μεγάλες ποσότητες πηκτίνης. (Y. Liu et al., 2006) Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, καλύτερη απόδοση εμφανίζει το νερό με ποσοστό 12,57% σε σχέση με την αιθανόλη (8,36%). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 11,86%, δηλαδή σχεδόν το ίδιο με τη μέθοδο των υπερήχων.

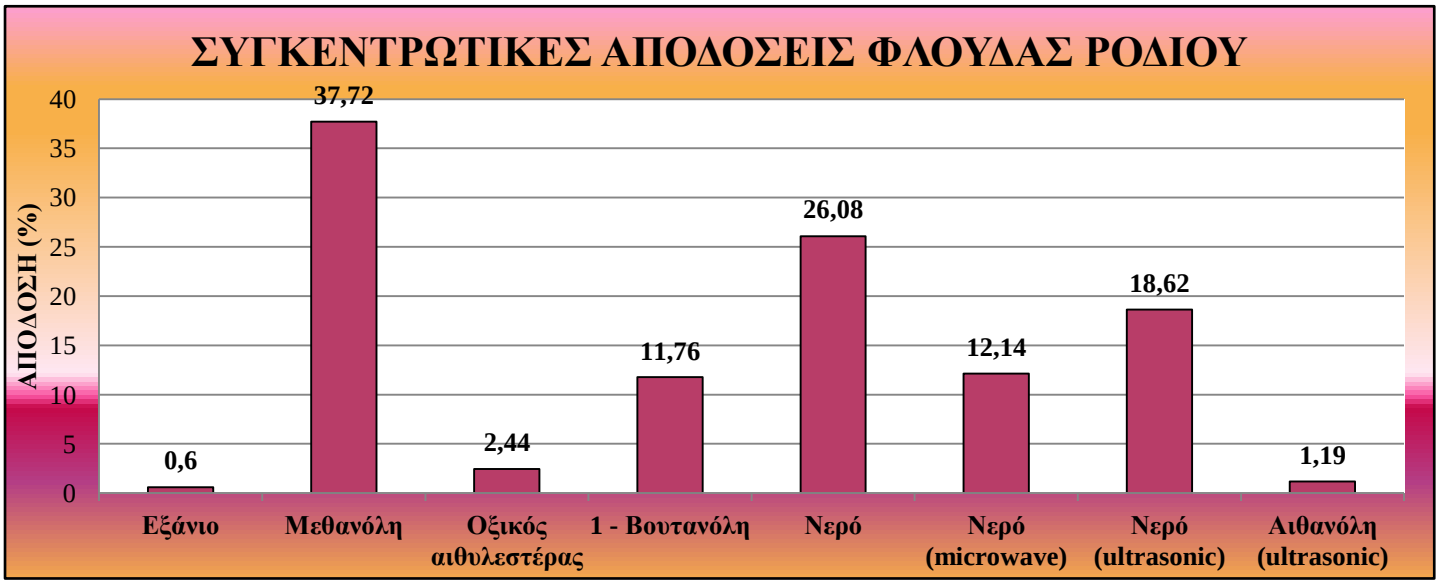
Για τη φλούδα του πορτοκαλιού:



Διάγραμμα 4.3 Συγκεντρωτικές αποδόσεις φλούδας πορτοκαλιού

Παρατηρούμε ότι, όσον αφορά τη φλούδα του πορτοκαλιού, στη μεθανόλη εκχυλίζονται σημαντικά περισσότερα συστατικά από ότι στο εξάνιο. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (31,44%) όπως είναι αναμενόμενο εφόσον η φλούδα του πορτοκαλιού περιέχει, όπως και το μανταρίνι, μεγάλες ποσότητες πηκτίνης. (Y. Liu et al., 2006) Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, καλύτερη απόδοση εμφανίζει το νερό με ποσοστό 17,23% σε σχέση με την αιθανόλη (10,54%). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 10,27%, δηλαδή λίγο χαμηλότερη σε σχέση με τη μέθοδο των υπερήχων.

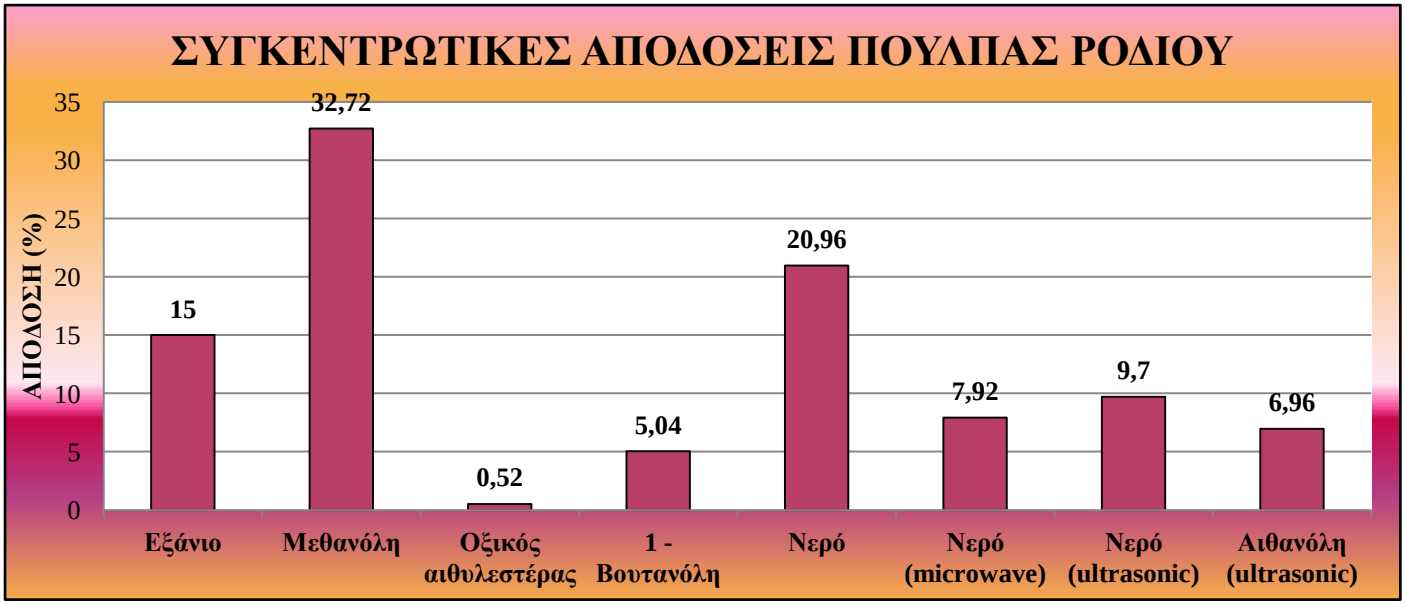
Για τη φλούδα του ροδιού:



Διάγραμμα 4.4 Συγκεντρωτικές αποδόσεις φλούδας ροδιού

Παρατηρούμε ότι για τη φλούδα του ροδιού εκχυλίζονται πολύ περισσότερα συστατικά της στη μεθανόλη από ότι στο εξάνιο. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (26,08%), όπως είναι αναμενόμενο εφόσον η φλούδα του ροδιού περιέχει και αυτή μεγάλες ποσότητες πηκτίνης. Η μικρότερη απόδοση εμφανίζεται στον οξικό αιθυλεστέρα (2,44%) αν και αξίζει να σημειωθεί ότι η απόδοση αυτή είναι διπλάσια από την αντίστοιχη των υπολοίπων δειγμάτων. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η απόδοση εκχύλισης στην 1-βουτανόλη είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη όλων των υπολοίπων δειγμάτων. Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, πολύ καλύτερη απόδοση εμφανίζει το νερό με ποσοστό 18,62% σε σχέση με την αιθανόλη (1,19%). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 12,14%, χαμηλότερη δηλαδή από τη μέθοδο των υπερήχων.

