



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Βελτιστοποίηση εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το
βότανο Λουίζα, *Lippia citriodora***

Κωνσταντίνος Μακρής
Τεχνολόγος Τροφίμων

ΑΘΗΝΑ
ΜΑΡΤΙΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τίτλος

**Βελτιστοποίηση εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων από το βότανο
Λουίζα, *Lippia citriodora***

Κωνσταντίνος Μακρής

A.M.: 51401

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Χαράλαμπος Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Παναγιώτα Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Χαράλαμπος Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παναγιώτης Ζουμπουλάκης, Ερευνητής Γ', ΕΙΕ

Ημερομηνία Εξέτασης 01/ 03/ 2017

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία βελτιστοποιήθηκε η εκχύλιση των περιεχόμενων ολικών φαινολικών από τα φύλλα του βοτάνου της λουίζας, *Lippia citriodora* με την σύγχρονη τεχνική εκχύλισης υψηλής ενεργειας των υπερήχων. Για την βελτιστοποίηση χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος του Πειραματικού σχεδιασμού με χρήση Επιφανειών Απόκρισης και τα σχέδια πειραμάτων Δοκιμής Ελέγχου (Screening Values) και Box – Behnken. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και εκχυλίσεις με την κλασική μέθοδο εκχύλισης σε δύο χρόνους 20 min και 24 h, προκειμένου να γίνει αντιληπτή η δράση των υπερήχων κατά την εκχύλιση. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των εκχυλισμάτων και από τις δύο τεχνικές εκχύλισης με τις μεθόδους προσδιορισμού συγκέντρωσης ολικών φαινολικών Folin – Ciocalteu, προσδιορισμού της αντιριζικής δράσης της ρίζας ABTS και προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής – αναγωγικής δράσης με την μέθοδο FRAP.

Θεματική περιοχή: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: *Lippia citriodora*, λουίζα, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση, πειραματικός σχεδιασμός, μέθοδος επιφανειών απόκρισης, UAE.

Abstract

In the present study, the extraction of the total phenolic content of lemon verbena, *Lippia citriodora* was optimized. The modern high energy technique of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) was used for this purpose. Also, the design of the experiments was set with the statistical method of Screening Values and Box – Behnken Design while the interpretation of the experimental responses was achieved with the use of Response Surface Methodology. Classical extractions were performed according to the optimized variables of UAE and in two different time durations of 20 min and 24 h, in order to comprehend the effect of the ultrasounds in the extraction process. Finally, three different methods of determination of the extracts' antioxidant profile were used, the methods of total phenolic content Folin – Ciocalteu, the antiradical effect on ABTS radical and the antioxidant – reductive effect of FRAP method.

Subject area: Food Chemistry

Keywords: *Lippia citriodora*, lemon verbena, phenolic compounds, antioxidant activity, experimental design, response surface methodology, UAE.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στο Εργαστήριο Ενόργανης Χημείας του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθηνών.

Επιβλέπων της εν λόγω ερευνητικής εργασίας ήταν ο κ. Χαράλαμπος Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής του Ε.Κ.Π.Α., τον οποίον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια εκτέλεσης της εργασίας.

Ευχαριστώ την κα. Παναγιώτα Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Ε.Κ.Π.Α. ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Γ' του Ε.Ι.Ε., για την καθοδήγηση, βοήθεια, και ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλην τη διάρκεια των πειραμάτων, την πολύτιμη βοήθεια και τη σημαντική συμβολή του στην εκπόνηση της εν λόγω εργασίας.

Θεωρώ ιδιαίτερα σημαντικό να ευχαριστήσω την κα. Βασιλεία Σινάνογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, για την άριστη συνεργασία, την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή της, και η οποία συνεχίζει να με διδάσκει με συνέπεια πολύτιμες γνώσεις και ιδέες μέχρι και σήμερα.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο του Τομέα Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., το προσωπικό στα εργαστήρια του Ε.Ι.Ε. και ιδιαίτερες τις υποψήφιες διδάκτορες κα. Θάλεια Τσιάκα και Δήμητρα Λαντζουράκη για το άψογο κλίμα συνεργασίας και τη συνεισφορά τους στις πειραματικές εργασίες αλλά και στη βελτίωση των ερευνητικών και αναλυτικών ικανοτήτων μου.

*Τετάρτη 3 Μαρτίου,
Αθήνα, 2017.*

Κωνσταντίνος Μακρής

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	9
Κατάλογος Σχημάτων.....	11
Κατάλογος Εικόνων.....	13
Κατάλογος Πινάκων.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.1. Φυτοχημικά – Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών.....	17
1.1.1. Φυτοχημικές ενώσεις.....	17
1.1.2. Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών.....	18
1.1.2.1 Φλαβονοειδείς Φαινολικές Ενώσεις.....	18
1.1.2.2. Μη Φλαβονοειδείς Φαινολικές Ενώσεις.....	22
1.2. Αρωματικά Φυτά και Βότανα.....	25
1.2.1. Τεχνικές Εκχύλισης Αρωματικών Φυτών.....	26
1.2.2. Λουίζα (<i>Lippia citriodora</i>).....	26
1.2.3. Αναλύσεις περιεχομένων βιοδραστικών ενώσεων της λουίζας (<i>Lippia citriodora</i>).....	27
1.2.4. Χημική Σύσταση της λουίζας (<i>Lippia citriodora</i>).....	28
1.2.5. Βιοδράση των εκχυλισμάτων της <i>Lippia citriodora</i>	29
1.3. Εκχυλίσεις με χρήση Σύγχρονων Τεχνικών.....	30
1.3.1. Εκχύλιση με τη δράση Ενζύμων.....	30
1.3.2. Εκχύλιση με τη χρήση Υπερκρίσιμων Ρευστών.....	31
1.3.3. Εκχύλιση με τη χρήση Υγρού Υπό Πίεση.....	32
1.3.3. Εκχυλίσεις με την χρήση Τεχνικών Υψηλής Ενέργειας.....	33
1.3.3.1. Εκχύλιση με τη χρήση Μικροκυμάτων.....	33
1.3.3.1. Εκχύλιση με τη χρήση Παλλόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου.....	34
1.3.3.2. Εκχύλιση με τη χρήση Υπερήχων.....	35
1.4. Βελτιστοποίηση απόδοσης τεχνικών εκχύλισης - Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης.....	35
1.4.1. Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης – (Response Surface Methodology - RSM).....	36
1.4.2. Δοκιμή Ελέγχου των Παραγόντων.....	37
1.4.3. Σχέδιο Box – Behnken (BBD).....	37
1.5. Σκοπός της παρούσας Ερευνητικής Μελέτης.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	39
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1. Διάγραμμα της πειραματικής πορείας.....	39
2.2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες.....	40
2.2.2. Συσσκευές και επιστημονικά όργανα.....	41
2.3. Δείγματα της λουίζας (<i>Lippia citriodora</i>) που μελετήθηκαν.....	43
2.4. Επεξεργασία των δειγμάτων.....	43
2.4.1. Εκχύλιση στερεού – υγρού με χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction, UAE) των φαινολικών συστατικών από τα φύλλα της λουίζας (<i>Lippia</i>	44
2.4.2. Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού–υγρού των φαινολικών συστατικών από την λουίζα (<i>Lippia citriodora</i>).....	45
2.5. Μέθοδοι αξιολόγησης του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των εκχυλισμάτων της λουίζας (<i>Lippia citriodora</i>).....	45
2.5.1. Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu.....	46
2.5.2. Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS ^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)].....	47
2.5.3. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής – αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδος Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP.....	49

2.6. Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης.....	51
2.7. Στατιστική Ανάλυση.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	54
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
3.1. Προκαταρκτικά Πειράματα.....	54
3.1.1. Επίδραση της έντασης της ισχύος των υπερήχων κατά την UAE.....	54
3.1.2. Επίδραση των διαλυτών κατά την UAE.....	54
3.1.3. Επίδραση της Παλμικής Συχνότητας κατά την UAE.....	55
3.2. Δοκιμή ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για την Βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε Ολικά φαινολικά.....	56
3.2.1. Επιφάνειες απόκρισης για την Δοκιμή Ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για την Βελτιστοποίηση της Απόδοσης της UAE σε Ολικά Φαινολικά.....	60
3.3. Βελτιστοποίηση των παραγόντων της UAE ολικών φαινολικών.....	64
3.3.1. Στατιστική ανάλυση και εφαρμογή του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box – Behnken (BBD).....	64
3.3.2. Επιφάνειες απόκρισης για το BDD της UAE των ολικών περιεχόμενων φαινολικών.....	68
3.3.3. Απόδειξη της ικανότητας πρόβλεψης του BBD της UAE.....	72
3.4. Σύγκριση τιμών ανάκτησης ολικών φαινολικών μεταξύ κλασικής μεθόδου εκχύλισης και UAE.....	73
3.5. Αποτίμηση του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των φύλλων της <i>Lippia citriodora</i>	74
3.6 Συμπεράσματα.....	76
Παράρτημα 1 - Πίνακες.....	81
Παράρτημα 2 - Σχήματα.....	81
Συντημήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια – Ξενόγλωσσοι Όροι.....	83
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	86

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1.: Χημικές δομές των φλαβονολών καεμπφερόλη, κερκετίνη, ισοραμνετίνη και μυρικετίνη. ⁵	20
Σχήμα 1.2.: Χημικές δομές των άγλυκων φλαβανονών εσπερετίνη και ναρινγενίνη, και του φλαβανονικού γλυκοζίτη εσπεριδίνη. ⁵	21
Σχήμα 1.3.: Χημικές δομές των άγλυκων ισοφλαβονών δαΐδζεΐνη και γενιστεΐνη, και τριών Ο-γλυκοζιτών της δαΐδζεΐνης που απαντώνται μεταξύ άλλων σε προϊόντα σόγιας. ⁵	22
Σχήμα 1.4.: Χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανιδινών (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη) που απαντώνται σε φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης. ⁸	22
Σχήμα 1.5.: Γενική χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμωμικών οξέων, και παραδείγματα ενώσεων που απαντώνται σε τρόφιμα και φαρμακοτρόφιμα (nutraceuticals). ⁷	24
Σχήμα 1.6.: Υδρολυόμενη ταννίνη, Γαλλικό οξύ, Συμπυκνωμένη ή Μη Υδρολυόμενη ταννίνη, Φλαβόνη, Φλωροταννίνη, Φλωρογλυκινόλη.....	25
Σχήμα 1.7.: Χημική δομή της cis και trans ρεσβερατρόλης και του 3-Ο-γλυκοζίτη της trans αντίστοιχα.....	25
Σχήμα 1.8.: Εντεροδιόλη και Εντερολακτόνη αντίστοιχα.....	26
Σχήμα 1.9.: Πειραματικά σχέδια βασισμένα στην μελέτη όλων των παραγόντων σε τρία επίπεδα: τριεπίπεδο παραγοντικό σχέδιο για την βελτιστοποίηση (α) δύο παραγόντων, (b) τριων παραγόντων και (c) σχέδιο Box – Behnken για την βελτιστοποίηση τριων παραγόντων. ³¹	38
Σχήμα 2.1.: Διάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα του βοτάνου της λουίζας.....	40
Σχήμα 2.2.: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e ⁻ . ⁴	46
Σχήμα 2.3.: Δομή της ρίζας ABTS●+ που απορροφά στα 734 nm. ⁵	48

Σχήμα 2.4.: Αναγωγή σιδήρου.....	50
Σχήμα 3.1.: Διάγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων της UAE.....	58
Σχήμα 3.2.: Διάγραμμα παρατηρούμενων έναντι προβλεπόμενων τιμών της Δοκιμής ελέγχου της UAE.....	59
Σχήμα 3.3.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή την τιμή της Αναλογίας διαλυτών/ δείγματος, 20mLg ⁻¹	60
Σχήμα 3.4.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή την τιμή του Χρόνου, 20 min.....	61
Σχήμα 3.5.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή την τιμή της Αναλογίας Μεθανόλης/ Νερού, 90%.....	62
Σχήμα 3.6.: Διάγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων της UAE.....	66
Σχήμα 3.7.: Διάγραμμα παρατηρούμενων έναντι προβλεπόμενων τιμών της Δοκιμής ελέγχου της UAE.....	67
Σχήμα 3.8.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή τιμή της αναλογίας μεθανόλης/ νερού, 80% MeOH.....	68
Σχήμα 3.9.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή την τιμή της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος, 20 mLg ⁻¹	69
Σχήμα 3.10.: Επιφάνεια Απόκρισης με σταθερή την τιμή του χρόνου, 20 min.....	70
Σχήμα 3.11.: Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο προσδιορισμού συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών, Folin – Ciocalteu.....	72
Σχήμα 3.12.: Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής Εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο αποτίμησης in vitro της αντιριζικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της <i>L. citriodora</i>	74
Σχήμα 3.13.: Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής Εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο αποτίμησης in vitro της αναγωγικής – αντιοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της <i>L. citriodora</i>	75

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1.: Ανθισμένο κλαδί <i>Lippia citriodora</i> , λουίζα.....	27
Εικόνα 2.1.: Συσκευή δημιουργίας υπερήχων (US) με Probe της Sonics & Materials (USA).....	43

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1.: Ιδιότητες διαλυτών UAE.....	54
Πίνακας 3.2.: Σύγκριση του Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου επιλεγμένων Παλμικών Συχνοτήτων κατά τις UAE.....	55
Πίνακας 3.3.: Πειραματικές τιμές της Δοκιμής Ελέγχου των οριακών τιμών των παραγόντων προς βελτιστοποίηση της UAE ολικών φαινολικών.....	56
Πίνακας 3.4.: ANOVA της ανάκτησης ολικών φαινολικών μέσω της UAE.....	57
Πίνακας 3.5.: Προτεινόμενες τιμές παραγόντων με βάση τα αποτελέσματα της Δοκιμής Ελέγχου.....	63
Πίνακας 3.6.: Πειράματα του BDD και αποτελέσματα ολικών φαινολικών για τις UAE.....	64
Πίνακας 3.7.: ANOVA της ανάκτησης ολικών φαινολικών μέσω της UAE.....	65
Πίνακας 3.8.: Προβλεπόμενες και παρατηρούμενες αποκρίσεις των βέλτιστων τιμών των παραγόντων.....	71
Πίνακας 3.9.: Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε mg GAE ανά g ξηρού δείγματος <i>L. citriodora</i> . (Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, n=3).....	72
Πίνακας 3.10.: Αποτελέσματα των μεθόδων ABTS $\cdot+$ και FRAP. (Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, n=3).....	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Φυτοχημικά – Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών

1.1.1. Φυτοχημικές ενώσεις

Τα φυτά συνθέτουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων που παραδοσιακά διαχωρίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με βάση το ρόλο που επιτελούν στο φυτικό μεταβολισμό. Στα πρωτογενή συστατικά ανήκουν τα κοινά σάκχαρα, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, οι πουρίνες και πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων, η χλωροφύλλη, οι φυτοστερόλες, τα ακυλολιπίδια, τα νουκλεοτίδια, τα οργανικά οξέα κ.ά. Στα δευτερογενή συστατικά ανήκουν τα εναπομείναντα χημικά στοιχεία των φυτών, όπως τα αλκαλοειδή (που προέρχονται από τα αμινοξέα), τα τερπένια (ομάδα λιπιδίων) και τα φαινολικά (που προέρχονται από τους υδατάνθρακες).[1] Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τις ουσίες του πρωτογενούς μεταβολισμού στο ότι είναι μη-αναγκαίες ουσίες για τις βασικές μεταβολικές λειτουργίες της ανάπτυξης και εξέλιξης του φυτού. Είναι, ωστόσο, σαφώς καθοριστικά συστατικά για πολλές σημαντικές φυτικές διεργασίες.[2]

Ως φυτοχημικά συστατικά μπορούν να οριστούν τα χημικά προϊόντα που παράγονται από τα φυτά. Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις χημικές ενώσεις των φυτών, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την υγεία, αλλά δεν είναι απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Καθώς, υπάρχουν επαρκή δεδομένα να υποστηρίξουν τα οφέλη για την υγεία μιας διατροφής πλούσιας σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά ολικής αλέσεως και καρπούς, οι αποδείξεις ότι αυτά οφείλονται σε συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά ή φυτοχημικά είναι περιορισμένες. Επειδή, τα τρόφιμα που έχουν τη βάση τους σε φυτά είναι περίπλοκα μίγματα βιοδραστικών ενώσεων, πληροφορίες για τα πιθανά οφέλη για την υγεία συγκεκριμένων φυτοχημικών είναι συνδεδεμένα με την πληροφορία για την επίδραση στην υγεία τροφών τα οποία περιέχουν αυτά τα φυτοχημικά.[3]

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Χωρίζονται σε διάφορες τάξεις π.χ. φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά οξέα και υδροξυκινναμικά οξέα), флаβονοειδή (φλαβονόλες, флаβόνες, флаβανόλες, флаβανόνες, ισοφλαβόνες, προανθοκυανιδίνες), στιλβένια και λιγνάνες, τα οποία περιέχονται στα φυτά και τα φυτικά προϊόντα τροφίμων. Τα φαινολικά συστατικά είναι σημαντικά για την ποιότητα