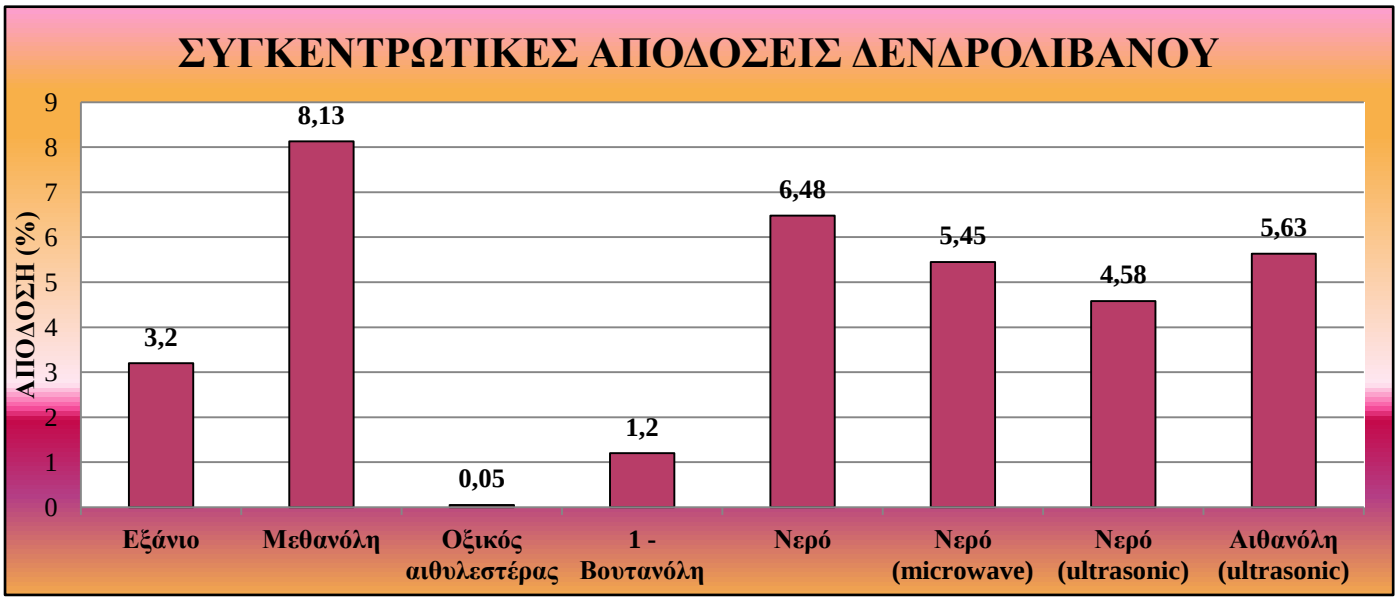
Για την πούλπα του ροδιού:



Διάγραμμα 4.5 Συγκεντρωτικές αποδόσεις πούλπας ροδιού

Παρατηρούμε ότι και η πούλπα του ροδιού εκχυλίζεται περισσότερο στη μεθανόλη από ότι στο εξάνιο αν και αξίζει να σημειωθεί ότι η απόδοση στο εξάνιο είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των υπολοίπων δειγμάτων. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (20,96%) ενώ τη μικρότερη απόδοση ο οξικός αιθυλεστέρας (0,52%). Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, καλύτερη απόδοση εμφανίζει το νερό με ποσοστό 9,7% σε σχέση με την αιθανόλη (6,96%). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 7,92%, δηλαδή αρκετά κοντά στην απόδοση με τη μέθοδο των υπερήχων.

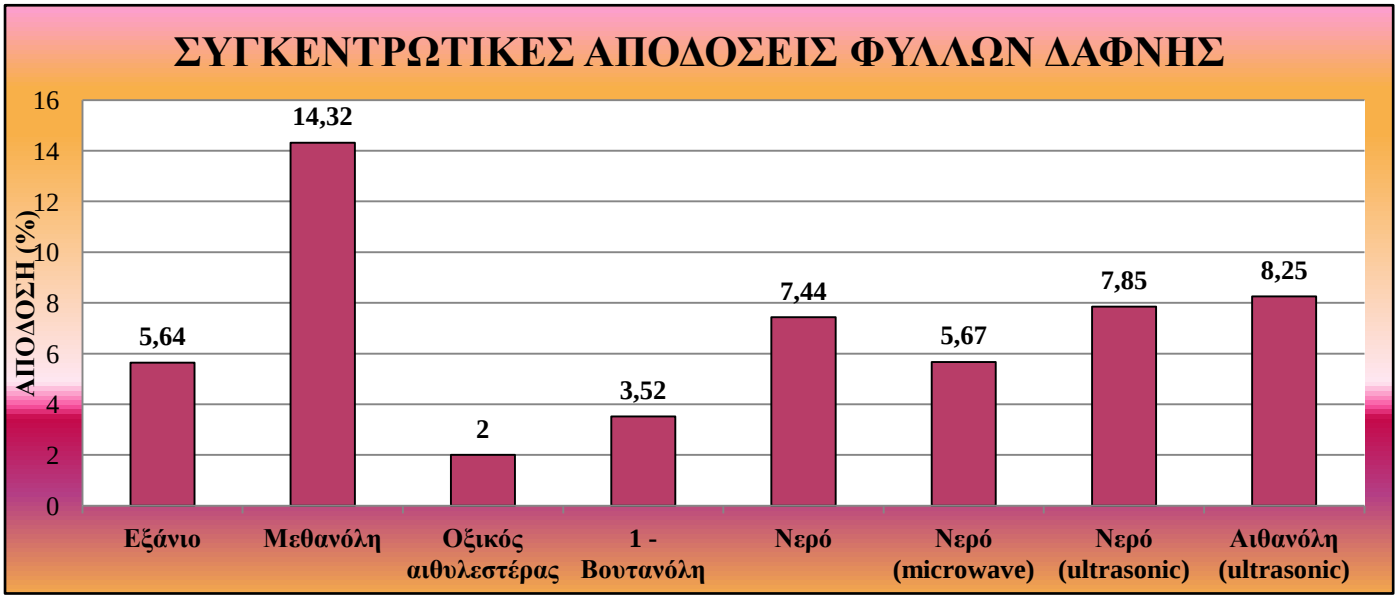
Για το δενδρολίβανο:



Διάγραμμα 4.6 Συγκεντρωτικές αποδόσεις δενδρολίβανου

Παρατηρούμε ότι το δενδρολίβανο γενικά σε όλες τις περιπτώσεις δεν εμφανίζει μεγάλη απόδοση. Παρ' όλα αυτά, εκχυλίζεται περισσότερο στη μεθανόλη από ότι στο εξάνιο όπως και τα υπόλοιπα δείγματα. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (6,48%) ενώ τη μικρότερη απόδοση ο οξικός αιθυλεστέρας (0,05%). Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, καλύτερη απόδοση εμφανίζει η αιθανόλη με ποσοστό 5,63% σε σχέση με το νερό (4,58%). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 5,45%, δηλαδή λίγο υψηλότερη σε σχέση με τη μέθοδο των υπερήχων.

Για τα φύλλα δάφνης:



Διάγραμμα 4.7 Συγκεντρωτικές αποδόσεις φύλλων δάφνης

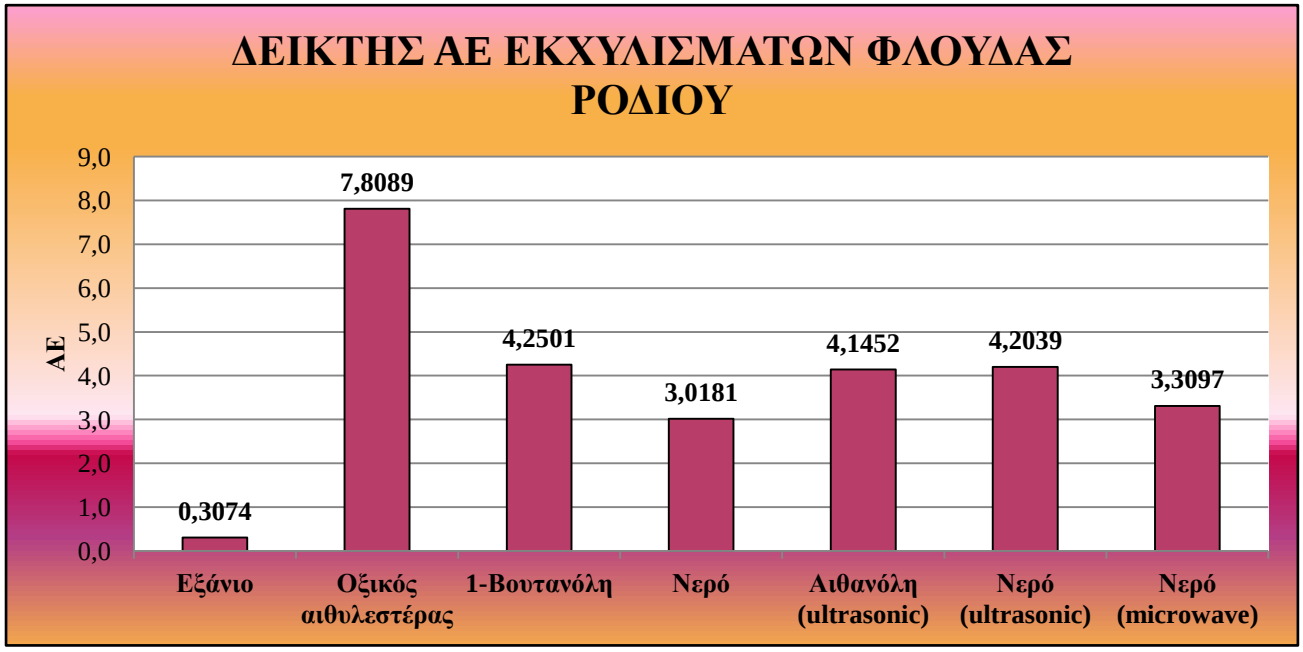
Παρατηρούμε ότι τα φύλλα δάφνης εκχυλίζονται περισσότερο στη μεθανόλη από ότι στο εξάνιο. Στις διαδοχικές εκχυλίσεις, τη μεγαλύτερη απόδοση την εμφανίζει το νερό (7,44%) με μικρότερο ωστόσο ποσοστό σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ τη μικρότερη απόδοση ο οξικός αιθυλεστέρας (2%), με ποσοστό πολύ κοντά σε εκείνο της φλούδας του ροδιού. Στη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, η αιθανόλη και το νερό εμφανίζουν παρεμφερείς αποδόσεις (8,25 και 7,85% αντίστοιχα). Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με διαλύτη νερό δίνει απόδοση 5,67%, χαμηλότερη δηλαδή σε σχέση με τη μέθοδο των υπερήχων.

4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Για την αντιοξειδωτική δράση, από την ποιοτική μέθοδο TLC αλλά και από τις τιμές των δεικτών EC_{50} και AE προέκυψε ότι τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού εμφανίζουν την μέγιστη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Για το

λόγο αυτό, μελετήθηκαν όλα τα εκχυλίσματά της και σχολιάζονται χωριστά από τα υπόλοιπα.

Οι δείκτες *ΑΕ* για τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 4.8 Δείκτης ΑΕ για τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού

Παρατηρούμε ότι, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα με *ΑΕ* 7,8089. Αυτό σημαίνει ότι στο εκχύλισμα αυτό έχουν συγκεντρωθεί οι μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών συστατικών όπως οι πολυφαινόλες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα από την πρόσφατη εργασία των Yunfeng Li et al. (2006). Επίσης, τα εκχυλίσματα 1-βουτανόλης και νερού εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση (*ΑΕ* 4,2501 και 3,0181 αντίστοιχα), μειωμένη βέβαια σε σχέση με εκείνη του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα. Με τη μέθοδο εκχύλισης με το λουτρό υπερήχων λαμβάνονται τα εκχυλίσματα αιθανόλης και νερού τα οποία εμφανίζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση ίδιας τάξης μεγέθους (*ΑΕ* 4,1452 και 4,2039) με αυτή του εκχυλίσματος της 1-βουτανόλης. Το εκχύλισμα που λαμβάνεται με τη μέθοδο των μικροκυμάτων παρουσιάζει επίσης ικανοποιητική αντιοξειδωτική ικανότητα (*ΑΕ* 3,3097), παρόμοια με αυτή του εκχυλίσματος νερού από τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων (*ΑΕ* 3,0181). Το εκχύλισμα του εξανίου παρουσιάζει χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού.

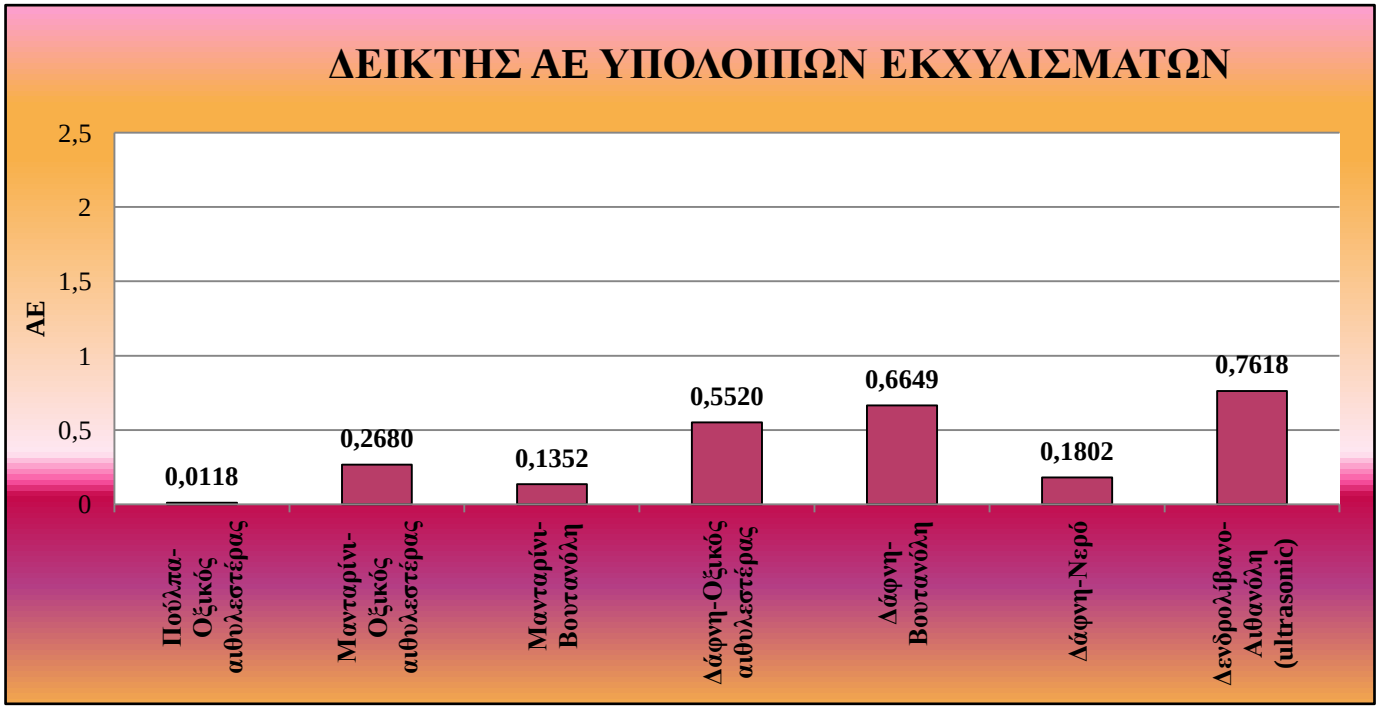
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων της φλούδας του ροδιού, είναι προφανές ότι το μεγαλύτερο ποσοστό αντιοξειδωτικών συστατικών συγκεντρώνεται στο εκχύλισμα

του οξικού αιθυλεστέρα, καθώς η τιμή του *ΑΕ* είναι διπλάσια αυτής των υπολοίπων εκχυλισμάτων. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ένας διαλύτης φιλικός προς το περιβάλλον και επιπλέον δεν είναι τοξικός. Μπορεί επίσης, να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα.

Σε χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα κυμαίνονται τα εκχυλίσματα της 1-βουτανόλης μέσω διαδοχικών εκχυλίσεων, της αιθανόλης και του νερού μέσω εκχύλισης με υπερήχους. Από τους 3 αυτούς διαλύτες εφόσον παρουσιάζουν σχεδόν ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα, προτείνεται το νερό από τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, καθώς είναι πιο οικονομικός και σαν διαλύτης αλλά και η μέθοδος της εκχύλισης με υπερήχους είναι αρκετά οικονομική. Επίσης, το νερό είναι και πιο φιλικό προς το περιβάλλον.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με εκείνα της ποιοτικής μεθόδου TLC, καθώς είχε παρατηρηθεί έντονη αντιοξειδωτική δράση για τα εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού με όλους τους διαλύτες εκτός του εξανίου στο οποίο αναμέναμε μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα.

Οι δείκτες *ΑΕ* για τα εκχυλίσματα των υπολοίπων δειγμάτων φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 4.9 Δείκτης ΑΕ για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα

Παρατηρούμε ότι, ο δείκτης *ΑΕ* στα υπόλοιπα εκχυλίσματα δεν ξεπερνά την τιμή 0,7618. Παρ' όλα αυτά στη μεταξύ τους σύγκριση, το εκχύλισμα του δενδρολίβανου με αιθανόλη με τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους εμφανίζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (*ΑΕ* 0,7618).

Όσον αφορά τα φύλλα δάφνης, το εκχύλισμα στην 1-βουτανόλη έχει καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από ότι στον οξικό αιθυλεστέρα (*ΑΕ* 0,6649 και 0,5520 αντίστοιχα) , ενώ το εκχύλισμα του νερού από τη μέθοδο διαδοχικών εκχυλίσεων εμφανίζει σχετικά μικρή δράση (*ΑΕ* 0,1802).