των φρούτων, καθώς συνεισφέρουν στη γεύση, το χρώμα και τις θρεπτικές ιδιότητες του φρούτου.[3]

Έχει αποδειχθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις δρουν ως αντιοξειδωτικά αναστέλλοντας την οξειδωση της LDL – λιποπρωτεΐνης, την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την καταστροφή των ερυθρών κυττάρων. Επιπρόσθετα, οι φαινολικές ενώσεις δρουν ως: 1) χηλικοί παράγοντες μετάλλων, 2) αντικαρκινογόνες και αντιμεταλλαξιογόνες ουσίες, 3) αντιμικροβιακοί παράγοντες και 4) μεταβολομικοί δείκτες. Είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα του κρασιού, την αστυπτικότητα και πικρή του γεύση καθώς και το σύνολο των χαρακτηριστικών γεύσης του. Προέρχονται από τα φρούτα και τα διάφορα στελέχη της αμπέλου ή από τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων. Επιπρόσθετα, τα φαινολικά συστατικά δρουν και ως σημαντικές αποθήκες οξυγόνου και υποστρώματα των αντιδράσεων αμαύρωσης.[3]

1.1.2. Κατηγοριοποίηση Πολυφαινολών

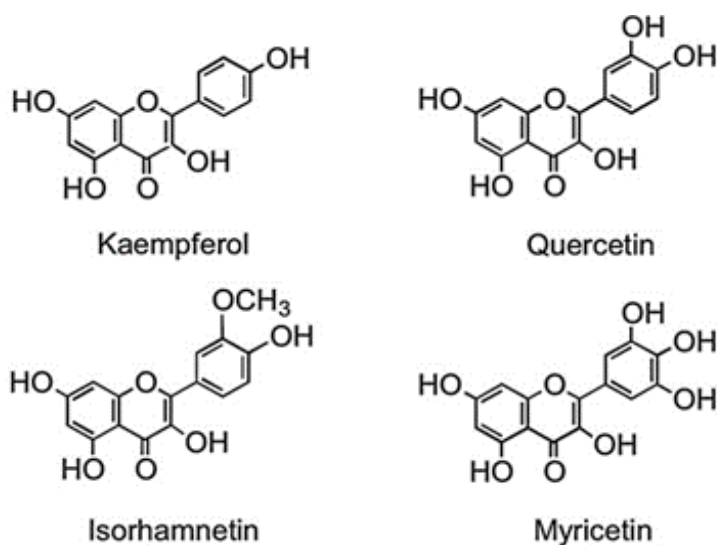
Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται συνήθως στα εδώδιμα και μη εδώδιμα φυτά και έχουν αναφερθεί οι πολλαπλές βιολογικές τους δράσεις, συμπεριλαμβανομένης και της αντιοξειδωτικής. Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα από φρούτα, βότανα, λαχανικά και δημητριακά πλούσια σε φαινολικά συστατικά, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων για την επιβράδυνση της οξειδωσης των λιπαρών υλών των τροφίμων και την βελτίωση της διατροφικής τους αξίας.[3] Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν μία μεγάλη ποικιλία μορίων τα οποία έχουν μια πολυφαινολική δομή (δηλαδή, διάφορες ομάδες υδροξυλίων σε αρωματικούς δακτυλίους), αλλά και μόρια όπως τα φαινολικά οξέα και οι φαινολικές αλκοόλες. Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διαφορετικές ομάδες με βάση τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που εμπεριέχουν, τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζονται οι δεσμοί μεταξύ των δακτυλίων και τις λειτουργικές ομάδες που σχηματίζουν ένωση με αυτούς. Έτσι, οι διακρίσεις που γίνονται είναι σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια και λιγνάνες.[4]

1.1.2.1 Φλαβονοειδείς Φαινολικές Ενώσεις

Περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες, περιλαμβανομένων πάνω από 4000 φλαβονοειδών έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ ο αριθμός τους συνεχίζει να αυξάνεται. Μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω στις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες και φλαβανόλες. Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενες από δεκαπέντε άτομα άνθρακα, διατεταγμένα σε C6-C3-C6 διαμόρφωση.

Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, Α και Β, ενωμένους με από μία γέφυρα τριών ανθράκων, συνήθως με τη μορφή ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, Γ. Ο αρωματικός δακτύλιος Α προέρχεται από το μεταβολικό μονοπάτι των οξικού/ μαλονικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος Β προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη μέσω του μεταβολικού μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Διαφοροποιήσεις στο πρότυπο υποκατάστασης του δακτυλίου Γ έχει ως αποτέλεσμα τις διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών, τα οποία είναι οι φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, (ή κατεχίνες), ισοφλαβόνες, φλαβανονόλες και ανθοκυανιδίνες, εκ των οποίων οι φλαβόνες και φλαβονόλες είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες και ποικίλες δομικά. Τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερως σημαντικά αντιοξειδωτικά εξαιτίας της υψηλής αναγωγικής τους ισχύος, η οποία τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου και παράγοντες εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Επιπρόσθετα, έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν σύμπλοκα μετάλλων. Αποτελούν τα πιο κοινά απαντώμενα φυτοχημικά συστατικά, τα οποία προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία, τους παρασιτικούς μύκητες, τα φυτοφάγα ζώα, τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τον τραυματισμό των κυττάρων από οξειδωση. Η συχνή κατανάλωση από τον άνθρωπο έχει συσχετιστεί με την μείωση του ποσοστού εμφάνισης ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις. Η έρευνα των φλαβονοειδών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας μιας πιθανής βελτίωσης της δημόσιας υγείας μέσω της διατροφής, όπου η προληπτική ιατρική φροντίδα μπορεί να προωθηθεί μέσω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών.

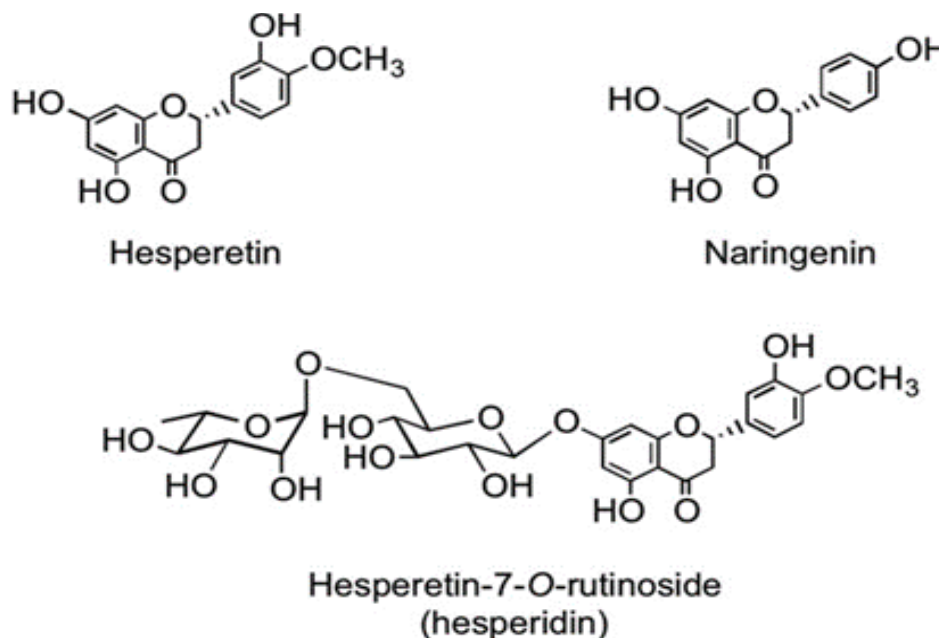
Φλαβονόλες: Οι φλαβονόλες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών συχνά ανιχνεύσιμη σε πολλά φρούτα και λαχανικά, το περιεχόμενο των οποίων διαφέρει σημαντικά, εξαρτώμενο



Σχήμα 1.1.: Χημικές δομές των φλαβονολών καεμπφερόλη, κερκετίνη, ισοραμνετίνη και μυρικετίνη.[5]

από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως, οι συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα, οι συνθήκες αποθήκευσης και μαγειρέματος.[4] Οι φλαβονόλες, όπως η μυρικετίνη, η κερκετίνη, η ισοραμνητίνη και η καεμπφερόλη απαντώνται συνήθως ως Ο-γλυκοζίτες.[6]

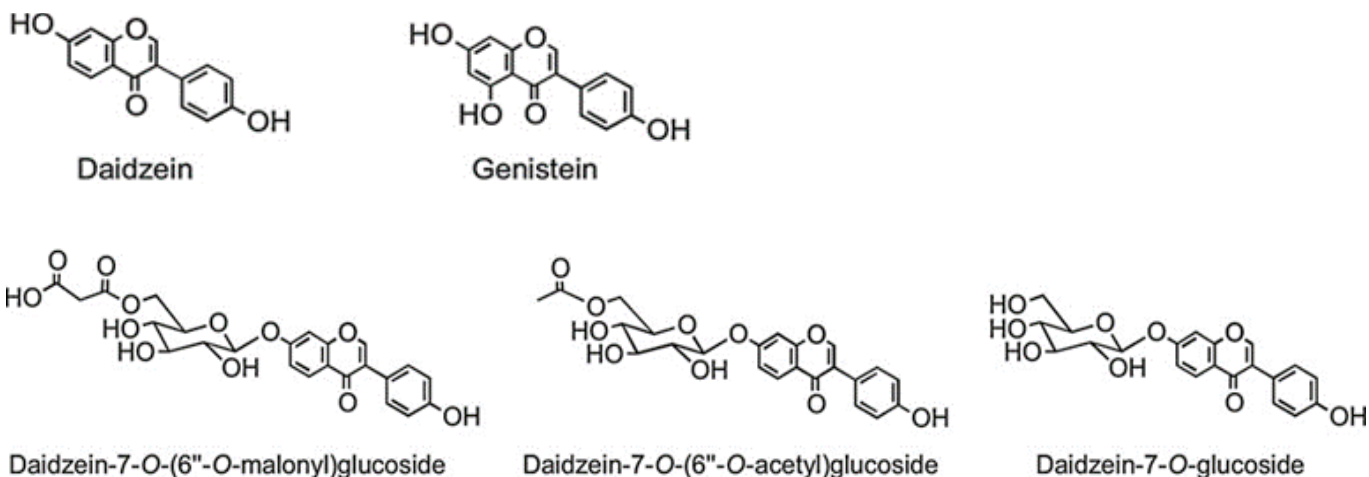
Φλαβανόνες: Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας κορεσμένης ανθρακικής αλυσίδας και ενός ατόμου οξυγόνου στον C4.



Σχήμα 1.2.: Χημικές δομές των άγλυκων φλαβανονών εσπερετίνη και ναρινγενίνη, και του φλαβανονικού γλυκοζίτη εσπεριδίνη.[5]

Συνήθως είναι γλυκοζιωμένες από ένα δισακχαρίτη στον C7. Οι φλαβανόνες βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε εσπεριδοειδή και σε τομάτες όπως και σε μερικά αρωματικά φυτά όπως η μέντα. Οι κυριότερες μη γλυκοζιωμένες είναι η ναρινγενίνη στα γκρέιπφρουτ, η εσπεριτίνη στα πορτοκάλια και η εριοδικτυόλη στα λεμόνια.[7]

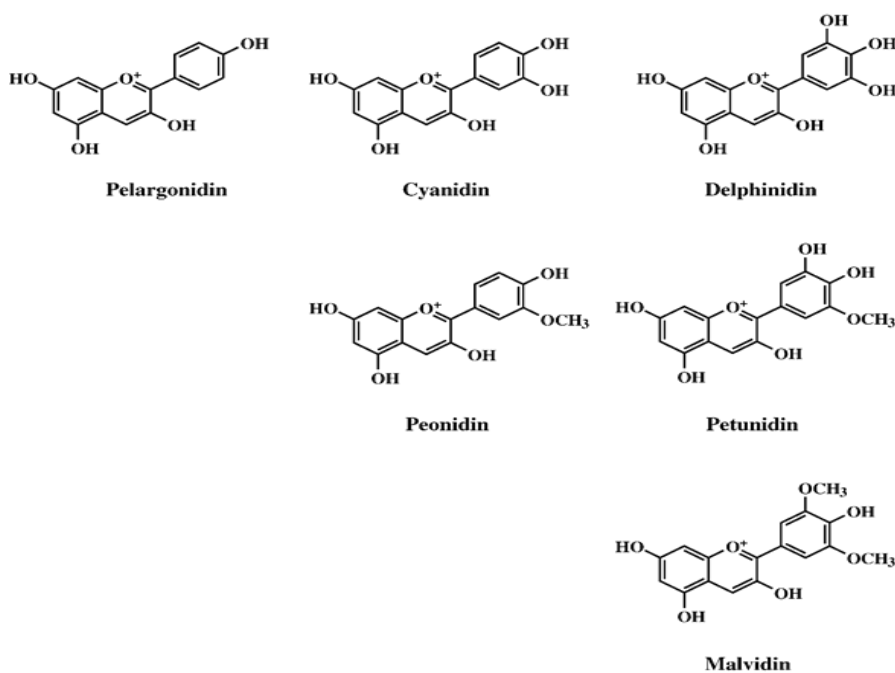
Ισοφλαβόνες: Οι ισοφλαβόνες έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα δηλαδή, ομάδα υδροξυλίου στους C7 και C4 όπως και το μόριο της εστραδιόλης. Υπάρχουν φυτοχημικά συστατικά, τα οποία βρίσκονται σε πολλά φυτά και φυτικά τρόφιμα και με τη φυσική τους μορφή (άγλυκα) αλλά και ως γλυκοζίτες συζευγμένοι με οξικό, μηλονικό και άλλα οξέα. Τους έχουν αποδοθεί σημαντικά οφέλη για την υγεία και ως εκ τούτου έχει προταθεί να χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή θεραπεία νόσων όπως η αθηροσκλήρωση και ο καρκίνος.



Σχήμα 1.3.: Χημικές δομές των άγλυκων ισοφλαβονών δαϊδζεΐνη και γενιστεΐνη, και τριών Ο-γλυκοζιτών της δαϊδζεΐνης που απαντώνται μεταξύ άλλων σε προϊόντα σόγιας.[5]

Κάποιες φυσιολογικές δράσεις τους αποδίδονται στις δομικές ομοιότητες με τις β-εστραδιόλες και αναφέρονται συχνά ως φυτοοιστρογόνα.[4]

Ανθοκυανίνες: Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές που εντοπίζονται στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων και εμφανίζονται ως κόκκινες, μωβ ή μπλε ανάλογα με το pH. Ανήκουν και αυτές στην οικογένεια των μορίων φλαβονοειδών, ενώ συνθέτονται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών. Βρίσκονται σε όλους τους φυτικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των βλαστών, των ριζών, των ανθέων και των καρπών. Οι ανθοκυανιδίνες είναι οι βασικές δομές των ανθοκυανών.