Για το μανταρίνι, το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφανίζει διπλάσια αντιοξειδωτική δράση από εκείνο της 1-βουτανόλης (*ΑΕ* 0,2680 και 0,1352 αντίστοιχα).

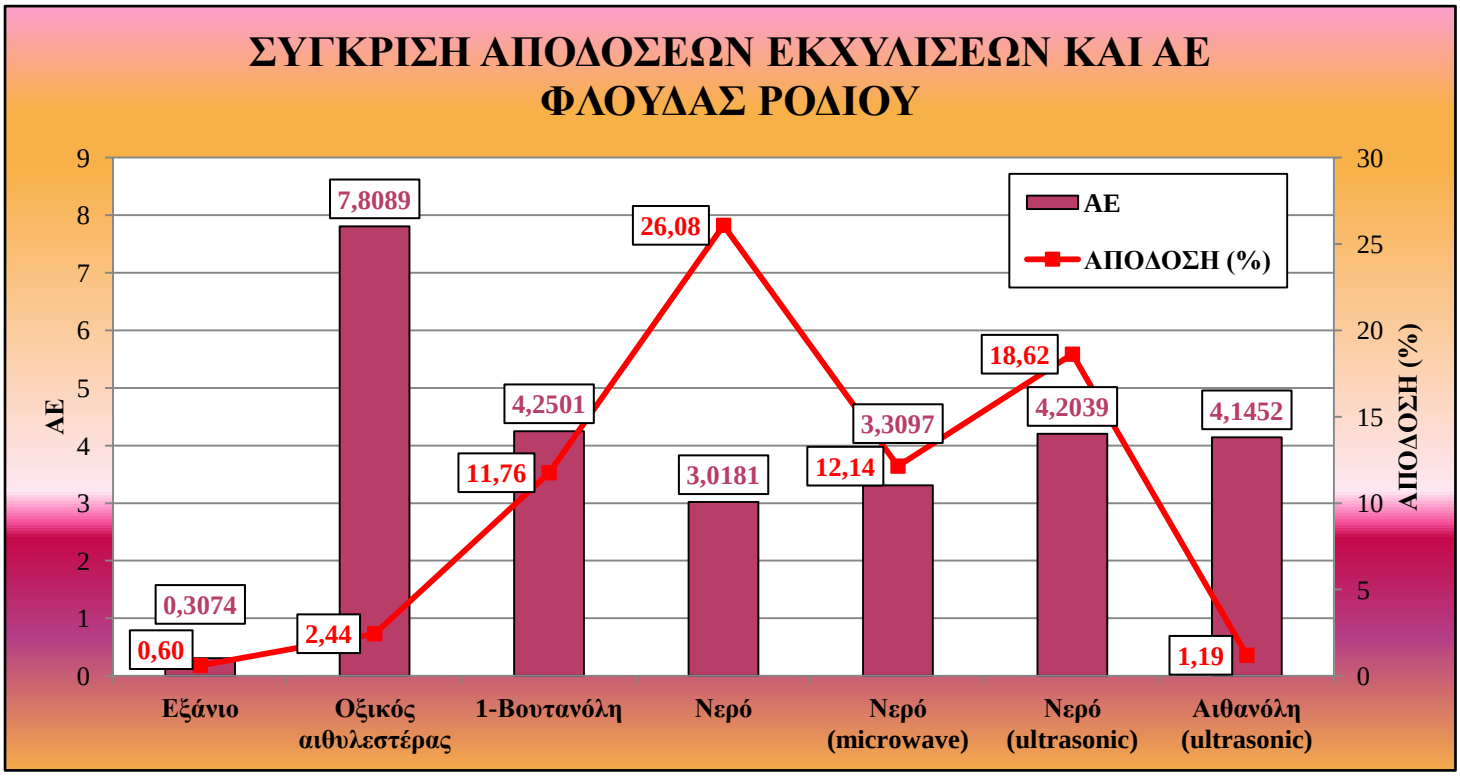
Τέλος, η πούλπα του ροδιού εμφανίζει ελάχιστη αντιοξειδωτική δράση (*ΑΕ* 0,0118).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν απόλυτα με εκείνα της ποιοτικής μεθόδου TLC, καθώς για τα εκχυλίσματα της φλούδας του μανταρινιού με οξικό αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλη, και των φύλλων δάφνης με H_2O, αναμενόταν έντονη αντιοξειδωτική δράση και όχι μέτρια όπως προέκυψε τελικά. Παρ' όλα αυτά, τα εκχυλίσματα των φύλλων δάφνης με οξικό αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλη, και του δενδρολίβανου με αιθανόλη εμφανίζουν σχετικά έντονη αντιοξειδωτική δράση όπως είχε προβλεφθεί από την ποιοτική μέθοδο TLC. Τέλος, η πούλπα του ροδιού εμφανίζει ελάχιστη αντιοξειδωτική δράση όπως ακριβώς είχε προβλέψει η μέθοδος TLC.

Για να είναι πλήρης η αξιολόγηση ως προς την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα δεν αρκεί μόνο να γνωρίζουμε τη δράση σύμφωνα με τον κάθε διαλύτη αλλά, να γίνει μια επιπλέον σύγκριση σύμφωνα και με την ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος που παραλαμβάνουμε. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα στα οποία είναι εφικτή αυτή η σύγκριση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική ικανότητα και στην απόδοση του κάθε εκχυλίσματος.

Θα εξεταστεί και πάλι η φλούδα του ροδιού ξεχωριστά από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Για τη φλούδα του ροδιού το συγκριτικό διάγραμμα είναι:



Διάγραμμα 4.10 Συγκριτικό διάγραμμα αποδόσεων εκχυλισμάτων φλούδας ροδιού και δείκτη ΑΕ

Όσον αφορά τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων παρατηρούμε ότι, το εξάνιο παρουσιάζει και μικρή απόδοση σε ποσότητα εκχυλίσματος αλλά και χαμηλή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τους υπόλοιπους διαλύτες, όπως αναμενόταν γιατί τα τερπένια και οι χρωστικές που συνήθως εκχυλίζονται σε αυτό το διαλύτη δεν εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Αντίθετα, ο οξικός αιθυλεστέρας παρουσιάζει μικρή απόδοση σε ποσότητα εκχυλίσματος αλλά πολύ έντονη αντιοξειδωτική δράση. Το εκχύλισμα της 1-βουτανόλης έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση και ικανοποιητική απόδοση. Το εκχύλισμα του H_2O με τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων παρατηρούμε ότι εμφανίζει την υψηλότερη απόδοση (αναφερόμενο πάντα σε βάρος εκχυλίσματος) και σχετικά έντονη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα του ίδιου φρούτου.