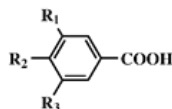
Σχήμα 1.4.: Χημικές δομές των κυριότερων ανθοκυανιδινών (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη) που απαντώνται σε φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης.[8]

Αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο Α ενωμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο Γ, ο οποίος περιέχει ένα οξυγόνο, και συνδέεται με έναν δεσμό άνθρακα – άνθρακα με ένα τρίτο αρωματικό δακτύλιο Β. Όταν, οι ανθοκυανιδίνες βρεθούν στην γλυκοζιτική μορφή τους τότε είναι γνωστές ως ανθοκυάνες. Τα γλυκοζιτικά παράγωγα που είναι τα πιο συχνά στη φύση, είναι η πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη, η πεονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουινιδίνη και η μαλβιδίνη. Οι μη μεθυλιωμένες ανθοκυανιδίνες πελαργονιδίνη-Pg, κυανιδίνη-Cy, δελφινιδίνη-Dp βρίσκονται στο 80% των έγχρωμων φύλλων, στο 69% των φρούτων και στο 50% των ανθών. Τα σάκχαρα που βρίσκονται συχνά συνδεδεμένα στις ανθοκυανιδίνες είναι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και αραβινόζη) και οι δι- και τρισκαχαρίτες που σχηματίζονται από τον συνδυασμό των μονασακχαριτών αυτών. Επιπλέον, πολλές ανθοκυανίνες έχουν σάκχαρα συνδεδεμένα με αρωματικά ή αλειφατικά οξέα. Η σταθερότητά τους βασίζεται σε αρκετούς παράγοντες όπως, το pH, η θερμοκρασία, η χημική δομή, η συγκέντρωση, ο φωτισμός, το οξυγόνο, οι διαλύτες, η παρουσία ενζύμων, τα φλαβονοειδή, οι πρωτεΐνες και τα μεταλλικά ιόντα. Οι ανθοκυανίνες, όπως και άλλα φαινολικά, μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά με την προσφορά ενός υδρογόνου σε μια ιδιαίτερα δραστική ρίζα, με συνέπεια την αποτροπή περαιτέρω σχηματισμού ριζών. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα βασίζεται στον αριθμό και διάταξη των ομάδων υδροξυλίου και στην έκταση της δομικής σύζευξης, όπως και στην παρουσία υποκαταστατών που δίνουν και προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια στη δομή του δακτυλίου. Οι ανθοκυανίνες διαθέτουν γνωστές φαρμακευτικές ιδιότητες και ισχυρή βιολογική δράση ως αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτικά. Τα τελευταία χρόνια, οι συνθετικές χρωστικές τροφίμων έχουν απαγορευτεί σε πολλές χώρες εξαιτίας της τοξικότητας και της καρκινογενούς τους δράσης. Οι ανθοκυανίνες ως φυσικές χρωστικές παραλαμβάνονται εύκολα από φρούτα και λαχανικά, μπορούν να θεωρηθούν ικανά υποκατάστατα των συνθετικών, ενώ η λαμπρότητα των χρωμάτων τους και η διαλυτότητα τους στο νερό τους επιτρέπει την εύκολη ενσωμάτωση τους σε υδατικά συστήματα τροφίμων. Επιπρόσθετα, η αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση τους, που σχετίζεται με την αποτροπή αριθμού εκφυλιστικών ασθενειών, παρέχει επιπλέον οφέλη στο τρόφιμο που προστίθενται.[4]

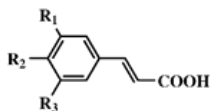
1.1.2.2. Μη Φλαβονοειδείς Φαινολικές Ενώσεις

Φαινολικά οξέα: Τα φαινολικά οξέα αποτελούν περίπου το ένα τρίτο των διαιτητικών φαινολών και εμπεριέχονται στα φυτά, σε ελεύθερη ή δεσμευμένη μορφή. Τα δεσμευμένα φαινολικά οξέα μπορεί να συνδέονται με διάφορα φυτικά συστατικά μέσω εστερικών και αιθερικών δεσμών. Η ποικιλία των μορφών των φαινολικών οξέων έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των κατάλληλων συνθηκών της εκχύλισης τους και ευαισθησίας τους στην

υποβάθμιση. Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά περιλαμβάνουν το γαλλικό, το *p*-υδροξυβενζοϊκό, το πρωτοκατεχινικό, το βανιλλικό και το συρινγικό οξύ, τα οποία έχουν κοινή την δομή των ανθράκων C6-C1. Τα υδροξυκινναμικά οξέα από την άλλη, είναι αρωματικές ενώσεις με μία πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων (C6-C3), ενώ τα πιο αντιπροσωπευτικά είναι το καφεϊκό, το φερουλικό, το *p*-κουμαρικό και σιναπτικό οξύ.[4]



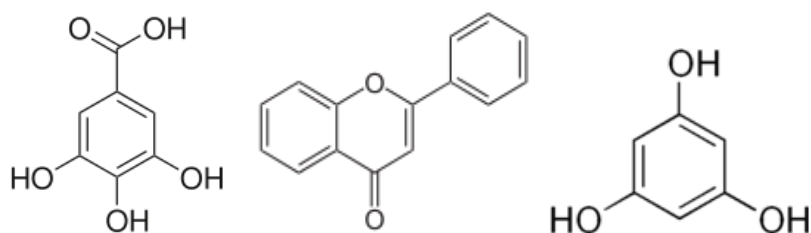
Acid		R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -Hydrobenzoic	4-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	3,4-Dihydroxybenzoic	OH	OH	H
Vanillic	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic	OCH ₃	OH	H
Syringic	3, 5-Dimethoxybenzoic	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gallic	3,4,5-Trihydroxybenzoic	OH	OH	OH



Acid		R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -Coumaric	4-Hydroxycinnamic	H	OH	H
Caffeic	3,4-Dihydroxycinnamic	OH	OH	H
Ferulic	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic	OCH ₃	OH	H
Sinapic	4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamic	OCH ₃	OH	OCH ₃

Σχήμα 1.5.: Γενική χημική δομή των υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκινναμικών οξέων, και παραδείγματα ενώσεων που απαντώνται σε τρόφιμα και φαρμακοτρόφιμα (nutraceuticals).[7]

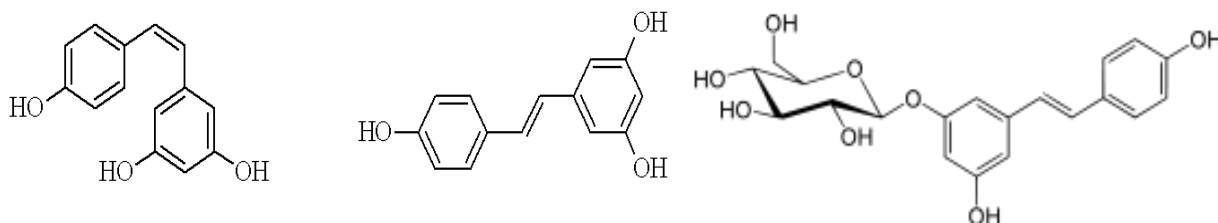
Ταννίνες: Οι ταννίνες, σχετικά μεγάλου μεγέθους μόρια, τα οποία αποτελούν την τρίτη μεγαλύτερη ομάδα φαινολικών συστατικών, μπορούν να χωριστούν σε εκείνες που υδρολύονται και στις συμπυκνωμένες. Οι προανθοκυανιδίνες ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία και είναι πολυμερή των φλαβονοειδών. Παρόλο που τα μονοπάτια της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών είναι γνωστά, τα βήματα που οδηγούν στην συμπύκνωση και τον πολυμερισμό δεν έχουν διελευκανθεί ακόμα. Οι πιο ευρέως μελετημένες συμπυκνωμένες ταννίνες είναι οι φλαβαν-3-όλες (-)-επικατεχίνη και (+)-κατεχίνη. Οι υδρολύομενες ταννίνες είναι παράγωγα του γαλλικού οξέος (3,4,5 τριυδροξυλικό βενζοϊκό οξύ).



Σχήμα 1.6.: Υδρολυόμενη ταννίνη, Γαλλικό οξύ, Συμπυκνωμένη ή Μη Υδρολυόμενη ταννίνη, Φλαβόνη και Φλωροταννίνη, Φλωρογλυκινόλη αντίστοιχα.

Υπάρχει και μία τρίτη υποκατηγορία, οι φλωροταννίνες, οι οποίες αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από τη φλωρογλυκινόλη, η οποία έχει απομονωθεί από αρκετά γένη της καφέ άλης αλλά δεν είναι σημαντική για την ανθρώπινη διατροφή. Οι ταννίνες, έχουν διάφορες επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα καθώς είναι εν δυνάμει χηλικές ενώσεις, παράγοντες καθίζησης πρωτεϊνών και αντιοξειδωτικά. Εξαιτίας, των διάφορων βιολογικών ρόλων που έχουν και λόγω των τεράστιων δομικών διαφοροποιήσεων, έχει καταστεί δύσκολο να αναπτυχθεί ένα σχέδιο που θα επιτρέπει την ακριβή πρόβλεψη της δράσης τους σε οποιοδήποτε βιολογικό σύστημα.[4]

Στιλβένια: Τα στιλβένια εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες στην ανθρώπινη διατροφή, με κύριο εκπρόσωπο τη ρεσβερατρόλη, η οποία εμφανίζεται με *cis* και *trans* διαμόρφωση, κυρίως σε γλυκοζυλιωμένη μορφή.

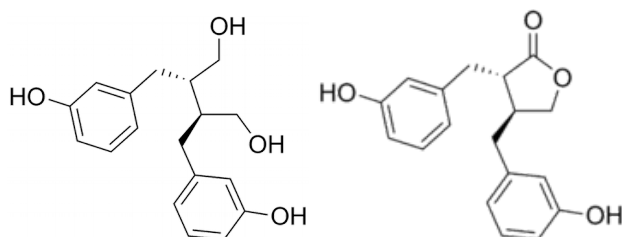


Σχήμα 1.7.: Χημική δομή της *cis* και *trans* ρεσβερατρόλης και του 3-O-γλυκοζίτη της *trans* αντίστοιχα.

Παράγεται από τα φυτά ως απόκριση σε μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς καθώς και υπό την επίδραση δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών. Έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 70 είδη φυτών, περιλαμβανομένων των σταφυλιών, μούρων και φιστικιών.[4]

Λιγνάνες: Οι λιγνάνες παράγονται από τον οξειδωτικό διμερισμό δύο φαινυλοπροπανοειδών ομάδων, ενώ στη φύση βρίσκονται κυρίως σε ελεύθερη μορφή, με τις γλυκοζυλιωμένη τους μορφή να αποτελεί ένα μικρό ποσοστό. Οι λιγνάνες είναι μία από τις πιο σημαντικές τάξεις φυτοιστρογόνων, δηλαδή χημικών όμοιων με τα οιστρογόνα.

Στο γαστρεντερικό σύστημα, αυτά τα μόρια μετατρέπονται σε άλλες ενώσεις (εντεροδιόλη και εντερολακτόνη) και έχουν οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές ιδιότητες.



Σχήμα 1.8.: Εντεροδιόλη και Εντερολακτόνη αντίστοιχα.

Τα φρούτα δεν είναι η κύρια διαιτητική πηγή των λιγνανών, και μικρές συγκεντρώσεις τους βρίσκονται στις φράουλες και τα κράνμπερυ. Μεγάλες ποσότητες λιγνανών περιέχει ο λιναρόσπορος.[9] Το ενδιαφέρον για τις λιγνάνες και τα συνθετικά τους παράγωγα αυξάνεται λόγω των εφαρμογών τους σε χημειοθεραπείες και άλλες φαρμακευτικές δράσεις.[4]

1.2. Αρωματικά Φυτά και Βότανα

Ο πατέρας της Ιατρικής πίστευε ότι εάν επιτρέψουμε στη τροφή μας να γίνει φάρμακο τότε και το φάρμακο θα γίνει τροφή μας. Στην σύγχρονη εποχή και ιδιαίτερως στην Ελλάδα, χρησιμοποιούνται ευρέως τα διάφορα είδη βοτάνων τόσο για τις γευστικές και αρωματικές τους ιδιότητες στη μαγειρική όσο και για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Τα θεραπευτικά φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική μελετώνται μέχρι και σήμερα και αξιοποιούνται για την παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, διατροφικών συμπληρωμάτων και προϊόντων που συνδυάζουν τις προηγούμενες ιδιότητες με την ονομασία «φαρμακο-τρόφιμα».[10]

Η αναγνώριση των ροφημάτων των βοτάνων, είτε με τη μορφή εγχύματος ή αφεψήματος, ως λειτουργικών ροφημάτων, σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το είδος και την ποικιλία του βοτάνου καθώς και με τον τρόπο προ κατεργασίας και προετοιμασίας του ροφήματος. Συγκεκριμένα, στα διάφορα είδη βοτάνων έχει αποδοθεί μεγάλο πλήθος σημαντικών δράσεων με ωφέλιμα για την υγεία αποτελέσματα, όπως αντιοξειδωτικής, αντιερεθιστικής, αντιμικροβιακής, αναλγητικής, νευροπροστατευτικής και αντικαρκινογόνου. Αυτές οι ιδιότητες έχουν συσχετιστεί με το περιεχόμενο των αρωματικών φυτών σε πολυφαινόλες, οι οποίες έχουν ισχυρές αναγωγικές και αντιριζικές ιδιότητες. Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα ανάλογα με την ποικιλία του φυτού, των περιβαλλοντικών συνθηκών, τις εποχικές συνθήκες και την γεωγραφική προέλευση.[10]

1.2.1. Τεχνικές Εκχύλισης Αρωματικών Φυτών

Η προκατεργασία των φυτικών δειγμάτων είναι το σημαντικότερο βήμα για την ορθή εφαρμογή των μεθόδων ανάλυσης. Η βασική διαδικασία περιλαμβάνει στάδια όπως, το προ-πλύσιμο, τη ξήρανση του φυτικού υποστρώματος ή τη λυοφιλίωση, την άλεση για την παραλαβή ομογενοποιημένου δείγματος και τη βελτίωση της κινητικής ικανότητας του αναλύτη που εκχυλίζεται. Δεδομένου ότι οι βιοδραστικές ουσίες που πρόκειται να εκχυλισθούν μπορεί να είναι μη πολικές και θερμικά ασταθείς, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η καταλληλότητα της μεθόδου εκχύλισης που θα χρησιμοποιηθεί. Ένα άλλο πρόβλημα που ανακύπτει είναι η αλλοίωση του αποτελέσματος μιας ανάλυσης με τη χρήση περίσσειας της ένωσης δείκτη στο δείγμα, καθώς μπορεί να υπάρξει αλληλεπίδραση της με το υπόστρωμα. Ανάλογα με το πως μια μέθοδος αξιολογείται, είναι πιθανό να έχουμε υψηλή ανάκτηση αλλά χαμηλή ακρίβεια. Από τα διάφορα υποστρώματα που έχουν μελετηθεί στο εργαστήριό μας, χρειάζονται διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης και συνθήκες για την ανάκτηση της ζητούμενης ένωσης. Ακόμα και με την ίδια τεχνική εκχύλισης, για τις ίδιες ενώσεις σε διαφορετικά υποστρώματα ίσως χρειαστούν διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης όπως η χρήση ενός διαλύτη ή μίγμα διαλυτών, η εφαρμογή θέρμανσης και άλλα.[11]

Στη προσπάθεια να μειωθεί ή και να εξαλειφθεί η χρήση οργανικών διαλυτών και να βελτιωθεί η τεχνική της εκχύλισης, νέες μέθοδοι εκχύλισης δειγμάτων έχουν εφαρμοσθεί, όπως με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE – Microwave Assisted Extraction), με την χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (SFE – Supercritical Fluid Extraction), με επιταχυνόμενο διαλύτη (ASE – Accelerated Solvent Extraction), με διαλύτη υπό πίεση (PLE – Pressurized Liquid Extraction) και με τη χρήση υπερήχων (UAE – Ultrasound Assisted Extraction).[11]

1.2.2. Λουίζα (*Lippia citriodora*)

Η επιστημονική ονομασία του αρωματικού φυτού λουίζα είναι *Lippia citriodora* (Lam.) Kunth και πήρε το όνομα της από τον Γάλλο ερευνητή φυσικής ιστορίας και εξερευνητή Augustin Lippi (1678 - 1701). Το γένος *Lippia* είναι ένα από τα 41 γένη θάμνων, βοτάνων και δέντρων, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των Verbenacea και περιλαμβάνει περίπου 200 είδη τα οποία είναι διαδεδομένα κυρίως στην Νότια και Κεντρική Αμερική καθώς και στην Τροπική Αφρική. Αποτελεί



Εικόνα 1.1.: Ανθισμένο κλαδί λουίζας

εγχώριο είδος της Νότιας Αμερικής, με τη Βραζιλία να φιλοξενεί το 70 - 75% των γνωστών ειδών, της Χιλής, της Αργεντινής, του Περού και της Ουρουγουάης, το οποίο μεταφέρθηκε στην Ευρώπη στα τέλη του 17ου αιώνα και διαδόθηκε κυρίως στις νοτιότερες περιοχές της, όπως Ιταλία και Ισπανία, καθώς και στη Βόρεια Αφρική, στο Μαρόκο.[12], [13] Το φυτό ευδοκμεί σε λασπώδες έδαφος, αναπαράγεται μέσο σπόρων και μοσχευμάτων, ενώ τα συνώνυμα του στη βοτανολογία είναι *Aloysia citriodora*, *Aloysia sleumeri* Moldenke, *Aloysia triphylla* (L' Hér, Britton), *Lippia triphylla* (L' Hér) Kuntze, *Verbena citriodora* Cav., *Verbena triphylla* και *Zapania citriodora* Lam.[13], [14]

Το φυτό χρησιμοποιείται για να δώσει γεύση σε αναψυκτικά, γλυκίσματα, σαλάτες φρούτων, πηκτές (ζελέ) και ως αρτυματική ύλη σε φαγητά.[13] Χρησιμοποιείται επίσης στη βιομηχανία αρωμάτων[12], ως συμπλήρωμα διατροφής στην εκτροφή γατόψαρων ιχθυοτροφείου[15] και ως φυσικό αντιοξειδωτικό σε τρόφιμα[16]. Επίσης, παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και αντιπυρετική του δράση, ως ηρεμιστικό, διουρητικό, αντισπασμωδικό αλλά και για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών. Επίσης, χρησιμοποιείται ως προ-σπασμωδικό για την αντιμετώπιση επιληπτικών κρίσεων.[17]

1.2.3. Αναλύσεις περιεχομένων βιοδραστικών ενώσεων της λουίζας (*Lippia citriodora*)

Η λουίζα ως φυτό με ξεχωριστές ιδιότητες σύμφωνα με την παραδοσιακή φαρμακευτική αλλά και τη μαγειρική, είτε καταναλώνεται ως ρόφημα με τη μορφή εγχύματος και αφεψήματος είτε ως αρωματικό πρόσθετο σε διάφορα τρόφιμα. Επομένως, πολλές από τις αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν τα υδατικά εκχυλίσματά της σε διάφορους χρόνους εκχύλισης και θερμοκρασίας.[12], [15], [18] Επίσης, λόγω των περιεχομένων φαινολών, ιριδοειδών και φαινυλοπροπανοειδών έχουν πραγματοποιηθεί εκχυλίσεις με τη χρήση αιθανόλης και μεθανόλης, καθώς και άλλους οργανικούς διαλύτες όπως ακετόνη, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο.[19]–[21] Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί και εκχυλίσεις με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού δηλαδή CO₂, καθώς αποτελεί μια ασφαλή μέθοδο για την παραλαβή όλων εκείνων των θερμικά ευαίσθητων ενώσεων που υποβαθμίζονται ή και καταστρέφονται με τις θερμικές μεθόδους εκχύλισής τους.[14], [22], [23] Η ανάλυση των διάφορων εκχυλισμάτων της λουίζας έχει ως στόχο αρχικώς να υπολογίσει την αντιοξειδωτική δράση των περιεχομένων ενώσεων χωρίς την περαιτέρω ταυτοποίηση αυτών.