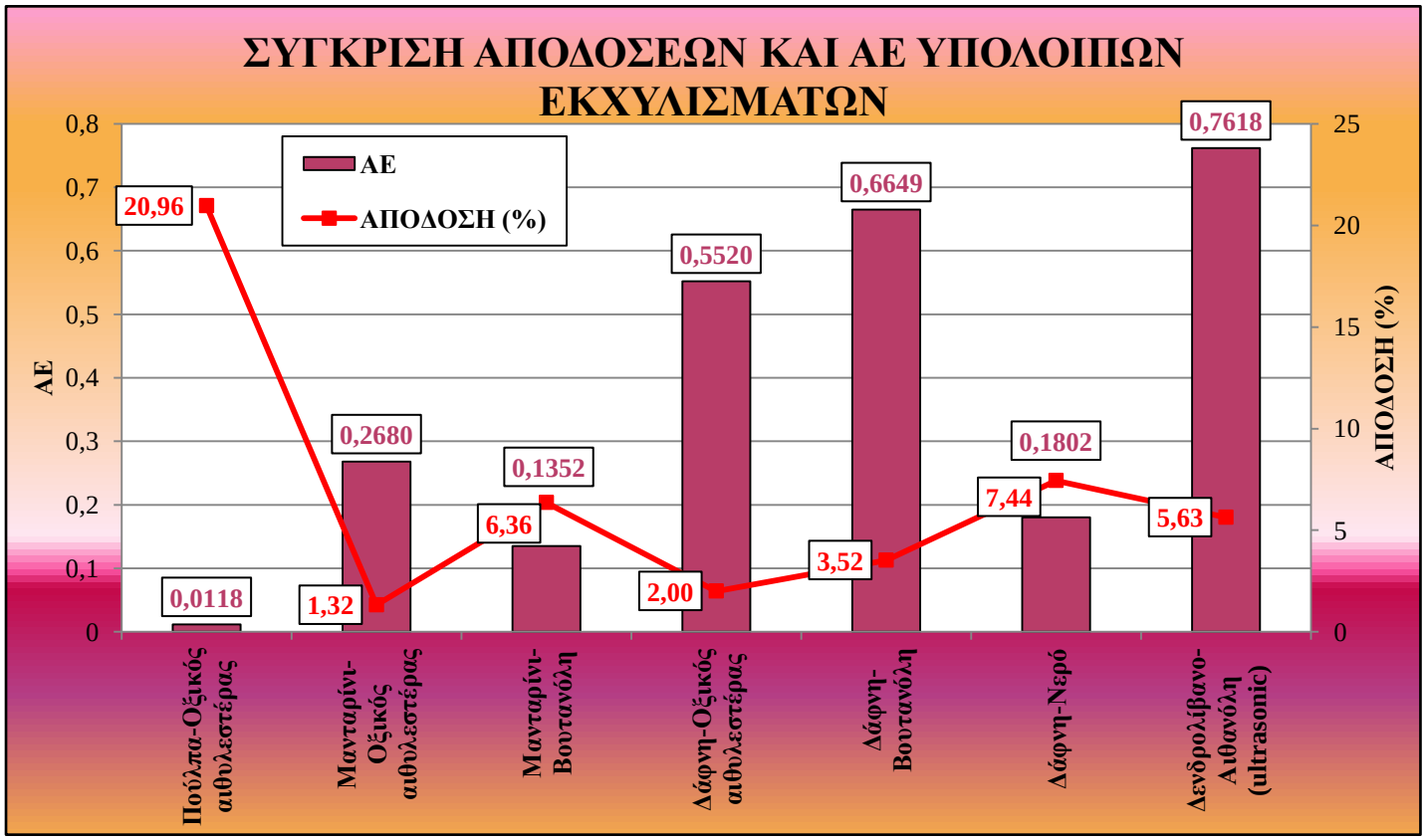
Από τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, τα εκχυλίσματα της αιθανόλης και του νερού παρουσιάζουν σχεδόν ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα όμως η απόδοση σε βάρος εκχυλίσματος στο νερό είναι δραματικά μεγαλύτερη από ότι στην αιθανόλη.

Η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα με νερό παρουσιάζει ικανοποιητική απόδοση αλλά και το εκχύλισμά της έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η ιδανικότερη μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του καλύτερου εκχυλίσματος φλούδας ροδιού μπορεί να θεωρηθεί η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους με διαλύτη H_2O. Αυτό διότι αποτελεί τον

ιδανικότερο συνδυασμό απόδοσης και αντιοξειδωτικής ικανότητας του παραληφθέντος εκχυλίσματος, ενώ ταυτόχρονα ο διαλύτης H_2O είναι πολύ οικονομικός και φιλικός προς το περιβάλλον όπως επίσης και η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους αυτή καθ' αυτή είναι αρκετά οικονομική και καθόλου χρονοβόρα. Επίσης, η εκχύλιση με μικροκύματα είναι και αυτή πολύ ικανοποιητική ως προς την απόδοση και την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος και ως προς το διαλύτη (H_2O) αλλά και σαν μέθοδος είναι και αυτή πολύ οικονομική και απαιτεί ακόμα λιγότερο χρόνο. Αντίθετα, το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα παρ' όλο που έχει διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα έχει πολύ μικρή απόδοση σε ποσότητα, πράγμα που σημαίνει ότι απαιτείται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος. Επίσης, ο οξικός αιθυλεστέρας παρότι δεν είναι τοξικός, δεν είναι τόσο φιλικός προς το περιβάλλον όσο το H_2O και επιπλέον η μέθοδος των διαδοχικών εκχυλίσεων είναι πολύ χρονοβόρα.

Για τα υπόλοιπα εκχυλίσματα το συγκριτικό διάγραμμα φαίνεται παρακάτω:



Διάγραμμα 4.11 Συγκριτικό διάγραμμα αποδόσεων των υπολοίπων εκχυλισμάτων και δείκτη ΑΕ

Όσον αφορά το εκχύλισμα της πούλπας του ροδιού με τη μέθοδο των διαδοχικών εκχυλίσεων παρατηρούμε ότι, παρουσιάζει μεγάλη απόδοση σε ποσότητα εκχυλίσματος αλλά ελάχιστη αντιοξειδωτική δράση.

Αντίθετα, τα εκχυλίσματα των φύλλων δάφνης με οξικό αιθυλεστέρα και 1-βουτανόλη παρουσιάζουν μικρή απόδοση σε ποσότητα εκχυλίσματος αλλά έντονη αντιοξειδωτική δράση, ενώ το εκχύλισμα του νερού ικανοποιητική απόδοση και μέτρια αντιοξειδωτική δράση.

Το εκχύλισμα της φλούδας του μανταρινιού με 1-βουτανόλη έχει μέτρια αντιοξειδωτική δράση και ικανοποιητική απόδοση σχετικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, ενώ με οξικό αιθυλεστέρα χαμηλή απόδοση και μέτρια αντιοξειδωτική δράση.

Το εκχύλισμα του δενδρολίβανου με τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους και διαλύτη αιθανόλη, εμφανίζει ικανοποιητική απόδοση (αναφερόμενο πάντα σε βάρος εκχυλίσματος) και έντονη αντιοξειδωτική δράση. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το δενδρολίβανο είναι αυτοφυές στις μεσογειακές χώρες, καλλιεργείται εύκολα, έχει μικρές απαιτήσεις σε νερό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εκμετάλλευσή του ως πρώτη ύλη για την παραγωγή εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική δράση είναι οικονομικά συμφέρουσα και αποδοτική. Επιπλέον, πλεονέκτημα είναι ο τρόπος εκχύλισης με υπερήχους, ο οποίος είναι αρκετά οικονομικός και καθόλου χρονοβόρος ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιεί ένα φιλικό προς το περιβάλλον διαλύτη, όπως είναι η αιθανόλη.

5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

5.1 ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Στην παρούσα εργασία αρχικά, μελετήθηκε η κινητική ξήρανσης στους 50 ºC, των υπολειμμάτων φρούτων και αρωματικών φυτών που επιλέχθηκαν. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης (εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, εκχύλιση με μικροκύματα και εκχύλιση με υπερήχους) που πραγματοποιήθηκαν για τα μελετούμενα δείγματα και μέσω απόσταξης με υδρατμούς σε συσκευή Clevenger, έγινε παραλαβή του αιθέριου ελαίου του μανταρινιού. Τέλος, έγινε μέτρηση και σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης ποιοτική (μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)) και ποσοτική (μέθοδος μέτρησης της αποικοδόμησης της ρίζας 2,2–διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζιλίου (DPPH)) των παραληφθέντων εκχυλισμάτων.

Σε επόμενο στάδιο της μελέτης, όσον αφορά τις ξηράνσεις, θα προτείναμε τη χρήση και άλλων μεθόδων ξήρανσης όπως για παράδειγμα, ξήρανση με κατάψυξη, επιταχυνόμενη ηλιακή ξήρανση, ξήρανση υπό κενό ή ξήρανση με μικροκύματα, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Επίσης, θα μπορούσε να γίνει εμβάθυνση στην ήδη μελετημένη διαδικασία ξήρανσης, τροποποιώντας τις συνθήκες διεξαγωγής όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, αντί για τους 50 ºC να γίνει στους 70 ºC.

Σχετικά με τις μεθόδους εκχύλισης, αρχικά θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον επαναλήψεις, καθώς στην παρούσα μελέτη ήταν δυνατή μόνο μία επανάληψη. Αυτό συνεπάγεται βελτιστοποίηση των μεθόδων υψηλής ενέργειας (εκχύλιση με μικροκύματα και με υπερήχους) όσον αφορά τις συνθήκες εκχύλισης και την επίδρασή τους στην αντιοξειδωτική δράση των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Επιπλέον, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες στην μέθοδο εκχύλισης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων. Τέλος, γενικότερα θα μπορούσαν να μελετηθούν και επιπλέον μέθοδοι εκχύλισης, όπως για παράδειγμα εκχύλιση Soxhlet.

Σχετικά με την παραλαβή αιθέριων ελαίων, μέσω απόσταξης με υδρατμούς σε συσκευή Clevenger, μελετήθηκε μόνο το μανταρίνι, διότι η συσκευή Clevenger καταστράφηκε και δεν ήταν δυνατή η άμεση αποκατάστασή της ώστε να συνεχιστούν τα πειράματα. Σε επόμενο στάδιο λοιπόν, θα μπορούσαν να ληφθούν τα αιθέρια έλαια όλων των μελετούμενων δειγμάτων.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, θα μπορούσε να μετρηθεί και με άλλες μεθόδους όπως για παράδειγμα η μέθοδος Folin – Ciocalteu με την οποία προσδιορίζεται ποσοτικά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Σημαντική επίσης είναι και η ανάλυση των παραγόμενων εκχυλισμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποια συστατικά οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση και αν είναι δυνατόν, ο διαχωρισμός τους με χρωματογραφία στήλης. Η ανάλυση θα μπορούσε να γίνει με HPLC, LC-MS, GS-MS, NMR , FT-IR κ.α.

Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα των φρούτων και ιδιαίτερα του ροδιού, μιας και αυτό παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε αντιοξειδωτική δράση, παράχθηκαν από τα υπολείμματά τους. Αυτό σημαίνει ότι αποτελούν άριστη επιλογή πρώτων υλών για την παραγωγή εκχυλισμάτων, καθώς τα υπολείμματα αυτά, έπειτα από κατάλληλη αξιοποίηση προσφέρονται για την ανάπτυξη προϊόντων με αυξημένη αντιοξειδωτική δράση και συνεπώς αυξημένη θρεπτική αξία και λειτουργικές ικανότητες. Τέλος, το ίδιο ισχύει και για τα αρωματικά φυτά που μελετήθηκαν, καθώς είναι αυτοφυή και υπάρχουν άφθονα στις μεσογειακές χώρες, καλλιεργούνται εύκολα και συνεπώς, η εκμετάλλευσή τους ως πρώτες ύλες για την παραγωγή εκχυλισμάτων με αντιοξειδωτική δράση είναι και αυτή οικονομικά συμφέρουσα και αποδοτική.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής βιβλιογραφία

Afifi F.U., Khalil E., Tamimi S.O., Disi A. (1997). *Evaluation of the gastroprotective effect of Laurus nobilis seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats.* Journal of Ethnopharmacology, Volume 58, Issue 1, Pages 9-14

Aikaterini Termentzi, Panagiotis Kefalas, Eugene Kokkalou (2006). *Antioxidant activities of various extracts and fractions of Sorbus domestica fruits at different maturity stages*. Food Chemistry, Volume 98, Issue 4, Pages 599-608

Ángel Calín-Sánchez, Antoni Szumny, Adam Figiel, Klaudiusz Jałoszyński, Maciej Adamski, Ángel A. Carbonell-Barrachina (2011). *Effects of vacuum level and microwave power on rosemary volatile composition during vacuum–microwave drying*. Journal of Food Engineering, Volume 103, Pages 219-227

Antolovich M., Paul D. Prenzler, Emilios Patsalides, Suzanne Mc Donald, Kevin Robards (2002). *Methods for testing antioxidant activity*. The Analyst, Volume 127, Pages 183 – 198

Armata M., Gabrieli C., Termentzi A., Zervou M., Kokkalou E., (2008). *Constituents of Sideritis syriaca. ssp. syriaca (Lamiaceae) and their antioxidant activity*. Food Chemistry, Volume 111, Issue 1, Pages 179-186

Biljana Bozin, Neda Mimica-Dukic, Natasa Simin, Goran Anackov (2006). *Charactterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 54, Pages 1822-1828

Ender Poyrazoglu, Vural Gokmen, Nevzat Artik (2002). *Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (Punica granatum L.) Grown in Turkey*. Journal of Food Composition and Analysis Volume 15, Pages 567‑575

Guo S., Deng Q., Xiao J., Xie B., & Sun Z. (2007). *Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 55, Pages 3134–3140

Huang Dejian, Boxin Ou, Ronald L. Prior (2005). *The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 53, Pages 1841-1856

Ibtissem Hamrouni Sellami, Wissem Aidi Wannes, Iness Bettaieb, Sarra Berrima, Thouraya Chahed, Brahim Marzouk, Ferid Limam (2011). *Qualitative and quantitative changes in the essential oil of Laurus nobilis L. leaves as affected by different drying methods*. Food Chemistry, Volume 126, Issue 2, Pages 691-697

Jayaprakasha G.K., Bhimanagouda S. Patil (2007). *In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange*. Food Chemistry, Volume 101, Pages 410–418

Lansky E.P., & Newman R.A. (2007). *Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer*. Journal of Ethnopharmacology, Volume 109, Pages 177–206

Leandro Danielski, Gerd Brunner, Christian Schwanke, Carsten Zetzl, Haiko Hense, Jayme P.M. Donoso (2008). *Deterpenation of mandarin (Citrus reticulata) peel oils by means of countercurrent multistage extraction and adsorption/desorption with supercritical* CO_2. Journal of Supercritical Fluids, Volume 44, Pages 315–324

Liu Y., Shi J., Langrish T.A.G. (2006). *Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels.* Chemical Engineering Journal 120, Pages 203–209

Madrigal - Carballo S., Rodriguez G., Krueger C.G., Dreher M., Reed J.D. (2009). *Pomegranate (Punica granatum) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition.* Journal of Functional Foods Volume 1, Pages 324 –329

Meghal Desai , Jigisha Parikh & P. A. Parikh (2010). *Extraction of Natural Products Using Microwaves as a Heat Source*. Separation & Purification Reviews , Volume 39, Pages 1–32

Mira B., Blasco M., Berna A., Subirats S. (1999). *Supercritical CO2 extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition.* Journal of Supercritical Fluids, Volume 14, Pages 95–104

Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. (2002). *Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (Salvia officinalis L.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) Measured by the Oil Stability Index Method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 50, Pages 1845-1851

Naciye Erkan, Guler Ayranci, Erol Ayranci (2008). *Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol*. Food Chemistry, Volume 110, Pages 76–82

Olfa Ouchikh, Thouraya Chahed, Riadh Ksouri, Mouna Ben Taarit, Hanen Faleh, Chedly Abdelly, Mohamed Elyes Kchouk, Brahim Marzouk (2011). *The effects of*

extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of L. nobilis vegetative organs. Journal of Food Composition and Analysis, Volume 24, Issue 1, Pages 103-110

Ozlem Yesil-Celiktas, Muge Isleten, Yonca Karagul-Yuceer, Erdal Bedir, Fazilet Vardar-Sukan (2008). *Influence of supercritical carbon dioxide and methanolic extracts of rosemary on oxidation and sensory properties of wheat germ oil.* Journal of Food Quality, Volume 32, Issue 6, Pages 709–724

Pu Jing, Tian Ye, Haiming Shi, Yi Sheng, Margaret Slavin, Boyan Gao, Linwei Liu, Liangli (Lucy) Yu (2012). *Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds*. Food Chemistry, Volume 132, Pages 1457‑1464

Ram M. Uckoo, Guddadarangavvanahally K. Jayaprakasha, Shad D. Nelson, Bhimanagouda S. Patil (2011). *Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in citrus using high-performance liquid chromatography*. Talanta, Volume 83, Pages 948–954

Rodriguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., Cocero M.J. (2012). *Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents*. Journal of Food Engineering, Volume 109, Pages 98–103

Tameshia S. Ballard, Parameswarakumar Mallikarjunan, Kequan Zhou, Sean O'Keefe (2010). *Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins.* Food Chemistry, Volume 120, Issue 4, Pages 1185-1192

Ulrike A. Fischer, Reinhold Carle, Dietmar R. Kammerer (2011). *Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MS.* Food Chemistry Volume 127, Pages 807–821

Vessela D. Kancheva, Petya V. Boranova, Jordan T. Nechev, Ilia I. Manolov (2010). *Structure–activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants*. Biochimie, Volume 92, Issue 9, Pages 1138-1146

Yunfeng Li, Changjiang Guo, Jijun Yang, Jingyu Wei, Jing Xu, Shuang Cheng (2006). *Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract*. Food Chemistry, Volume 96, Pages 254–260

Zheng W., Wang S.Y. (2001). *Antioxidant activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 49, Pages 5165-5170

Ελληνική βιβλιογραφία

Ευάγγελος Μπακέας, Κων/νος Ευσταθίου (2008). *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΥΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥΣ* , Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα " ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ Ι", ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Καλκάκη Αφροδίτη (2008). *Η χρήση της μικροκυματικής εκχύλισης στην παραλαβή οργανικών ενώσεων. Μικροκυματική εκχύλιση αλιζαρίνης από φυσική χρωστική Rubia Tinctorum.* Μια πράσινη εφαρμογή στην πειραματική διδασκαλία της Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σχολή θερμικών επιστημών, τομέας χημείας.