Στην επιστήμη των τροφίμων, στα αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται οι ενώσεις που αποτρέπουν την τάγγιση των περιεχόμενων λιπαρών συστατικών και τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά δηλαδή, ουσίες των τροφίμων οι οποίες μειώνουν δραστικά τα δυσμενή αποτελέσματα ενεργών ενώσεων στην φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπου όπως, το ενεργό οξυγόνο και οι αζωτούχες ενώσεις.[24] Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χωρίζονται ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης των ενώσεων και διακρίνονται σε εκείνες που περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer - HAT) και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer - ET). Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων της λουίζας έχουν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι που ανήκουν και στις δύο κατηγορίες, με βάση τις αντιδράσεις HAT, υπολογισμός αναστολής οξείδωσης λινολενικού οξέος[16] ενώ με βάση τις αντιδράσεις ET, υπολογισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου[21], ολικού περιεχόμενου φλαβονοειδών[12], ολικού υδροξυκιναμικού περιεχομένου[25], προανθοκυανιδίων[16], ταννίνων[16], σάρωσης ριζών με τη χρήση DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)[21], [26] και υπολογισμός σάρωσης ελεύθερων ριζών με τη χρήση ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt)[21]. Τέλος, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων ενώσεων έχει επιτευχθεί με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων συνδυασμένων με τη φασματομετρία μάζας και άλλους ανιχνευτές όπως, GC-MS[14], [15], [18], GC-FID[18], [20], [22], HPLC-DAD-ESI-MS/MS[19], [20], TLC[14], με χρήση οπτικών μεθόδων όπως φασματοφωτομετρία FT-IR[27], UV-Vis[23] και NMR[10], [28].

1.2.4. Χημική Σύσταση της λουίζας (*Lippia citriodora*)

Η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων από τα διάφορα είδη του γένους *Lippia* έχουν προσδιορισθεί με τη χρήση τεχνικών αεριοχρωματογραφίας. Από τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων προκύπτει ότι οι κύριες ενώσεις που χαρακτηρίζουν το αιθέριο έλαιο είναι: το λιμονένιο, το β-καρυοφυλένιο, η p-κουμίνη, η καμφορά, η λιναλόλη, το α-πινένιο και η θυμόλη, ενώ για την λουίζα ακόμα πιο ειδικά τα κινράλη Α και Β, η 1,8-κινεόλη και η γερανιόλη ως μονοτερπένια και το οξείδιο του καρυοφυλενίου ως σесκιτερπενικά ανάλογα.

Όσον αφορά τα περιεχόμενα φαινολικά οξέα, έχει γίνει ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος και παραγώγων του π.χ. δι-υδροκαφεϊκό οξύ, περιλαμβανομένων του φαινυλοπροπανοειδούς βερμπασκοειδές ή ακτεοειδές, ισό-βερμπασκοειδές και ενός καφεϊκού εστέρα συνδεδεμένου σε 3,4-δι-υδροξύ-φαινυλεθανόλη της οποίας η χημική

δομή δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα, τα οποία παρουσιάζουν μακροχρόνια δράση υπότασης. Φαινολικά συστατικά που έχουν βρεθεί στα είδη του γένους *Lippia* είναι το *p*-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και το 4-υδροξυ-κινναμικό οξύ.[13], [17]

Η πλειοψηφία των φλαβονοειδών που έχουν ταυτοποιηθεί είναι φλαβόνες, όπως υδροξυλιωμένες φλαβόνες, μεθοξυ-φλαβόνες και φλαβόνες με θειικά άλατα. Τα πιο κοινά φλαβονοειδή που έχουν αναφερθεί για τη Λουίζα είναι η σαλβιγενίνη, ευπατορίνη, ευπαφολίνη, λουτεολίνη, ισπιδουλίνη, διοσμετίνη, σισμαριτίνη, σιρσιλιόλη, πεκτολίνη-αργινίνη, 6-υδροξύ-λουτεολίνη καθώς και λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίτης.

Τέλος, έχει γίνει ταυτοποίηση κάποιων γλυκοζιτών - ιριδοειδών με χρήση μεθόδων χρωματογραφίας, όπως CC, TLC, HPLC και GC/MS, και με άλλες μεθόδους όπως IR, ¹H NMR και ¹³C NMR. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καθοριστικοί παράγοντες για την ταξινόμηση των ειδών της *Lippia*.

1.2.5. Βιοδράση των εκχυλισμάτων της *Lippia citriodora*

Τα αιθέρια έλαια των φύλων της *L. citriodora* παρουσιάζουν ήπια αναισθητική δράση, προωθούν την προστασία από τις οξειδώσεις ενώ μετριαζουν και το άγχος σύμφωνα με μελέτες *in vivo* στα ασημένια γατόψαρα του είδους *Rhamdia quelen*. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται για την προστασία από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου, στις προνύμφες και ανήλικες γαρίδες του είδους *Litopenalut vannamei*. Τέλος, τα αιθέρια έλαια της έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην επίτευξη βαθιάς αναισθησίας των ασημένιων γατόψαρων προκειμένου να διευκολυνθεί η μετάφορά τους και να αποτραπεί η δημιουργία άγχους και πιθανοί τραυματισμοί. [29]

Από τα αλκοολούχα εκχυλίσματα των φύλλων της *L. Citriodora* έχουν απομονωθεί τρεις φαινολικές ενώσεις: α) το διυδροκαφεϊκό οξύ, β) ο γλυκοζίτης-7-Ο-λουτεολίνη και το 4-υδροξυκινναμικό οξύ. Οι ενώσεις αυτές δοκιμάστηκαν επιτυχώς σε ποντίκια και αρουραίους για την αναλγητική, αντιπυρετική, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους. Ενώ, το περιεχόμενο φαινυλοπροπανοειδές *Verbascoside* ή *Acteoside*, έχει αναφερθεί να έχει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, ανοσοκατασταλτική και αντικαρκινική δράση.[13] Επίσης, έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αναλγητική και ήπια αναισθητική δράση κατά την πρόσληψη της από το στόμα, παρόλα αυτά σε μελέτες *in vivo* σε ανθρώπους χωρίς κάποιο πρόβλημα δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφορά μεταξύ του δείγματος και του τυφλού. [17]

1.3. Εκχυλίσεις με χρήση Σύγχρονων Τεχνικών

Οι κύριες προκλήσεις των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι τα μεγάλα χρονικά διαστήματα της διαδικασίας, η ανάγκη υψηλού κόστους και καθαρότητας διαλυτών, η απομάκρυνση μεγάλων όγκων διαλυτών, η έλλειψη εκλεκτικότητας και η θερμική καταστροφή των θερμοευαίσθητων ενώσεων. Οι πιο σημαντικές σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης είναι η εκχύλιση με τη δράση ενζύμων (EAE), με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE), με τη χρήση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PEF), με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (SFE), με τη χρήση υγρού υπό πίεση (PLE) και με τη χρήση υπερήχων (UAE). Αυτές οι τεχνικές αναφέρονται ως μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Κάποιες από αυτές τις τεχνικές θεωρούνται “green techniques” ή αλλιώς οικολογικές τεχνικές εκχύλισης, καθώς συμμορφώνονται με τα προαπαιτούμενα που θέτονται από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (<https://www.epa.gov/greenchemistry>) και την Αμερικάνικη Ένωση Χημικών (<https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/research-innovation/tools-for-green-chemistry.html>). Τα προαπαιτούμενα περιλαμβάνουν λιγότερο επικίνδυνες χημικές συνθέσεις, σύνθεση ασφαλέστερων χημικών ενώσεων, ασφαλέστερους χρησιμοποιούμενους διαλύτες, ενεργειακά αποδοτικότερους πειραματικούς σχεδιασμούς, χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, λιγότερα απορρίματα, χρήση καταλυτών, αποφυγή υποβάθμισης των ζητούμενων ενώσεων, οικονομίας χρησιμοποιούμενων χημικών αναλώσιμων και χρόνου αναλύσεων, την αποφυγή μόλυνσης του περιβάλλοντος και φυσικά ασφαλέστερη χημεία στο σύνολο της για την αποφυγή ατυχημάτων.[30]

1.3.1. Εκχύλιση με τη δράση Ενζύμων

Μερικά από τα φυτοχημικά συστατικά είναι διεσπαρμένα στο κυτταρόπλασμα και κάποια είναι δεσμευμένα στο σύστημα λιγνίνης – πολυσακχαριτών με δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβους δεσμούς. Το αποτέλεσμα είναι να μην είναι διαθέσιμα προς εκχύλιση με τις κλασικές μεθόδους. Η ένζυμική εκχύλιση είναι μία καινοτόμα και αποτελεσματική μέθοδος για την παραλαβή συστατικών από ιστούς με υψηλή απόδοση. Η προσθήκη συγκεκριμένων ενζύμων όπως, η κυτταρινάση, α-αμυλάση και πηκτινάση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ενισχύει την ανάκτηση με την διάλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την υδρόλυση των πολυσακχαριτών και λιπιδικών σωμάτων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, η υδατική (Enzyme-Assisted Aqueous Extraction – EAAE) και η ψυχρή υπό πίεση (Enzyme Assisted Cold Pressing – EACP). Παράγοντες όπως, η σύσταση των ενζύμων και η συγκέντρωσή τους, το μέγεθος των φυτικών σωματιδίων, η αναλογία στερεού προς υγρό

και ο χρόνος υδρόλυσης είναι αναγνωρισμένοι ως κύριοι παράγοντες της εκχύλισης ενώ, σημαντικό ρόλο έχει η περιεχόμενη υγρασία του φυτού. Συνήθως, η EAAE και η EACP χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση ελαίων από διάφορους σπόρους μέσω της υδρόλυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων σπόρων. Η EACP αποτελεί μια ιδανική εναλλακτική για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από ελαιούχους σπόρους εξαιτίας της μη τοξικότητας και μη ευφλεκτικότητας της μεθόδου. Το εκχυλισμένο έλαιο με τις παραπάνω μεθόδους έχει βρεθεί να περιέχει μεγαλύτερη ποσοστό περιεχομένων ελεύθερων λιπαρών οξέων και περιεχομένων φωσφορικών οξέων σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης με χρήση εξάνιου. Τέλος, η EAE έχει αναγνωριστεί ως τεχνολογία φιλική προς το περιβάλλον για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων και ελαίων καθώς χρησιμοποιείται νερό και όχι οργανικός διαλύτης.[30]

1.3.2. Εκχύλιση με τη χρήση Υπερκρίσιμων Ρευστών

Η εφαρμογή των υπερκρίσιμων ρευστών στις εκχυλίσεις ξεκίνησε με την ανακάλυψη της από τους Hannay και Hogarth (1879)(Hannay, J.B., Hogarth, J., 1879. On the solubility of solid in gases. Proceeding of the Royal Society of London 29, 324–326.), αλλά τα εύσημα θα πρέπει να δωθούν και στον Zosel, το 1964, που παρουσίασε την πατέντα της αφαίρεσης της καφεΐνης από τον καφέ με τη χρήση της μεθόδου. Έκτοτε, η χρήση των υπερκρίσιμων ρευστών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για περιβαλλοντικές εργασίες, φαρμακευτικές εφαρμογές όπως και στις εφαρμογές των πολυμερών και της ανάλυσης τροφίμων. Αρκετές βιομηχανίες χρησιμοποιούν την τεχνική για πολλά χρόνια, κυρίως, οι βιομηχανίες που παράγουν καφέ χωρίς καφεΐνη.

Η υπερκρίσιμη φάση είναι μια ξεχωριστή φάση και μπορεί να επιτευχθεί μόνο εάν η ουσία τεθεί υπό θερμοκρασία και πίεση πέρα από το κρίσιμο σημείο της. Κρίσιμο σημείο ορίζεται ως η χαρακτηριστική θερμοκρασία (T_c) και πίεση (P_c) υπεράνω των οποίων δεν υπάρχει διάκριση μεταξύ της αέριας και υγρής φάσης. Στην υπερκρίσιμη φάση, οι ιδιότητες των αερίων και των υγρών δεν υφίσταται πλέον, το οποίο σημαίνει ότι το υπερκρίσιμο ρευστό δεν μπορεί πλέον να υγροποιηθεί με την τροποποίηση της θερμοκρασίας και πίεσης. Το υπερκρίσιμο ρευστό έχει τις ιδιότητες αερίου όσον αφορά την διάχυση, ιξώδες και επιφανειακή τάση και τις ιδιότητες υγρού ως προς την πυκνότητα και τη διαλυτότητα. Αυτές οι ιδιότητες είναι που το καθιστούν κατάλληλο για την εκχύλιση συστατικών σε μικρό χρονικό διάστημα με μεγαλύτερες αποδόσεις. Μια βασική μονάδα Εκχύλισης με χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction – SFE) αποτελείται από τα

ακόλουθα μέρη: μια δεξαμενή για την κινητή φάση, συνήθως CO₂, μία αντλία συμπίεσης του αερίου, μία αντλία για τον βοηθητικό διαλύτη και σωλήνα, ένα φούρνο, ο οποίος φέρει τον σωλήνα εκχύλισης, ένα σημείο ελέγχου για τη διατήρηση της υψηλής πίεσης στο σύστημα και στη παγίδα. Συνήθως, διαφορετικοί τύπου μετρητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταμέτρηση της ροής, ξηρού/ υγρού αερίου κ.α.

Η επιτυχής εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υποστρώματα βασίζεται σε διάφορες παραμέτρους της μεθόδου και κυρίως σε παραμέτρους που είναι ευμετάβλητες. Αυτές οι παράμετροι πρέπει να ελέγχονται με ακρίβεια ώστε να επιτυγχάνεται η βελτιστοποίηση της εκχύλισης. Οι κύριες μεταβλητές που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης είναι η θερμοκρασία, η πίεση, το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος και η υγρασία του, ο χρόνος της εκχύλισης, ο ρυθμός ροής του CO₂ και η αναλογία διαλύτη προς υποστρώμα. Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση των υπερκρίσιμων ρευστών για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να κατανοηθεί καλύτερα με τα παρακάτω: (1) το υπερκρίσιμο ρευστό έχει υψηλότερο συντελεστή διάχυσης και χαμηλότερο ιξώδες και επιφανειακή τάση από ότι έχει ένας υγρός διαλύτης, καταλήγοντας σε μεγαλύτερη διείσδυση του υποστρώματος και πιο εκλεκτική εκχύλιση. Ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να μειωθεί ουσιαστικά με την SFE σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους. (2) Η επαναλαμβανόμενη αναρροή (reflux) του υπερκρίσιμου ρευστού στο δείγμα. (3) Η εκλεκτικότητα του υπερκρίσιμου υγρού είναι μεγαλύτερη από ότι του υγρού διαλύτη καθώς η διαλυτότητα του μπορεί να ρυθμιστεί είτε αλλάζοντας την θερμοκρασία ή και την πίεση. (4) Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος από τον διαλύτη μπορεί εύκολα να ξεπεραστεί με την αποσιμπίηση του υπερκρίσιμου ρευστού, το οποίο μειώνει τον χρόνο της μεθόδου. (5) Η SFE εφαρμόζεται σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι αποτελεί μια ιδανική μέθοδο εκχύλισης για θερμικά ευαίσθητες ενώσεις. (6) Η SFE χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη. (7) Μπορεί να εφαρμοστεί εκχύλιση και άμεσα χρωματογραφία για την καλύτερη ανάλυση των πιο πτητικών ενώσεων. (8) Είναι δυνατή η ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση του υπερκρίσιμου υγρού, το οποίο ελαχιστοποιεί την παραγωγή αποβλήτων.[30]

1.3.3. Εκχύλιση με τη χρήση Υγρού Υπό Πίεση

Το 1996 οι Richter et al. περιέγραψαν για πρώτη φορά την μέθοδο εκχύλισης με τη χρήση υγρού υπό πίεση (PLE). Η μέθοδος αναφέρεται ως εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Fluid Extraction, PFE), επιταχυνόμενη εκχύλιση με υγρό (Accelerated Fluid Extraction, ASE), εκχύλιση ενισχυμένου διαλύτη (Enhanced Solvent Extraction, ESE) και

τέλος ως εκχύλιση με διαλύτη υπό υψηλή πίεση (High Pressure Solvent Extraction, HSPE). Η μέθοδος βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής πίεσης στον διαλύτη ώστε να παραμείνει στην υγρή φάση και πέρα από το σημείο βρασμού. Η υψηλή πίεση είναι που πραγματοποιεί την εκχύλιση. Οι αυτοματοποιημένες τεχνικές είναι ο κύριος λόγος για την μεγάλη ανάπτυξη των τεχνικών που βασίζονται στην PLE παράλληλα με την μείωση του χρόνου εκχύλισης και την απαίτηση σε διαλύτες. Η τεχνική της PLE χρειάζεται μικρή ποσότητα διαλυτών λόγω του συνδυασμού της υψηλής πίεσης και θερμοκρασιών το οποίο παρέχει γρήγορη εκχύλιση. Η υψηλή θερμοκρασία εκχύλισης αυξάνει τη διαλυτότητα των περιεχόμενων ενώσεων μειώνοντας το ιξώδες και την επιφανειακή τάση, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού εκχύλισης. Πλέον, για την εκχύλιση πολικών ενώσεων, η PLE θεωρείται ως πιθανή εναλλακτική τεχνική της εκχύλισης με την χρήση υπερκρίσιμων ρευστών. Η PLE εφαρμόζεται επίσης για την εκχύλιση οργανικών ρύπων από περιβαλλοντικά υποστρώματα τα οποία είναι σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες.[30]

1.3.3. Εκχυλίσεις με την χρήση Τεχνικών Υψηλής Ενέργειας

1.3.3.1. Εκχύλιση με τη χρήση Μικροκυμάτων

Η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων θεωρείται μία καινοτόμος μέθοδος για την εκχύλιση διάφορων βιοδραστικών ενώσεων χρησιμοποιώντας την ενέργεια των μικροκυμάτων. Τα μικροκύματα είναι είδος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με εύρος συχνοτήτων που κυμαίνεται από 300MHz έως 300GHz. Η αρχή στην οποία βασίζεται η θέρμανση με τη χρήση των μικροκυμάτων είναι η άμεση επίδραση τους στα πολικά υλικά. Η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμική με βάση τους μηχανισμούς ιοντικής αγωγιμότητας και την διπολική περιστροφή. Κατά τον μηχανισμό της ιοντικής αγωγιμότητας παράγεται θερμότητα λόγω της αντίστασης που παρουσιάζει το μέσο στην ροή των ιόντων. Ενώ από την άλλη, τα ιόντα διατηρούν την κατεύθυνση του πεδίου ακολουθώντας την συχνή αλλαγή του. Αυτή η συχνή αλλαγή της κατεύθυνσης έχει ως αποτέλεσμα την σύγκρουση μεταξύ των μορίων και ως συνέπεια την παραγωγή θερμότητας. Ο μηχανισμός της εκχύλισης με τη χρήση των μικροκυμάτων περιλαμβάνει τρία στάδια, κατά το πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συστατικών από τα ενεργά κέντρα του υποστρώματος με την εφαρμογή αυξημένης θερμοκρασίας και πίεσης, στη συνέχεια πραγματοποιείται διάχυση των διαλυτών στο υπόστρωμα και τέλος, μεταφορά των συστατικών από το υπόστρωμα στους διαλύτες. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των μικροκυμάτων είναι: (1) η ομοιόμορφη κατανομή θέρμανσης, (2) η ταχύτερη θέρμανση για την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών, (3) μικρό μέγεθος εξοπλισμού

και (4) η αυξημένη απόδοση των εκχυλίσεων. Με τη χρήση των μικροκυμάτων μπορεί να εκχυλιστούν βιοδραστικά συστατικά ταχύτερα και με υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Είναι μία εκλεκτική τεχνική για την εκχύλιση οργανικών και χηλικών ενώσεων. Τέλος, η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων έχει αναγνωριστεί ως οικολογική τεχνολογία εξαιτίας της μειωμένης χρήσης οργανικών διαλυτών.[30]

1.3.3.1. Εκχύλιση με τη χρήση Παλλόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου

Η κατεργασία με τη χρήση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Pulse-electric Field extraction – PEF) έχει αναγνωριστεί για την χρησιμότητα της για τη βελτίωση διεργασιών όπως, συμπίεσης, ξήρανσης, εκχύλισης και διάχυσης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη καταστροφή της δομής των κυτταρικών μεμβρανών με σκοπό την βελτίωση του αποτελέσματος της εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια της παραμονής ενός κυτάρου στο ηλεκτρικό πεδίο, ηλεκτρικό δυναμικό διαπερνά τη μεμβράνη του. Βασισμένο στη διπολική φύση των μορίων της μεμβράνης, το ηλεκτρικό δυναμικό διαχωρίζει τα μόρια με βάση το φορτίο τους. Μόλις ξεπεραστεί μία κρίσιμη τιμή του 1V της διαμεμβρανικής δυναμικότητας, τα φορτισμένα μόρια απωθούνται μεταξύ τους οπότε και σχηματίζονται πόροι στις πιο αδύναμες περιοχές με αποτέλεσμα να αυξάνεται δραστικά η διαπερατότητα. Συνήθως, για την εφαρμογή της εκχύλισης, φυτικών υποστρωμάτων, με τη χρήση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου χρησιμοποιείται ένα απλό κύκλωμα με παλμούς, οι οποίοι αποδυναμώνονται σταδιακά με εκθετικό ρυθμό. Τα φυτικά υποστρώματα τοποθετούνται σε ειδικό θάλαμο, ο οποίος συνδέεται με δύο ηλεκτρόδια. Αναλόγως του σχεδιασμού του θαλάμου, μπορεί να λειτουργήσει είτε ως συνεχής εφαρμογής ή ως μεμονωμένης παρτίδας δειγμάτων. Η αποτελεσματικότητα της PEF εξαρτάται αποκλειστικά από τις παραμέτρους της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της έντασης του πεδίου, της ειδικής ενέργειας εισόδου, τον αριθμό των παλμών, την θερμοκρασία και το υπόστρωμα.

Η PEF έχει την δυνατότητα να αυξήσει την μεταφορά των περιεχόμενων συστατικών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με την καταστροφή των δομών των μεμβρανών των φυτικών υποστρωμάτων, βελτιώνοντας την εκχύλιση και μειώνοντας τον χρόνο εκχύλισης. Η μέθοδος σε ένα μέτριο ηλεκτρικό πεδίο (500 και 1000 V/cm για 10⁻⁴ – 10⁻² s) έχει ανακαλυφθεί ότι βλάπτει την κυτταρική μεμβράνη με μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Επομένως, μπορεί να ελαχιστοποιήσει την υποβάθμιση των θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Τέλος, η PEF μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προκατεργασίας της κυρίου μεθόδου εκχύλισης για την διευκόλυνση της.[30]

1.3.3.2. Εκχύλιση με τη χρήση Υπερήχων

Οι υπέρηχοι είναι ένας συγκεκριμένο είδος ηχητικού κύματος πέρα από την ικανότητα ακοής των ανθρώπων. Κυμαίνεται μεταξύ 20 kHz και 100 MHz. Η διεργασία αυτή παράγει ένα φαινόμενο που ονομάζεται «ακουστική σπηλαίωση», το οποίο ερμηνεύεται ως η παραγωγή, ανάπτυξη και κατάρρευση των φυσαλίδων. Ένα μεγάλο ποσό ενέργειας παράγεται από την μετατροπή της κινητικής ενέργειας των φυσαλίδων σε θερμική. Οι φυσαλίδες αυτές, έχουν θερμοκρασία 5000 K και πίεση 1000 atm και ρυθμό αυξομείωσης της θερμοκρασίας 1010 K/s. Μόνο στα υγρά και στα στερεά που περιέχονται σε υγρά αναπτύσσεται το φαινόμενο της σπηλαίωσης. Ενώ, το κυρίως όφελος της εκχύλισης με την χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted Extraction – UAE) μπορεί να παρατηρηθεί σε στερεά φυτικά δείγματα καθώς η ενέργεια των υπερήχων διευκολύνει την διαρροή οργανικών και ανόργανων συστατικών. Ο μηχανισμός δράσης είναι η εντατικοποίηση της μεταφοράς των περιεχόμενων ενώσεων και η επιταχυμένη πρόσβαση του διαλύτη στα συστατικά του φυτικού κυττάρου. Ο μηχανισμός εκχύλισης με υπερήχους περιλαμβάνει δύο τύπους φυσικών φαινομένων, (1) την διάχυση μέσα από τα κυτταρικά τοιχώματα και (2) την εκχύλιση των περιεχόμενων του κυττάρου αφού σπάσει το τοίχωμα. Σημαντικοί παράγοντες μίας αποδοτικής εκχύλισης με χρήση υπερήχων είναι: (α) η περιεχόμενη υγρασία του δείγματος, (β) το μέγεθος των σωματιδίων του υποστρώματος και (γ) ο διαλύτης. Επιπρόσθετα, η θερμοκρασία, η πίεση, η συχνότητα και ο χρόνος έκθεσης στους υπερήχους είναι οι καθοριστικοί παράγοντες κατά την χρήση των υπερήχων. Η UAE έχει επίσης χρησιμοποιηθεί παράλληλα με διάφορες κλασικές τεχνικές εκχυλίσεων καθώς ενισχύει την αποδοτικότητα μίας συμβατικής μεθόδου εκχύλισης.

Τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης με υπερήχους είναι η μείωση του χρόνου εκχύλισης, ενέργειας και χρήση διαλυτών. Η ενέργεια των υπερήχων για την εκχύλιση διευκολύνει την ανάμιξη του διαλύτη με τα σωματίδια του υποστρώματος, αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς της ενέργειας, μειώνει την θερμοκρασία της εκχύλισης, βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, μειώνει το μέγεθος του εξοπλισμού και τέλος μειώνει τα βήματα της διαδικασίας.[30]

1.4. Βελτιστοποίηση απόδοσης τεχνικών εκχυλίσεων - Μέθοδος Επιφανειών

Απόκριση

Η βελτιστοποίηση αναφέρεται στην βελτίωση της επίδοσης ενός συστήματος, μιας διεργασίας ή ενός προϊόντος με στόχο την επίτευξη του μέγιστου οφέλους από αυτό. Ο όρος βελτιστοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί κοινώς στην αναλυτική χημεία ως ένα μέσο

ανακάλυψης των συνθηκών που χρειάζεται να εφαρμοστούν προκειμένου να παραχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Παραδοσιακά, η βελτιστοποίηση στην αναλυτική χημεία πραγματοποιείται με την μελέτη της επίδρασης ενός παράγοντα κάθε φορά στο πειραματικό αποτέλεσμα. Ενώ ένας παράγοντας αλλάζει, οι υπόλοιποι παραμένουν σταθεροί. Αυτή η τεχνική βελτιστοποίησης αποκαλείται μονοπαραγοντική (OVAT – One variable at a time). Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της είναι ότι δεν περιλαμβάνει το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόντων. Συνέπεια λοιπόν αυτού είναι ότι η OVAT δεν αποτυπώνει την πλήρη επίδραση του παράγοντα στο τελικό αποτέλεσμα. Άλλο μειονέκτημα είναι ότι αυξάνεται ο αριθμός των αναγκαίων πειραμάτων προκειμένου να διεξαχθεί το πείραμα, το οποίο οδηγεί σε αύξηση της κατανάλωσης του δείγματος και των αντιδραστηρίων. Προκειμένου λοιπόν να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, η βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων διεξάγεται με την χρήση πολυπαραγοντικών στατιστικών τεχνικών. Μεταξύ των πιο σχετικών πολυπαραγοντικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται είναι η Μεθοδολογία Επιφανειών Απόκρισης (Response Surface Methodology – RSM). Η RSM είναι μία συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που βασίζονται στη προσαρμογή μιας πολυωνυμικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα, η οποία πρέπει να περιγράψει την συμπεριφορά μιας σειράς δεδομένων με σκοπό την επίτευξη στατιστικών προβλέψεων. Εφαρμόζεται ικανοποιητικά όταν μία απόκριση ή ένα σύνολο αποκρίσεων ενδιαφέροντος επηρεάζονται από αρκετές μεταβλητές. Ο σκοπός είναι η ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των τιμών των μεταβλητών αυτών ώστε να προκύψει η βέλτιστη απόκριση του συστήματος.[31]

1.4.1. Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης – (Response Surface Methodology - RSM)

Η RSM αναπτύχθηκε από τον Box και τους συνεργάτες του τη δεκαετία του 1950. Ο όρος προέκυψε από την γραφική αναπαράσταση που προέκυψε μετά την προσαρμογή του μαθηματικού μοντέλου και η χρήση του έχει υιοθετηθεί ευρέως στα κείμενα της χημειομετρίας. Η RSM αποτελείται από ένα σύνολο μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών οι οποίες βασίζονται στην προσαρμογή εμπειρικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα που έχουν αποκτηθεί σχετικά με τον πειραματικό σχεδιασμό. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται γραμμικές και πολυωνυμικές συναρτήσεις για να περιγραφεί το σύστημα που μελετάται και ως συνέπεια αυτού να εξερευνηθούν (οπτικοποίηση και αλλαγή) οι πειραματικές συνθήκες έως την βελτιστοποίηση.[31]

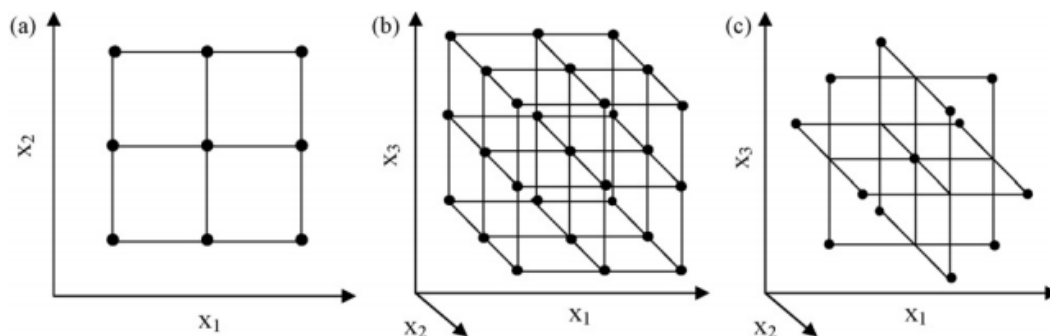
Κατά την εφαρμογή της RSM ως τεχνικής βελτιστοποίησης ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα: (1) επιλογή των ανεξάρτητων παραγόντων με σημαντική επίδραση στο σύστημα μέσω μελέτης δοκιμών ελέγχου και η οριοθεσία των τιμών αυτών των παραγόντων, σύμφωνα με τον σκοπό της μελέτης και την εμπειρία του αναλυτή, (2) επιλογή του πειραματικού σχεδίου και πραγματοποίηση των πειραμάτων σύμφωνα με το επιλεγμένο πειραματικό σχέδιο, (3) μαθηματική – στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσω της εφαρμογής μιας πολυωνυμικής συνάρτησης, (4) αξιολόγηση της εφαρμογής του σχεδίου, (5) επιβεβαίωση της ανάγκης για πιθανή μετατόπιση των τιμών των παραγόντων προς την βέλτιστη περιοχή και (6) ανάκτηση των βέλτιστων τιμών για κάθε μελετούμενο παράγοντα.[31]

1.4.2. Δοκιμή Ελέγχου των Παραγόντων

Η πληθώρα μεταβλητών μπορεί να επηρεάσει το σύστημα που μελετάται και είναι πρακτικά αδύνατο να αναγνωριστούν και να ελεγχθούν οι μικρές επιδράσεις τις κάθε μίας. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να επιλεχθούν οι σημαντικές μεταβλητές και το εύρος αυτών. Οι δοκιμή ελέγχου θα πρέπει να πραγματοποιείται προκειμένου να διευκρινιστούν ποιοί από τους παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις τους είναι πιο σημαντικοί σε σχέση με άλλους καθώς και το εύρος των τιμών που θα πρέπει να κυμανθούν. Συνήθως χρησιμοποιούνται σχέδια πλήρως ή μερικώς παραγοντικά δύο επιπέδων για αυτό τον σκοπό καθώς είναι πρακτικά και οικονομικά.[31]

1.4.3. Σχέδιο Box – Behnken (BBD)

Το σχέδιο αυτό προτείνει το τρόπο επιλογής σημείων από τον τριεπίπεδο παραγοντικό σχεδιασμό, το οποίο επιτρέπει την εκτίμηση των πρωτοταγών και δευτεροταγών συντελεστών του μαθηματικού μοντέλου. Αυτά τα σχέδια είναι, με αυτό τον τρόπο, πιο αποδοτικά και οικονομικότερα από τα αντίστοιχα των 3^k σχεδίων ($N = 3^k$, όπου N : ο αριθμός πειραμάτων και k : ο αριθμός των παραγόντων), κυρίως για μεγάλους αριθμούς παραγόντων.