Κυριτσάκης Κ.Α. (2007). *Ελαιόλαδο Συμβατικό και Βιολογικό, Βρώσιμη Ελιά και Πάστα Ελιάς*, Θεσσαλονίκη

Μαρουλής Ζ., Ζιώμας Ι., Κροκίδα Μ. (2011). *Μηχανική Φυσικών Διεργασιών Ι & ΙΙ*. Εργαστηριακές Ασκήσεις

Μπόσκου Δ. (2004). *Χημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη

Βιβλιογραφία διαδικτύου

http://www.antemisaris.gr/product.aspx?iid=3050 (25 Αυγούστου, 2012)

http://www.chemeng.ntua.gr/courses/trbio/files/KEF9%20%20Drying.pdf (29 Σεπτεμβρίου 2012)

http://www.chemist.gr/2011/01/4606/ (7 Σεπτεμβρίου, 2012)

http://www.iatronet.gr/article.asp?art_id=7319 (8 Σεπτεμβρίου, 2012)

http://www.wikipedia.org (Ιούλιος, 2012)

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7.1 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΞΗΡΑΝΣΕΩΝ

7.1.1 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας πορτοκαλιού

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔΧ	ΣΔΧ	STDEVP
0	2,627878748	2,627878748	0		0,205303498
10	1,952158426	2,040049411	0,007724825		0,196042058
20	1,532478762	1,585311037	0,002791249		0,237059505
30	1,185385336	1,233530385	0,002317946		0,240356912
40	0,920608195	0,961396703	0,001663702		0,246983155
50	0,736632137	0,75087705	0,000202918		0,249422277
60	0,609664105	0,58802134	0,000468409		0,24382656
80	0,435213038	0,364578547	0,004989231		0,213102202
100	0,325394789	0,230861417	0,008936558		0,177077695
120	0,254123775	0,150839724	0,010667595		0,145655162
150	0,180404481	0,086793216	0,008763069		0,098606802
180	0,132559343	0,057143094	0,005687611	0,059288569	0,06726451
240	0,088963963	0,03706206	0,002693807		0,040130561
300	0,070671978	0,0327583	0,001437447		0,025859251
360	0,054392081	0,031835919	0,00050878		0,000775168
420	0,050178299	0,031638235	0,000343734		0
1290	0,03544683	0,03158431	1,49191E-05		0
1320	0,037270527	0,03158431	3,23331E-05		0,007875797
1380	0,034640489	0,03158431	9,34023E-06		0,006597462
1410	0,035634049	0,03158431	1,64004E-05		0
1440	0,034222206	0,03158431	6,9585E-06		0,006408562
1500	0,03158431	0,03158431	2,35926E-33		0
1530	0,035009985	0,03158431	1,17353E-05		0

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,03158431	**2,627878748**	**0,025671441**

7.1.2 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας μανταρινιού

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔX	ΣΔX	STDEVP
0	2,47464157	2,47464157	0		0,468788897
10	2,093074365	2,144667494	0,002661851		0,48219807
20	1,755117184	1,859243106	0,010842208		0,395865712
30	1,52809014	1,612353768	0,007100359		0,354525214
40	1,337884649	1,398796877	0,0037103		0,317494747
50	1,147828414	1,21407223	0,004388243		0,267820481
60	1,020811587	1,054287194	0,001120616		0,252331687
80	0,842471441	0,796522196	0,002111333		0,239453592
100	0,684723759	0,60366029	0,006571286		0,213264543
120	0,540747477	0,459359413	0,006624017		0,179549684
150	0,395811231	0,308077393	0,007697226		0,141802857
180	0,269460128	0,210168739	0,003515469	0,060590707	0,112822242
240	0,134639541	0,105793058	0,00083212		0,065094919
300	0,084391886	0,062074396	0,00049807		0,038371954
360	0,078470627	0,043762455	0,001204657		0,020916078
420	0,076004819	0,036092339	0,001593006		0
1290	0,0372993	0,030564107	4,53628E-05		0
1320	0,030350671	0,0305641	4,55521E-08		0,004354506
1380	0,031148325	0,030564093	3,41327E-07		0,003581056
1410	0,036887608	0,030564092	3,99869E-05		0
1440	0,030564088	0,03056409	4,31988E-18		0,003830667
1500	0,031650422	0,030564089	1,18012E-06		0
1530	0,036311239	0,030564089	3,30297E-05		0

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,030564088	**2,47464157**	**0,014503694**

7.1.3 Μετρήσεις ξήρανσης φλούδας ροδιού

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔX	ΣΔX	STDEVP
0	3,024741176	3,024741176	0		0,2531517
10	2,673797117	2,811863189	0,01906224		0,232680644
20	2,353319213	2,61429095	0,068106248		0,25039613
30	2,142802029	2,43092399	0,083014264		0,254085943
40	1,972664278	2,26074096	0,082988175		0,260845406
50	1,808656551	2,102793948	0,086516808		0,276062251
60	1,703225553	1,956203192	0,063997686		0,27122004
80	1,555302281	1,693883139	0,019204654		0,256693432
100	1,42659711	1,467928209	0,00170826		0,249995933
120	1,303159355	1,273297146	0,000891752		0,24332855
150	1,172484857	1,030750793	0,020088545		0,232619806
180	1,030215529	0,836849706	0,037390342	0,783989373	0,199673235
240	0,827322759	0,557914749	0,072580676		0,163078765
300	0,674077048	0,379646525	0,086689332		0,142369981
360	0,587050047	0,265714733	0,103256384		0,112381582
420	0,386738593	0,19290056	0,037573183		0
1290	0,085456369	0,06415126	0,000453908		0
1320	0,062907509	0,064112047	1,45091E-06		0,018174932
1380	0,067694984	0,064055637	1,32448E-05		0,017705365
1410	0,077833501	0,064035603	0,000190382		0
1440	0,063955743	0,064019586	4,07588E-09		0,01806391
1500	0,076691391	0,063996545	0,000161159		0
1530	0,074022066	0,063988362	0,000100675		0

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,063955743	**3,024741176**	**0,007461489**

7.1.4 Μετρήσεις ξήρανσης πούλπας ροδιού

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔΧ	ΣΔΧ	STDEVP
0	1,87547985	1,87547985	0		0,166487395
10	1,262782477	1,296552558	0,001140418		0,179124326
20	0,875449088	0,897675636	0,000494019		0,179752473
30	0,602588263	0,62285218	0,000410626		0,167605824
40	0,417953951	0,433500709	0,000241702		0,143009336
50	0,305820432	0,303038848	7,73721E-06		0,114865222
60	0,239758744	0,213151523	0,000707944		0,091149992
80	0,171350395	0,108549225	0,003943987		0,063740142
100	0,134322623	0,058893309	0,005689582		0,048784308
120	0,109784117	0,035321073	0,005544745		0,038980402
150	0,088525831	0,020985976	0,004561632		0,030000928
180	0,06932175	0,016297353	0,002811587	0,031566163	0,016679516
240	0,055300331	0,014262258	0,001684123		0,012572598
300	0,048454717	0,01404455	0,00118406		0,011982751
360	0,044466154	0,01402126	0,000926892		0,014534825
420	0,02652143	0,014018769	0,000156317		0
1290	0,040587659	0,01401847	0,000705922		0
1320	0,023651661	0,01401847	9,27984E-05		0
1380	0,01869936	0,01401847	2,19107E-05		0,004680889
1410	0,038824682	0,01401847	0,000615348		0
1440	0,018608933	0,01401847	2,10724E-05		0,004732542
1500	0,01401847	0,01401847	0		0
1530	0,038589618	0,01401847	0,000603741		0

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,01401847	**1,87547985**	**0,037252399**

7.1.5 Μετρήσεις ξήρανσης φύλλων δάφνης

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔΧ	ΣΔΧ	STDEVP
0	0,928729224	0,928729224	0		0,075891361
10	0,850227611	0,865775529	0,000241738		0,065696001
20	0,802387187	0,807110548	2,23101E-05		0,063063162
30	0,754789607	0,752442112	5,51074E-06		0,058206533
40	0,711542233	0,701497957	0,000100887		0,058073052
50	0,673484004	0,654024367	0,000378677		0,060374568
60	0,626529565	0,60978491	0,000280383		0,064542801
80	0,55708218	0,530142104	0,000725768		0,077590251
100	0,487702437	0,460980992	0,000714036		0,088963313
120	0,414365999	0,400922088	0,000180739		0,094161803
150	0,325291515	0,3253236	1,02942E-09		0,104007762
180	0,251689074	0,264146871	0,000155197	0,007922816	0,093998979
240	0,140943673	0,174578703	0,001131315		0,06238903
300	0,076742501	0,115924389	0,00153522		0,035497354
360	0,039939349	0,077514218	0,001411871		0,023067967
420	0,046596521	0,05236106	3,32299E-05		0
1140	0,021473051	0,004933606	0,000273553		0
1200	0,020184668	0,00483116	0,00023573		0
1350	0,006697579	0,004704239	3,9734E-06		0
1440	0,022783403	0,004672531	0,000328004		0,000155665
1470	0,004379186	0,004665712	8,20971E-08		0
1500	0,01748947	0,004660194	0,00016459		0,001002014
1590	0,004636785	0,00464919	1,5388E-10		0