Σχήμα 1.9.: Πειραματικά σχέδια βασισμένα στην μελέτη όλων των παραγόντων σε τρία επίπεδα: τριεπίπεδο παραγοντικό σχέδιο για την βελτιστοποίηση (a) δύο παραγόντων, (b) τριων παραγόντων και (c) σχέδιο Box – Behnken για την βελτιστοποίηση τριων παραγόντων.[31]

Στα BBD, τα πειραματικά σημεία είναι τοποθετημένα σε μία υπερσφαίρα ισαπέχοντας από το κεντρικό σημείο, όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 1.4.3.1.(c). Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι: (1) η απαίτηση ενός αριθμού πειραμάτων $N = 2k(k - 1) + c_p$, όπου k : ο αριθμός των παραγόντων και c_p : ο αριθμός των κεντρικών σημείων και (2) όλοι οι παράγοντες πρέπει να έχουν προσαρμοστεί μόνο σε τρία επίπεδα με ίση απόσταση μεταξύ των επιπέδων. Στο Σχήμα 1.9.(c) παρουσιάζεται το BBD για την βελτιστοποίηση τριών παραγόντων με 13 πειραματικά σημεία σε σύγκριση με το σχέδιο 3^3 με 27 πειραματικά σημεία(b), ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι το πρώτο είναι αποτελεσματικότερο και οικονομικότερο. Το BBD έχει εφαρμοστεί στην βελτιστοποίηση αρκετών χημικών και φυσικών διεργασιών, ενώ η εφαρμογή του στην αναλυτική χημεία είναι ακόμα μικρή συγκριτικά με τα προηγούμενα και σχετίζεται με την βελτιστοποίηση εκχύλισης με υπερκρίσιμο υγρό φαινολών και κρεσολών, βελτιστοποίηση κινητής φάσης σε ιοντικό χρωματογράφο, και βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής ανάλυσης καφεΐνης, θεοβρωμίνης και θεοφυλλίνης.[31]

1.5. Σκοπός της παρούσας Ερευνητικής Μελέτης

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το φυτό *Lippia citriodora* με την κοινή ονομασία λουίζα. Η λουίζα και τα εκχυλίσματα της χρησιμοποιούνται ως φυσικά αντιοξειδωτικά και αρτυματική ύλη στα τρόφιμα, στην αρωματοποιία και ως συμπληρώματα διατροφής. Παραδοσιακά έχει χρησιμοποιηθεί για την αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και αντιπυρετική της δράση, ενώ χρησιμοποιείται και ως ηρεμιστικό, διουρητικό, αντισπασμωδικό αλλά και ως θεραπεία για τις γαστρεντερικές διαταραχές. Στην φαρμακευτική έχει βρει χρήσεις ως προ – σπασμωδικό για την αντιμετώπιση επιληπτικών κρίσεων.

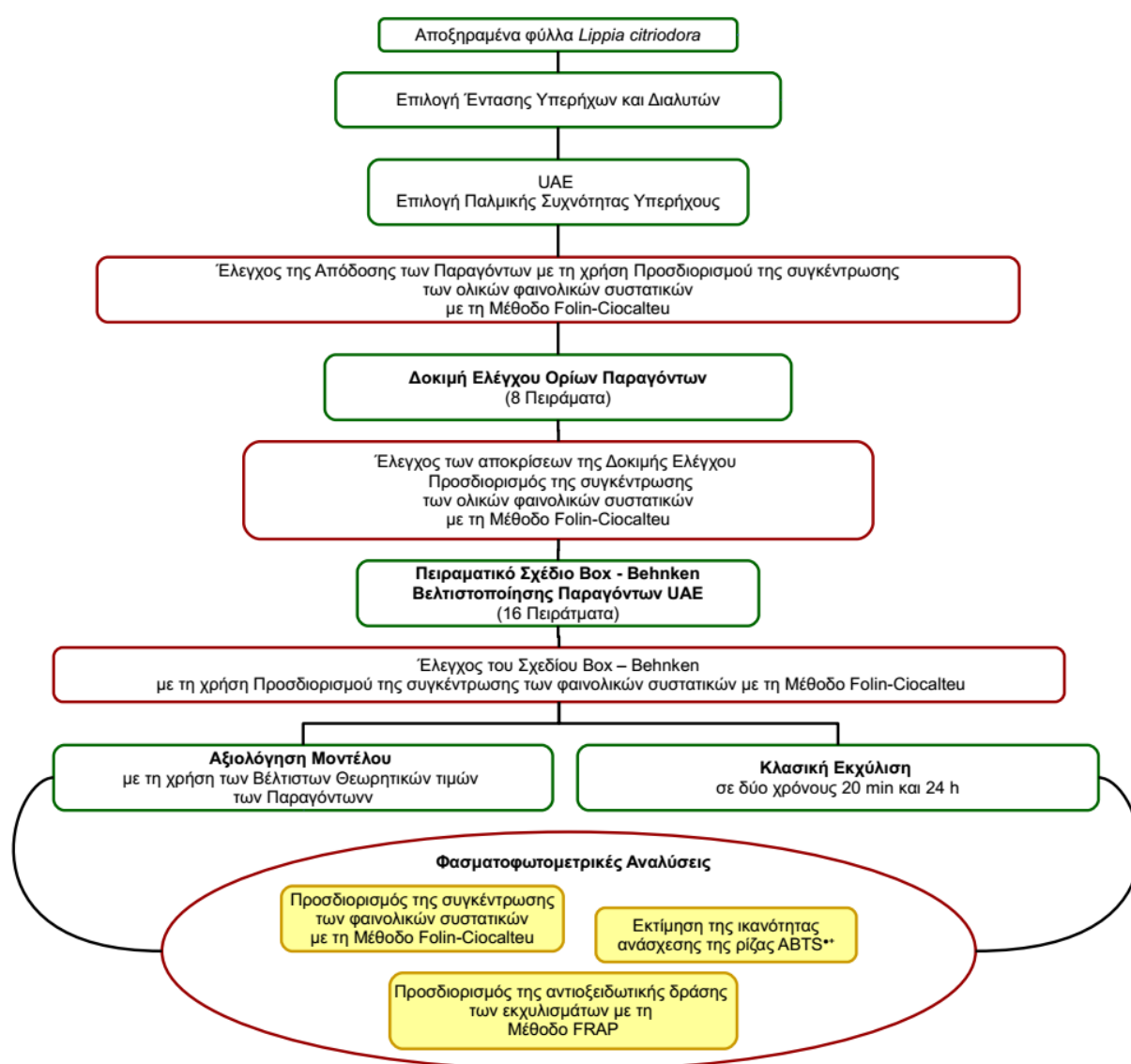
Σκοπός της εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης των περιεχόμενων βιοδραστικών ενώσεων των φύλλων της λουίζας και συγκεκριμένα των ολικών φαινολικών, με την χρήση της σύγχρονης τεχνικής υψηλής ενέργειας των υπερήχων. Για τον σχεδιασμό του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος Πειραματικού Σχεδιασμού της Δοκιμής Ελέγχου και Σχεδίου Box – Behnken. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και εκχυλίσες με την κλασική μέθοδο δηλαδή παραμονής του δείγματος στην ίδια αναλογία μίγματος διαλυτών και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος για χρόνους ίσους της εκχύλισης με υπερήχους και 24 h, υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος, τα εκχυλίσματα και από τις δύο τεχνικές εκχύλισης συγκρίθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, ως προς την αντιριζική τους δράση στην ρίζα ABTS^{•+} και ως προς την αναγωγική – αντιοξειδωτική τους δράση με την μέθοδο FRAP.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Διάγραμμα της πειραματικής πορείας

Η επεξεργασία των δειγμάτων της λουίζας, *Lippia citriodora* πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (Ι.Β.Φ.Χ.Β.) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.). Οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος (Τ.Ε.Ι.) Αθηνών.



Σχήμα 2.1.: Διάγραμμα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα του βοτάνου της λουίζας, *Lippia citriodora*.

2.2. Αναλώσιμα και οργανολογία

2.2.1. Αντιδραστήρια, διαλύτες και πρότυπες ουσίες

Για τα πειράματα που περιγράφονται στις Παραγράφους 2.3. έως και 2.5. :

Απεσταγμένο νερό (H₂O)

Μεθανόλη (MeOH): Methanol ≥99,8% (GC), CH₄O, MW=32,04 g/mol, CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich, France

Αιθανόλη (EtOH): Ethanol absolute for analysis, C₂H₅OH, MW=46,07 g/mol, Index-No: 603-002-00-5, Merck KGaA, Germany

Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃): Sodium Carbonate anhydrous, Assay 99,5–100,5%, MW=105,99 g/mol, CAS: 497-19-8, Carlo Erba Reagents, Italy

Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu: Folin–Ciocalteu's phenol reagent, 3H₂O·P₂O₅·14WO₃·4MoO₃·10H₂O & 3H₂O·P₂O₅·13WO₃·5MoO₃·10H₂O, Merck KGaA, Germany

Γαλλικό οξύ (GA): 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid anhydrous 99%, C₇H₆O₅, MW=170,12 g/mol, CAS: 149-91-7, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Germany

ABTS: ABTS 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (Spectrophotometric reagent for free chlorine and use as chromogenic substrate in enzyme-immunoassay) >98,0%, C₁₈H₂₄N₆O₆S₄, MW=548,58 g/mol, CAS: 30931-67-0, TCI Tokyo Chemical Industry Co. LTD, Japan

Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%, C₁₄H₁₈O₄, MW=250,29 g/mol CAS: 53188-07-01, Sigma-Aldrich, Germany

Υπερθειικό νάτριο (Na₂S₂O₈): Sodium persulfate ≥99,0% (RT), MW=238,10 g/mol, CAS: 7775-27-1, Sigma-Aldrich, Germany

TPTZ: 2,4,6-τρι-(2-πυριδύλ-)-τριαζίνη: 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine ≥99,0% , MW=312,33 g/mol, CAS: 3682-35-7, Sigma-Aldrich, Germany

Τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl₃): Iron(III) chloride ≥99,99%, MW=162,20 g/mol, CAS: 7705-08-0, Sigma-Aldrich, Germany

Οξικό νάτριο (άνυδρο) (CH₃COONa): Sodium acetate ≥99,%, MW=82,03 g/mol, CAS: 127-09-3, Sigma-Aldrich, Germany

Υδροχλωρικό οξύ (HCl): Hydrochloric acid 37%, MW=36,46 g/mol, CAS: 7647-01-0, Sigma-Aldrich, Germany

2.2.2. Συσκευές και επιστημονικά όργανα

Για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στις Παραγράφους 2.3. έως και 2.5. χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα και συσκευές:

Ζυγός ηλεκτρονικός ακρίβειας στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο του γραμμαρίου, AT261 DeltaRange, Mettler – Toledo International Inc. Switzerland

Συσκευή δημιουργίας υπερήχων (US) με Probe: Vibra-cell, Ισχύος 750W, Συχνότητας 20kHz, Sonics (Amplitude), Sonics & Materials, Inc., USA

Περιστρεφόμενος συμπυκνωτής, Rotavapor RE 111, Buchi Labortechnik AG, Switzerland

Υδατόλουτρο, 461 Water Bath, Buchi Labortechnik AG, Switzerland

Κυψελίδες πλαστικές για μέτρηση στο ορατό φάσμα χωρητικότητας 4,0 mL, l=0,1 dm, Kartell, Italy

Φασματοφωτόμετρο, Visible Spectrophotometer with Multiple Cell Holders Spectro 23RS, Labomed, Inc. U.S.A.

2.3. Δείγματα της λουίζας (*Lippia citriodora*) που μελετήθηκαν

Τα δείγματα του βοτάνου της *Lippia citriodora* που μελετήθηκαν αγοράστηκαν από την τοπική αγορά βοτάνων και μπαχαρικών των Αθηνών. Τα δείγματα στο σύνολο τους καλλιεργήθηκαν στην περιοχή της Καρδίτσας, της Περιφερειακής Ενότητας της Θεσσαλίας, και συλλέχθηκαν την καλοκαιρινή περίοδο του 2014. Τα δείγματα ήταν σε αποξηραμένη μορφή και διατηρήθηκαν μετά την αγορά σε σκιερό και δροσερό σημείο, σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες του έμπορου, για καλύτερη διατήρηση του προϊόντος.

2.4. Επεξεργασία των δειγμάτων

Η εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων (φύλλων) της *Lippia citriodora* έγινε με την τεχνική υψηλής ενέργειας των υπερήχων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος του Πειραματικού Σχεδιασμού προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το αποτέλεσμα της εκχύλισης. Η μεθανόλη είναι ένας συνηθισμένος και κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών από τρόφιμα, καθώς και ο συνδυασμός του με νερό. Κατά τη σχεδίαση του πειράματος η αναλογία διαλύτων/ δείγματος (mLg^{-1}), η αναλογία μεθανόλης/ νερού (%MeOH) και ο χρόνος έκθεσης στους υπερήχους (min) θεωρήθηκαν ως οι σημαντικότεροι παράγοντες με την μεγαλύτερη επίδραση στην εκχύλιση του συνόλου των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν και εκχυλίσεις με την συμβατική μέθοδο της συνεχούς ανάδευσης και παραμονής του δειγματος σε διαλύτη για χρόνους 20 min και 24 h, προκειμένου μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων να αποτιμηθεί η πρακτική εφαρμογή και χρηστικότητα της χρήσης των υπερήχων κατά την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υποστρώματα.



Εικόνα 2.1.: Συσκευή δημιουργίας υπερήχων (US) με Probe της Sonics & Materials (USA).

2.4.1. Εκχύλιση στερεού – υγρού με χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction, UAE) των φαινολικών συστατικών από τα φύλλα της λουίζας (*Lippia citriodora*)

Η ακτινοβολία υπερήχων διευκολύνει την εκχύλιση οργανικών και ανόργανων ενώσεων από στερεά υποστρώματα με τη χρήση υγρών διαλυτών. Κατά την εφαρμογή των υπερήχων δημιουργείται το φαινόμενο της «ακουστικής σπηλαίωσης», κατά το οποίο, παράγονται ηχητικά κύματα που δημιουργούν φυσαλίδες, οι οποίες εκρήγνυνται εκ των έσω και εκλούουν ενέργεια. Όσο μικρότερη είναι η συχνότητα των υπερήχων τόσο μεγαλύτερη η ενέργεια που προσφέρεται στο σύστημα. Με το σπάσιμο των φυσαλίδων διαρρηγνύονται τα κυτταρικά τοιχώματα, απελευθερώνοντας έτσι το περιεχόμενό τους.[32] Η τεχνική αυτή έχει γενικώς καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με άλλες μεθόδους εκχύλισης, γιατί εξασφαλίζει την άμεση επαφή του δείγματος με το διαλύτη εκχύλισης, μειώνει το μέγεθος των σωματιδίων και ενισχύει τη μεταφορά των περιεχόμενων ενώσεων από τα κύτταρα προς το διαλύτη.[33] Επίσης, η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων είναι κατάλληλη για την εκχύλιση φαινολικών ουσιών από φρούτα.[9] Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, η UAE είναι απλή, γρήγορη, και αποτελεσματική μέθοδος εκχύλισης που μπορεί να εφαρμοσθεί και σε μεγάλη κλίμακα για βιομηχανικούς σκοπούς. Επίσης, ο χρόνος που απαιτείται είναι σύντομος, ελαττώνεται η απελευθέρωση των τοξικών ρύπων λόγω της περιορισμένης κατανάλωσης οργανικού διαλύτη, και είναι σχετικά ανέξοδη διαδικασία.[34] Αποτελεί, λοιπόν, μια εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης.

Πορεία πειράματος

Οι φαινολικές ουσίες των αποξηραμένων φύλλων της λουίζας εκχυλίστηκαν με τη βοήθεια των υπερήχων και με διαλύτες μίγμα μεθανόλης/ νερού γνωστής αναλογίας. Σε ειδική ωοειδή φιάλη, κάθε φορά, λήφθηκε 1 g κονιορτοποιημένου δείγματος και μίγμα μεθανόλης/ νερού. Έπειτα, πραγματοποιούνταν προσαρμογή της στήλης παραγωγής των υπερήχων στην φιάλη και ρυθμιζόταν η συσκευή παραγωγής τους με τον επιλεγμένο χρόνο, συχνότητα παλμών και έντασης υπερήχων. Οι συνθήκες της εκχύλισης επιλέχθηκαν βάσει προηγούμενων πειραμάτων στο εργαστήριο καθώς και με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου του Πειραματικού σχεδιασμού για τη βέλτιστη εκχύλιση των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων. Επίσης, η φιάλη ήταν βυθισμένη σε παγόλουτρο, ώστε η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης να μην ξεπεράσει τους 35°C και υποβαθμιστούν τα συστατικά των δειγμάτων.

Με το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 min, ώστε να διαχωριστεί το στερεό και το εκχύλισμα σε δύο φάσεις και στη συνέχεια παραλήφθηκε το υπερκείμενο. Στην συνέχεια, το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα υπό κενό. Τέλος, τα ξηρά εκχυλίσματα ζυγίστηκαν, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε γνωστό όγκο και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ερμητικά κλειστά γυάλινα δοχεία όσο διήρκεσε η πειραματική μελέτη.

2.4.2. Κλασική μέθοδος εκχύλισης στερεού–υγρού των φαινολικών συστατικών από την λουίζα (*Lippia citriodora*)

Με το πέρας των πειραμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με την κλασική μέθοδο της παραμονής του δείγματος σε διαλύτη και συνεχή ανάδευση. Η αναλογία διαλυτών/ δείγματος (mLg^{-1}) και αναλογία μεθανόλης/ νερό (%MeOH) έλαβαν τις βέλτιστες προτινόμενες από το μοντέλο του Πειραματικού Σχεδιασμού ώστε η συγκρισή με τα εκχυλίσματα να διαφέρουν ως προς το χρόνο (min) και την χρήση των υπερήχων κατά την εκχύλιση.

Σε ξεχωριστά ποτήρια ζέσεως τοποθετήθηκαν 1 g λουίζας (φύλλα και μίσχοι, ξηραμένοι και κονιοροτοποιημένοι) και προστέθηκαν σε κάθε φιάλη 40,0 mL διαλυτών αναλογίας μεθανόλης/ νερό 85% MeOH για την εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου. Η εκχύλιση διήρκεσε 20 min και 24 h σε συνθήκες σκότους και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό διαρκή ανάδευση. Με το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε φυγοκέντριση και παραλαβή του καθαρού από στερεά υπολείμματα υπερκειμένου. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα υπό κενό, ζυγίστηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε γνωστό όγκο, τα οποία και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ερμητικά κλειστά γυάλινα δοχεία όσο διήρκεσε η πειραματική μελέτη.

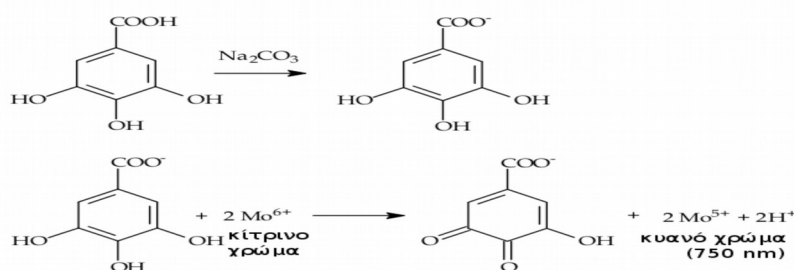
2.5. Μέθοδοι αξιολόγησης του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των εκχυλισμάτων της λουίζας (*Lippia citriodora*)

Οι μέθοδοι αξιολόγησης του συνόλου των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων καθώς και της αντιριζικής και αναγωγικής και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων ήταν οι εξής:

- Μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών Folin – Ciocalteu,
- Μέθοδος αποτίμησης της αντιριζικής δράσης ABTS^{•+} και
- Μέθοδος αποτίμησης της αναγωγικής και αντιοξειδωτικής δράσης FRAP.

2.5.1. Υπολογισμός του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) με τη Μέθοδο Folin–Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων από τα δείγματα των φύλλων της λουίζας προσδιορίστηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου Folin–Ciocalteu (F–C). Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχικά το 1972 από τους Folin και Ciocalteu για τη μέτρηση της τυροσίνης, αργότερα, το 1965, προσαρμόστηκε από τους Singleton and Joseph για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ουσιών σε κρασί.[9]



Σχήμα 2.2.: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο F–C μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e^- . [35]

Το αντιδραστήριο F–C αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου (Mo) και του βολφραμίου (W). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η φαινολική ένωση οξειδώνεται, και το αντιδραστήριο ανάγεται προς οξειδία που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου.[36] Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου, η συγκέντρωση του οποίου εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου προτύπου.[9]

Παρόλο που ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, η μέθοδος προσδιορισμού είναι απλή, πρακτική και με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.[24]

Πορεία του πειράματος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη, με ελάχιστες τροποποιήσεις, είναι μια μικρομέθοδος με το δυνατόν ελάχιστη χρήση αντιδραστηρίων και διαλυτών, που εφαρμόζεται ως ανάλυση ρουτίνας σε δείγματα τροφίμων και ποτών.[37] Αρχικά, παρασκευάζεται το κορεσμένο διάλυμα αθρακικού νατρίου Na_2CO_3 ως εξής: Σε 800,0 mL απεσταγμένου H_2O διαλύονται 200,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) με τη βοήθεια του βρασμού. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται ~80 g κρυστάλλων Na_2CO_3 , και το διάλυμα αφήνεται για 24 h. Τέλος, φιλτράρεται και

αραιώνεται μέχρι τα 1,00 L απεσταγμένου H₂O. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ως πρότυπη φαινολική ουσία για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης επιλέχθηκε το γαλλικό οξύ (gallic acid, GA). Παρασκευάστηκε stock διάλυμα αυτής, συγκέντρωσης 5,00 g GA/L ως εξής: 0,500 g GA διαλύονται πλήρως σε 10,0mL αιθανόλης, και αραιώνονται με απεσταγμένο H₂O μέχρι τα 100,00 mL. Διατηρείται στο ψυγείο μέχρι 2 εβδομάδες. Από το stock διάλυμα παρασκευάζονται υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων από 25 μέχρι 500 mg GA/L, κάθε διαφορετική ημέρα σειράς πειραμάτων. Η μετέπειτα πειραματική πορεία για τα δείγματα της *L. citriodora*, και των πρότυπων διαλυμάτων περιγράφεται ακολούθως. Σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 mL, με τη χρήση ηλεκτρονικών πιπετών τοποθετούνται 10,0 μL προτύπου και 1 μL συμπυκνωμένου δείγματος (όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.4.1 και 2.4.2.) 2500,0 μL απεσταγμένου H₂O και 200,0 μL αντιδραστηρίου F–C (βιομηχανικά παρασκευασμένο). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και μετά από αναμονή 8min, προστίθονται 500,0 μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃, και το μείγμα αναδεύεται ξανά. Έπειτα, οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 min σε υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40°C, σε συνθήκες σκότους. Αφού αναπτυχθεί το επιθυμητό μπλε χρώμα και το περιεχόμενο των κυψελίδων αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε μετράται σε φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση στα 750 nm (A_{750nm}) για κάθε δείγμα ή πρότυπο. Η διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης εξαιτίας του διαλύτη των δειγμάτων και των προτύπων γίνεται με “τυφλό” δείγμα. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

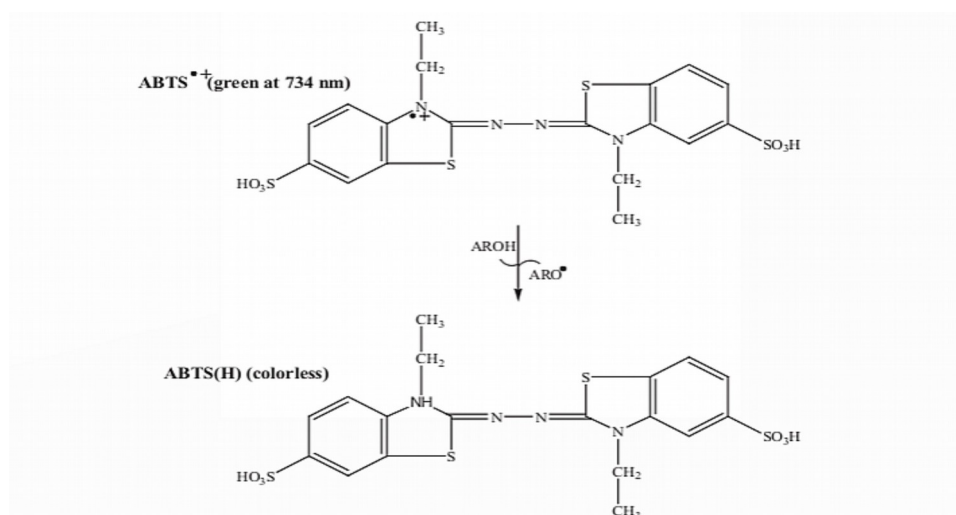
Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται γραφικά η πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE).

2.5.2. Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης/ανάσχεσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

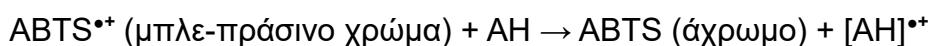
Είναι μια σχετικά πρόσφατα αναπτυγμένη δοκιμή από τους Miller κ.ά. (1993) στην οποία χρησιμοποιείται η ρίζα ABTS^{•+} [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβεζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) και εφαρμόζεται εξίσου σε λιπόφιλα και υδρόφιλα αντιοξειδωτικά.[38], [39] Η μεθοδολογία

που ακολουθείται για την εκτίμηση της αντιριζικής ισχύος διάφορων ουσιών, μεταξύ αυτών και των φαινολικών, βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού, όπως και η δοκιμή με τη ρίζα DPPH•, και έχει βελτιστοποιηθεί από τους Re κ.ά. το 1999.[38] Η μονοκατιοντική ρίζα ABTS•⁺ χρώματος μπλε-πράσινου (μέγιστο απορρόφησης στα 734 nm) σχηματίζεται άμεσα από την οξείδωση του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειικό κάλιο. Παρουσία μορίων που είναι δότες υδρογόνου, η ρίζα ABTS•⁺ μειώνεται ποσοτικά ανάλογα με τη δραστηριότητα του δότη υδρογόνου, τη συγκέντρωσή του και τη διάρκεια της αντίδρασης. [38]

Η σάρωση της ρίζας ABTS•⁺ πραγματοποιείται είτε με τη μεταφορά ενός υδρογόνου είτε με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από μια αντιριζική ένωση (AH).



Σχήμα 2.3.: Δομή της ρίζας ABTS•⁺ που απορροφά στα 734 nm.[36]



Είναι μια γρήγορη, λειτουργικά απλή και ακριβής διαδικασία για τη συστηματική εκτίμηση της ικανότητας σάρωσης ελευθέρων ριζών διάφορων εκχυλισμάτων από φυτικά υλικά και τρόφιμα που μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεγάλη κλίμακα.[24]

Πορεία του πειράματος

Πρώτο στάδιο αποτελεί η δημιουργία της ρίζας ABTS•⁺. Παρασκευάζεται, λοιπόν, υδατικό διάλυμα που περιέχει εν διαλύσει την ουσία ABTS συγκέντρωσης 7,00 mM και υπερθειικό νάτριο (Na₂S₂O₈) σε συγκέντρωση 2,45 mM. Το μείγμα αφήνεται 16 h στο σκοτάδι και

θερμοκρασία δωματίου. Η οξειδωση της ABTS από τα υπερθειικά ιόντα ξεκινά κατευθείαν, αλλά η στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι 1,0:0,5, οπότε η οξειδωση θα είναι ατελής. Η ρίζα υπό τη μορφή του μονού κατιόντος είναι σταθερή για πάνω από 2 ημέρες αποθηκευμένη σε σκοτάδι και θερμοκρασία δωματίου.

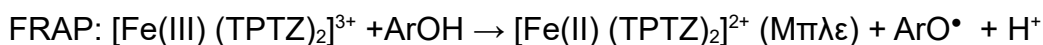
Στην αρχή κάθε σειράς πειραμάτων, το διάλυμα της ρίζας αραιώνεται κατάλληλα με αιθανόλη ώστε να δίνει τιμή απορρόφησης $A_{734nm} \approx 0,70 \pm 0,02$. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιείται η Trolox, της οποίας παρασκευάζεται το stock αιθανολικό διάλυμα 0,006 M, και από αυτό διαλύματα συγκεντρώσεων από 0,20 έως 1,50 mM. Τα διαλύματα της πρότυπης ουσίας πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένα. Σε πλαστικές κυψελίδες τοποθετήθηκαν 1,0 μ L συμπυκνωμένου δείγματος και 15 μ L προτύπου με 3000,0 μ L αραιωμένου διαλύματος ABTS** και αναδεύονται στο σκοτάδι για 1 min. Η απορρόφηση A_{734nm} μετράται μετά την πάροδο 5min. Υπολογίζεται, τέλος, μέσω “τυφλών” δειγμάτων το αρνητικό σφάλμα που προκαλείται στις τιμές της απορρόφησης από τον όγκο των διαλυτών των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν (3 διαφορετικές κυψελίδες) για κάθε δείγμα ή διάλυμα της πρότυπης ουσίας κάθε φορά, ενώ διαφορετικές σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια ημέρα, αλλά και σε διαφορετικές ημέρες.

Έκφραση των αποτελεσμάτων

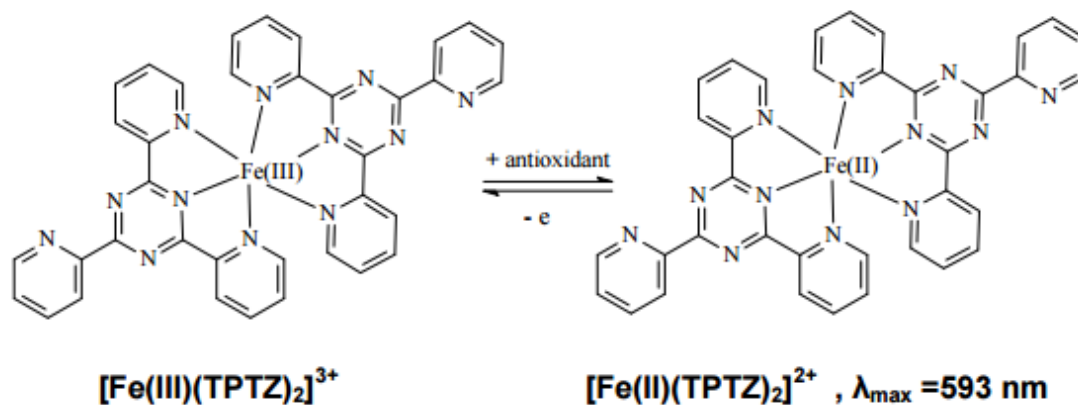
Η δοκιμή της ABTS** παρέχει μια εκτίμηση για τη δραστικότητα των δειγμάτων απέναντι στη συγκεκριμένη ρίζα, η οποία εκφράζεται ως συγκέντρωση αυτών σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (Trolox Equivalents, TE) μέσω της καμπύλης συσχέτισης.

2.5.3. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής – αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδος Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP

Η μέθοδος FRAP αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Benzie και Strain[40] (1996) για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του πλάσματος του αίματος και από τότε έχει τροποποιηθεί για την χρήση της και σε άλλα φυσικά προϊόντα όπως τα φυτικά εκχυλίσματα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη (Fe(III)- TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe(II) -TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση διεξάγεται σε pH = 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη. Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω:



όπου ArOH= φαινολικό αντιοξειδωτικό, TPTZ: 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ-)-τριαζίνη



Σχήμα 2.4.: Αναγωγή σιδήρου

Λόγω της βαθμιαίας μείωσης της απορρόφησης με την πάροδο του χρόνου για μερικές κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών όπως τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή, θα πρέπει να επέλθει ένας συμβιβασμός ανάμεσα στις τεχνικές μέτρησης (π.χ. γρήγορη έναντι καθυστερημένης μέτρησης της απορρόφησης στους 37°C). Έτσι, θεωρείται ότι οι τιμές που λαμβάνονται με μέτρηση της απορρόφησης στα 593 nm σε χρόνο 4 min λαμβάνουν υπόψη την κινητική της αντίδρασης καλύτερα από τις τιμές που λαμβάνονται στα 60 min.[41] Πρέπει επομένως στα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζεται και η κινητική της αντίδρασης και η θερμοδυναμική αυτής ώστε να συλλέγονται χρήσιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών των τροφίμων. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή με τα υψηλότερα αποτελέσματα δράσης όπως αυτά μετρήθηκαν με τη μέθοδο FRAP ήταν και τα πιο ευοξειδωτα συστατικά, δηλαδή με το χαμηλότερο δυναμικό οξειδωσης/αναγωγής, επιβεβαιώνει ότι η FRAP είναι μια ορθώς επιλεγμένη μέθοδος μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης.[42]

Πειραματική πορεία

Στη μέθοδο αυτή, το άλας του τρισθενούς σιδήρου $\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2\text{Cl}_3$ (TPTZ= 2,4,6-τριπυτιδυλο-s-τριαζίνη) χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του άλατος του Fe(III) (~0,70 V) είναι όμοιο με αυτό του ABTS^{•+} (~0,68 V).[43] Η μέθοδος λαμβάνει χώρα σε όξινες συνθήκες (pH = 3,6) και περιλαμβάνει την ακόλουθη διαδικασία:

- Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος (P.Δ.) συγκέντρωσης 300 mM και pH 3,6 με ανάμιξη οξικού άλατος και απεσταγμένου νερού

- Παρασκευή διαλύματος HCl συγκέντρωσης 40 mM
- Μίξη του HCl 40 mM με στερεό TPTZ για την παρασκευή διαλύματος TPTZ συγκέντρωσης 10 mM
- Προετοιμασία διαλύματος σε νερό $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα διατηρήθηκε στο ψυγείο καλυμμένο με αλουμινόχαρτο
- Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων Fe^{2+} συγκέντρωσης 20-400 μM για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης.
- Ετοιμασία του αντιδραστηρίου FRAP με μίξη: 5,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος (+) 500 μL TPTZ (+) 500 μL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Το αντιδραστήριο FRAP διατηρείται στο σκοτάδι

Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε κάθε κυψελίδα 1 μL συμπυκνωμένου εκχυλίσματος 1950 μL H_2O , 500 μL Ρ.Δ. και 900 μL αντιδραστηρίου FRAP. Όλα τα δείγματα αφέθηκαν σε υδρόλουτρο 40°C για 60 min και ύστερα μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση τους στο A_{595}

Έκφραση των αποτελεσμάτων

Από τη σύγκριση των τιμών της A_{595} πρότυπης καμπύλης και των δειγμάτων ποσοτικοποιήθηκε ο Fe(II) που βρίσκεται στα δείγματα. Ο Fe(II) είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης του συμπλόκου Fe(III) με τα αντιοξειδωτικά και επομένως η αντιοξειδωτική ισχύς μπορεί να εκφραστεί με την ποσοτικοποίηση του Fe(II).