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,004636785	**0,928729224**	**0,007055647**

7.1.6 Μετρήσεις ξήρανσης δενδρολίβανου

ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΦΟΡΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ-ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΣΦΑΛΜΑ
t	X (ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ)	Xth=Xe+(Xo-Xe)*exp(-kt)	ΔΧ	ΣΔΧ	STDEVP
0	2,053291802	2,053291802	0		0,075891361
10	1,701419688	1,8027355	0,010264894		0,065696001
20	1,468055372	1,583137816	0,013243969		0,063063162
30	1,308327841	1,390673519	0,006780811		0,058206533
40	1,159643107	1,22199002	0,003887138		0,058073052
50	1,052964032	1,074148975	0,000448802		0,060374568
60	0,930222569	0,9445751	0,000205995		0,064542801
80	0,764483314	0,731479412	0,001089258		0,077590251
100	0,610070085	0,567790408	0,001787571		0,088963313
120	0,497899728	0,442053043	0,003118852		0,094161803
150	0,368852382	0,305929736	0,003959259	0,071780184	0,104007762
180	0,264859024	0,214286638	0,002557566		0,093998979
240	0,167994186	0,111052293	0,003242379		0,06238903
300	0,108927657	0,064261679	0,00199505		0,035497354
360	0,077521132	0,043053993	0,001187984		0,023067967
420	0,159727479	0,033441682	0,015948103		0
1140	0,052138531	0,025473886	0,000711003		0
1200	0,035484481	0,025473558	0,000100219		0
1350	0,012849931	0,025473325	0,00015935		0
1440	0,004423489	0,025473298	0,000443094		0,000155665
1500	0,025473287	0,025473292	3,19264E-17		0,001002014

ΥΓΡΑΣΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΞΗΡΑΝΣΗΣ
Xe	Xo	k
0,025473287	**2,053291802**	**0,013188649**

7.2 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

				ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ								
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	**ΔΕΙΓΜΑ**	**Α/Α**	**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ml)**	**ΑΡΧΙΚΗ DPPH**	**0 min**	**5 min**	**10 min**	**20 min**	**30 min**	**40 min**	**50 min**	**60 min**
ΣΣ2	**Ρόδι φλούδα - εξάνιο**	1	1,5	0,848	0,656	-	0,635	0,629	0,63	0,632	-	-
		2	3	0,908	0,605	0,505	0,5	0,492	0,481	0,482	0,479	0,484
		3	3,4	0,962	0,577	0,532	0,513	0,49	0,476	0,468	0,461	0,46
ΣΣ9	**Δάφνη φύλλα – οξικός αιθυλεστέρας**	1	1,3	0,902	0,768	-	0,684	0,666	0,631	0,617	0,602	0,592
		2	1,95	0,914	0,659	0,51	0,485	0,452	0,427	0,405	0,38	0,362
		3	2,6	0,941	0,828	-	-	-	-	-	-	0,312
ΣΣ10	**Δάφνη φύλλα – 1-βουτανόλη**	1	2,5	0,745	0,704	0,415	0,358	0,279	0,243	0,212	0,193	0,175
		2	1,25	0,962	0,838	0,752	0,703	0,643	0,604	0,579	0,557	0,545
		3	0,625	0,957	0,864	0,817	0,79	0,749	0,723	0,711	0,694	0,689
ΣΣ11	**Δάφνη φύλλα - Νερό**	1	2,5	0,74	0,721	0,65	0,631	0,597	0,583	0,566	0,558	0,551
		2	4,6	0,973	0,922	0,872	0,841	0,799	0,778	0,766	0,76	0,753
		3	1,25	0,959	0,926	0,9	0,881	0,858	0,844	0,834	0,826	0,823
ΣΣ14	**Ρόδι πούλπα - Νερό**	1	50	1,229	1,009	0,962	0,934	0,879	0,83	0,787	0,752	0,733
		2	125	1,198	0,9	0,756	0,645	0,569	0,525	0,498	0,47	0,442
		3	250	1,205	0,85	0,624	0,441	0,339	0,285	0,247	0,22	0,195
ΣΣ25	**Ρόδι φλούδα – οξικός αιθυλεστέρας**	1	0,175	0,732	0,67	0,38	0,3	0,267	0,243	0,225	0,218	0,207
		2	0,0875	0,974	0,821	0,75	0,728	0,705	0,694	0,688	0,681	0,678
		3	0,04375	0,966	0,888	0,852	0,841	0,834	0,828	0,825	0,818	0,816
ΣΣ26	**Ρόδι φλούδα – 1-βουτανόλη**	1	0,35	0,752	0,62	0,333	0,297	0,254	0,236	0,222	0,208	0,199
		2	0,175	0,958	0,728	0,658	0,64	0,617	0,61	0,603	0,598	0,59
		3	0,0875	0,96	0,833	0,8	0,791	0,78	0,776	0,771	0,769	0,761

				ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ΣΥΝΕΧΕΙΑ)								
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	**ΔΕΙΓΜΑ**	**Α/Α**	**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ml)**	**ΑΡΧΙΚΗ DPPH**	**0 min**	**5 min**	**10 min**	**20 min**	**30 min**	**40 min**	**50 min**	**60 min**
ΣΣ27	**Ρόδι φλούδα - Νερό**	1	0,17	0,882	0,703	-	0,675	0,666	0,665	0,667	-	-
		2	0,085	0,851	0,734	-	0,715	0,714	0,72	0,724	-	-
		3	0,37	0,751	0,649	0,432	0,404	0,371	0,356	0,343	0,33	0,324
ΣΣ28	**Μανταρίνι φλούδα-οξικός αιθυλεστέρας**	1	1,8	0,905	0,786	0,716	0,705	0,689	0,681	0,673	0,66	0,654
		2	3	0,909	0,771	0,654	0,635	0,61	0,593	0,577	0,566	0,553
		3	4	0,952	0,772	0,644	0,601	0,532	0,507	0,472	0,453	0,429
ΣΣ29	**Μανταρίνι φλούδα-1-βουτανόλη**	1	3,4	0,777	0,69	0,648	0,626	0,572	0,555	0,556	0,527	0,595
		2	5,2	0,957	0,829	0,745	0,716	0,669	0,651	0,624	0,609	0,596
		3	1,7	0,945	0,883	0,844	0,83	0,806	0,796	0,784	0,775	0,762
ΣΣ32	**Δενδρολίβανο - αιθανόλη (ultrasonic)**	1	1,75	0,912	0,552	0,42	0,402	0,376	0,355	0,337	0,317	0,302
		2	0,875	0,928	0,779	0,667	0,657	0,644	0,635	0,629	0,623	0,617
		3	2	0,897	0,458	-	-	-	-	-	-	0,201
ΣΣ40	**Ρόδι φλούδα-αιθανόλη (ultrasonic)**	1	0,115	0,852	0,707	-	0,652	0,641	0,644	0,651	-	-
		2	0,3	0,754	0,646	0,421	0,378	0,335	0,317	0,298	0,291	0,283
		3	0,046	0,837	0,768	-	0,745	0,748	0,758	0,764	-	-
ΣΣ44	**Ρόδι φλούδα - Νερό (ultrasonic)**	1	0,05	0,93	0,863	0,828	0,822	0,813	0,807	0,802	0,797	0,79
		2	0,25	0,938	0,646	0,549	0,521	0,492	0,475	0,464	0,454	0,447
		3	0,125	0,933	0,757	0,709	0,693	0,678	0,668	0,662	0,655	0,65
ΣΣ50	**Ρόδι φλούδα - Νερό (microwave)**	1	0,5	0,943	0,516	0,358	0,317	0,276	0,253	0,235	0,221	0,211
		2	0,25	0,98	0,729	0,687	0,611	0,586	0,572	0,563	0,554	0,546
		3	0,125	0,941	0,793	0,745	0,736	0,721	0,716	0,709	0,702	0,695
		4	0,05	0,929	0,866	0,837	0,831	0,822	0,817	0,811	0,806	0,802