2.6. Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης

Η RSM εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών της UAE για τον ποσοτική ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από τα φύλλα της λουίζας. Αρχικά εφαρμόστηκε το σχέδιο Δοκιμής ελέγχου δύο επιπέδων και 8 πειραμάτων, 2^3 standard designs [Box, Hunter & Hunter], με δύο κεντρικά σημεία με σκοπό την οριοθέτηση των τιμών των σημαντικών παραγόντων χρόνου (min, x_1), αναλογίας μεθανόλης/ νερού (MeOH%, x_2) και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος (mLg^{-1}). Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα της Δοκιμής ελέγχου εφαρμόστηκε το BBD τριών επιπέδων και 16 πειραμάτων, $3^{**}[\text{K-p}]$ and Box – Behnken designs, με τέσσερα κεντρικά σημεία με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραγόντων χρόνου (min, x_1), αναλογίας μεθανόλης/ νερού (MeOH%, x_2) και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος (mLg^{-1}) και την βελτιστοποίηση της ανάκτησης των περιεχόμενων ολικών φαινολικών (mg GAE/ g λουίζας).

Επειδή κάθε μεταβλητή αναφέρεται σε διαφορετικό φυσικό μέγεθος και έχει διαφορετικό εύρος πειραματικών τιμών, η σημασία αυτών των παραγόντων μπορεί να εκτιμηθεί

καλύτερα όταν οι τιμές τους κανονικοποιηθούν και κωδικοποιηθούν σε συγκρίσιμες πλέον μεταξύ τους τιμές. Η σχέση μεταξύ των κωδικοποιημένων και των πραγματικών τιμών εκφράζεται με την παρακάτω εξίσωση (1):

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta_x}, i = 1, 2, 3, \dots (1)$$

Όπου, x_i : η κωδικοποιημένη τιμή για την ανεξάρτητη μεταβλητή, X_i : η πραγματική τιμή για την ανεξάρτητη μεταβλητή, X_0 : η πραγματική τιμή για την ανεξάρτητη μεταβλητή στο κεντρικό σημείο, Δ_x : η τιμή με βάση την οποία αλλάζει η ανεξάρτητη μεταβλητή. Οι πραγματικές και κωδικοποιημένες τιμές παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.2.1. και 3.3.1.1..

Τα πειραματικά δεδομένα του BBD της UAE προσαρμόστηκαν σε μία δευτεροταγή πολυωνυμική συνάρτηση, η οποία σχετίζει τις αποκρίσεις των πειραμάτων με τις ανεξάρτητες μεταβλητές σύμφωνα με την ακόλουθη συνάρτηση (2):

$$x_i = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i X_i + \sum_{i=1}^3 A_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 A_{ij} X_i X_j (2)$$

Όπου, y : η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά φαινοτικά (εξαρτημένη μεταβλητή), A_0 : σταθερός όρος της συνάρτησης, A_i , A_{ii} και A_{ij} : υπολογισμένοι συντελεστές του Box – Behnken σχεδίου, X_i^2 , X_i και X_j : τα επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών που αντιπροσωπεύουν τις τετραγωνικές, γραμμικές και τις αλληλεπιδράσεις αυτών των μεταβλητών στην απόκριση, αντίστοιχα.

2.7. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων των Πειραματικών σχεδιασμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Statistica (Version 10, StatSoft, Inc., USA). Οι υπολογισμοί έγιναν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και τιμές $p \leq 0,05$, υποδεικνύοντας ότι ένας παράγοντας ήταν στατιστικά σημαντικός.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Προκαταρκτικά Πειράματα

Για την εξέταση της απόδοσης των διάφορων παραγόντων της εκχύλισης με τη χρήση υπερήχων (UAE), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin – Ciocalteu για τον προσδιορισμό του Ολικού Περιεχομένου σε Φαινολικά Συστατικά (TPC – Total Phenolic Content). Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφράστηκε σε mg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (GAE - Gallic Acid Equivalents) ανά g ξηρού δείγματος λουίζας. Μια αντιπροσωπευτική καμπύλη συσχέτισης της πρότυπης ένωσης του γαλλικού οξέος παρατίθεται στο Παράρτημα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική ($R > 0,95$).

3.1.1. Επίδραση της έντασης της ισχύος των υπερήχων κατά την UAE

Σύμφωνα με τους Tsiaka T. *et al.* (2015) και προηγούμενες εργασίες UAE του εργαστηρίου σε φυτικά υποστρώματα [21], [44], η ισχύς των παραγόμενων υπερήχων τέθηκε στα 600 W, ενώ το μέγιστο δυνατό του οργάνου ήταν τα 750 W. Σε υψηλότερες τιμές ισχύος από τα 600 W, η απόδοση της εκχύλισης μπορεί να παρουσιάσει μείωση, καθώς λόγω του αυξημένου μεγέθους των σχηματιζόμενων φυσαλίδων που προκαλεί το φαινόμενο της «ακουστικής σπηλαίωσης» προκαλείται ύφεση του ίδιου του φαινομένου. Δηλαδή, η δημιουργία πολύ μεγάλων φυσαλίδων και η ενέργεια που απελευθερώνουν εμποδίζει την δημιουργία και άλλων φυσαλίδων με αποτέλεσμα τη διασπορά των υπερηχητικών κυμάτων χωρίς κάποιο αντίκρισμα στην πορεία της εκχύλισης. [45]

3.1.2. Επίδραση των διαλυτών κατά την UAE

Κατά την εκχύλιση με τη χρήση των υπερήχων (UAE) η ανάκτηση των ζητούμενων ενώσεων επιτυγχάνεται μέσω του φαινομένου την ακουστικής σπηλαίωσης. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες με χαμηλή τάση ατμών όπως το νερό (17,54 mmHg) ή μικρό ιξώδες όπως η μεθανόλη (0,55 cP) και το εξάνιο (0,31 cP). Παρόλα αυτά, οι ακραίες συνθήκες πίεσης έως και 1000 atm και θερμοκρασίας μέχρι 5000 K με ρυθμό αυξομείωσης της θερμοκρασίας έως και 1010 K/s που επικρατούν, μπορούν να οδηγήσουν σε υποβιβασμό των φαινολικών ενώσεων. Έτσι, προτιμώνται διαλύτες με

υψηλότερη τάση ατμών όπως είναι η μεθανόλη (97 mmHg) και παρόμοια πολικότητα με τις φαινολικές ενώσεις. Επιπρόσθετα, διαλύτες με μικρότερο ιξώδες από το νερό (1 cP) διαχέονται ευκολότερα στα κύτταρα, είτε φυτικά είτε ζωικά, όπου και διευκολύνουν την έκφραση του φαινομένου της «ακουστικής σπηλαίωσης».[45]

Για τις εκχυλίσσεις του φαινολικού περιεχομένου των φύλλων της *Lippia citriodora* επιλέχθηκαν ως διαλύτες οι μεθανόλη και το νερό (Πίνακας 3.1.).[21], [33] Η μεθανόλη είναι οργανικός διαλύτης σχετικά ασφαλής, με πολικότητα μικρότερη του νερού, υψηλή τάση ατμών και μικρό ιξώδες.

Πίνακας 3.1. Ιδιότητες διαλυτών UAE

Διαλύτες	Ιξώδες mPa·s (στους 25 °C)	Τάση ατμών kPa (στους 20 °C)	Πολικότητα (D)
Νερό (H ₂ O)	0.890	3.169	1.85
Μεθανόλη (CH ₃ OH)	0.545	13.02	1.69

3.1.3. Επίδραση της Παλμικής Συχνότητας κατά την UAE

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία[45], μία παλμική συχνότητα κατά την UAE είναι πιο αποδοτική και ενεργειακά συμφερότερη από ότι η συνεχής υπερήχηση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της παλμικής συχνότητας 30 s On – 5 s Off και της συνεχούς, ενώ παρουσιάστηκε διαφορά μεταξύ των δύο παλμικών συχνοτήτων των 15 s On – 5 s Off και 30 s On – 5 s Off με αποτέλεσμα να επιλεγεί η παλμική συχνότητα 30 s On και 5 s Off, όπως ακριβώς προτείνεται και παραπάνω, για λόγους καλύτερης απόδοσης αλλά και διατήρησης της καλής λειτουργίας της συσκευής παραγωγής των υπερήχων.

Πίνακας 3.2. Σύγκριση του Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου επιλεγμένων Παλμικών Συχνοτήτων κατά τις UAE

Ισχύς US (W)	Χρόνος εκχύλισης (min)	Παλμική Συχνότητα (s)	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (mg GAE/ g λουίζας)
600	5	15 ON – 5 OFF	15,96 ($\pm 0,36$) ^a
		30 ON – 5 OFF	17,13 ($\pm 0,67$) ^a
		Συνεχής Παλμός	17,39 ($\pm 0,46$) ^a

^a Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση

3.2. Δοκιμή ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για την Βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε Ολικά φαινολικά

Εξαιτίας του μεγάλου εύρους των τιμών που μπορούν να λάβουν οι σημαντικοί παράγοντες είναι πρακτικά αδύνατο να εντοπιστεί και να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συνεισφορά του καθένος στην απόκριση της εκχύλισης. Οι τιμές των παραγόντων περιορίζονται μόνο από τα φυσικά όρια που προκύπτουν, όπως το μέγεθος της φιάλης των υπερήχων (έως 100 mL), τα όρια ισχύος (750 W) και αντοχής (≈ 45 min) της συσκευής παραγωγής των υπερήχων. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να ελεγχθούν τα όρια των τιμών των σημαντικών παραγόντων. Η δοκιμή ελέγχου που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό τον εντοπισμό των οριακών τιμών των παραγόντων που έχουν τεθεί ως σημαντικοί. Αυτοί οι παράγοντες είναι ο χρόνος (min), η αναλογία μεθανόλης/ νερού (% MeOH) και η αναλογία διαλυτών/ δείγματος λουίζας (mL/ g). Για την Δοκιμή ελέγχου εφαρμόστηκε το πλήρως παραγοντικό πειραματικό σχέδιο 2^3 Standard Designs [Box, Hunter & Hunter] ενώ οι τιμές των παραγόντων κωδικοποιήθηκαν και η σειρά των πειραμάτων έγινε με τυχαία σειρά προκειμένου να αποτραπεί η πραγματοποίηση κάποιου συστηματικού σφάλματος. Τα πειράματα και οι αποκρίσεις τους σε κάθε συνδυασμό τιμών των παραγόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3..

Πίνακας 3.3. Πειραματικές τιμές της Δοκιμής Ελέγχου των οριακών τιμών των παραγόντων προς βελτιστοποίηση της UAE ολικών φαινολικών

Αριθμός Δοκιμής	x_1 (χρόνος εκχύλισης, min)	x_2 (αναλογία μεθανόλης/ νερού, % MeOH)	x_3 (αναλογία διαλυτών/ δείγμα, mLg ⁻¹)	Απόδοση εκχύλισης (mg GAE ανά g δείγματος)
7	-1	-1	-1	10,33
3	-1	-1	1	17,30
2	1	1	1	22,37
8	1	-1	-1	8,60
6	1	1	-1	12,93
4	1	-1	1	20,46
1	-1	1	1	12,50
5	-1	1	-1	5,97

Οι ακριβείς τιμές για την Δοκιμή Ελέγχου που αντιστοιχούν στις κωδικοποιημένες τιμές -1 και 1 είναι 2 και 20 min για τον χρόνο εκχύλισης, 50 και 90% MeOH για την αναλογία μεθανόλης/ νερού και 5 και 20 mLg⁻¹ για την αναλογία διαλυτών/ δείγματος, αντίστοιχα.

Η απόδοση σε ολικά φαινολικά κυμάνθηκε από 5,97 έως 22,37 mg GAE ανά g δείγματος λουίζας. Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί η σημαντικότητα και καταλληλότητα του προτεινόμενου μοντέλου. Τα αποτελέσματα ANOVA παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

Η δοκιμή F και οι τιμές p χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η σημαντικότητα του κάθε παράγοντα. Ένας παράγοντας θεωρείται σημαντικός όταν η τιμή p είναι μικρότερη από 0,05. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της ANOVA για την Δοκιμή Ελέγχου των παραγόντων, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο έχει η αναλογία διαλυτών/ δείγματος.

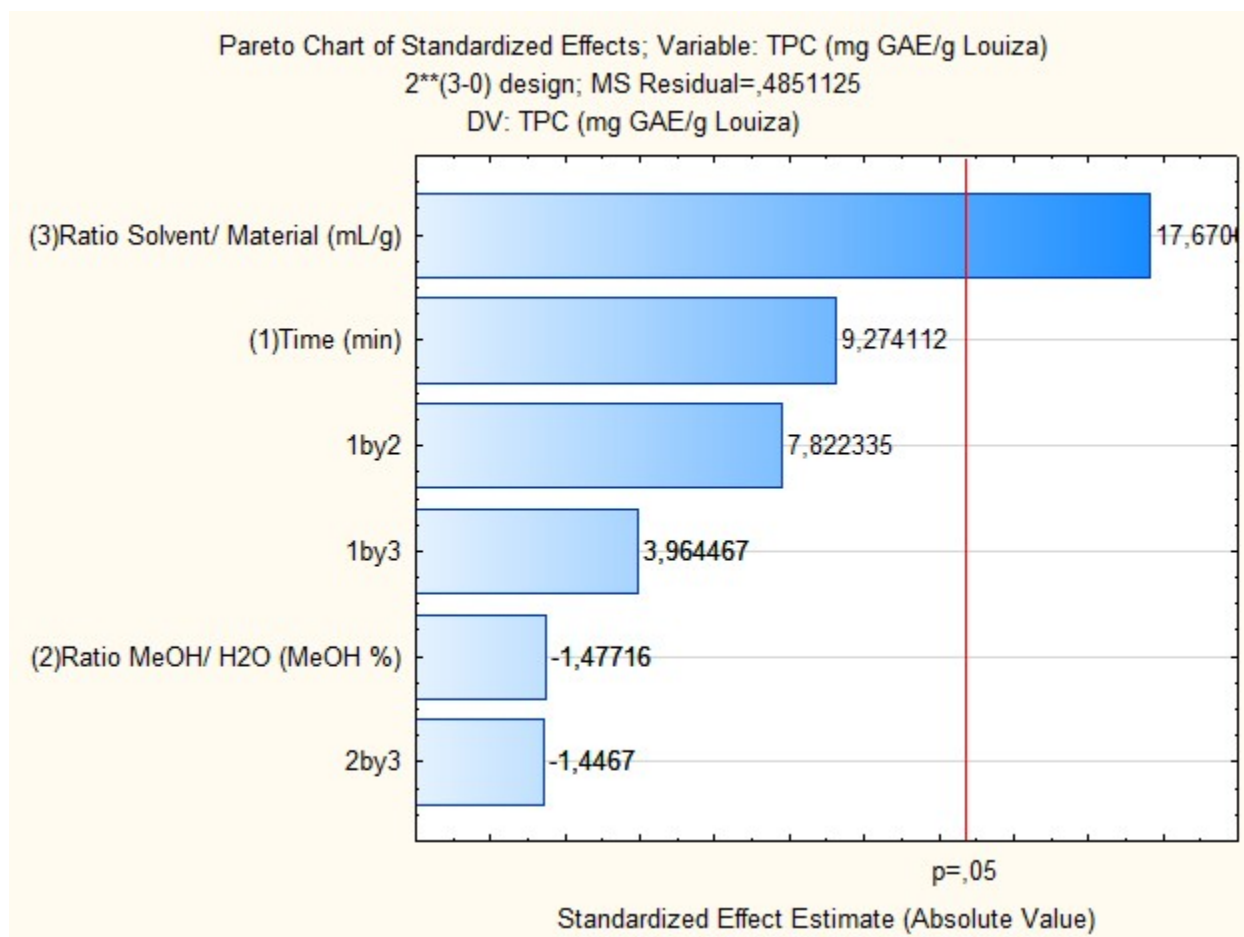
Πίνακας 3.4. ANOVA της ανάκτησης ολικών φαινολικών μέσω της UAE

Παράγοντες	Άθροισμα των τετραγώνων (SS)	Τιμή - <i>F</i>	Τιμή - <i>p</i>
x_1	41,7241	86,0091	0,068381
x_2	1,0585	2,1820	0,378856
x_3	151,4670	312,2307	0,035990^a
$x_1 * x_2$	29,6835	61,1889	0,080946
$x_1 * x_3$	7,6245	15,7170	0,157300
$x_2 * x_3$	1,0153	2,0929	0,385037
Συνολικό SS (βαθμοί ελευθερίας)			233,0581 (7)
R^2			0,99792
R^2_{adj}			0,98543

^a Παράγοντες με τιμή $p \leq 0,05$

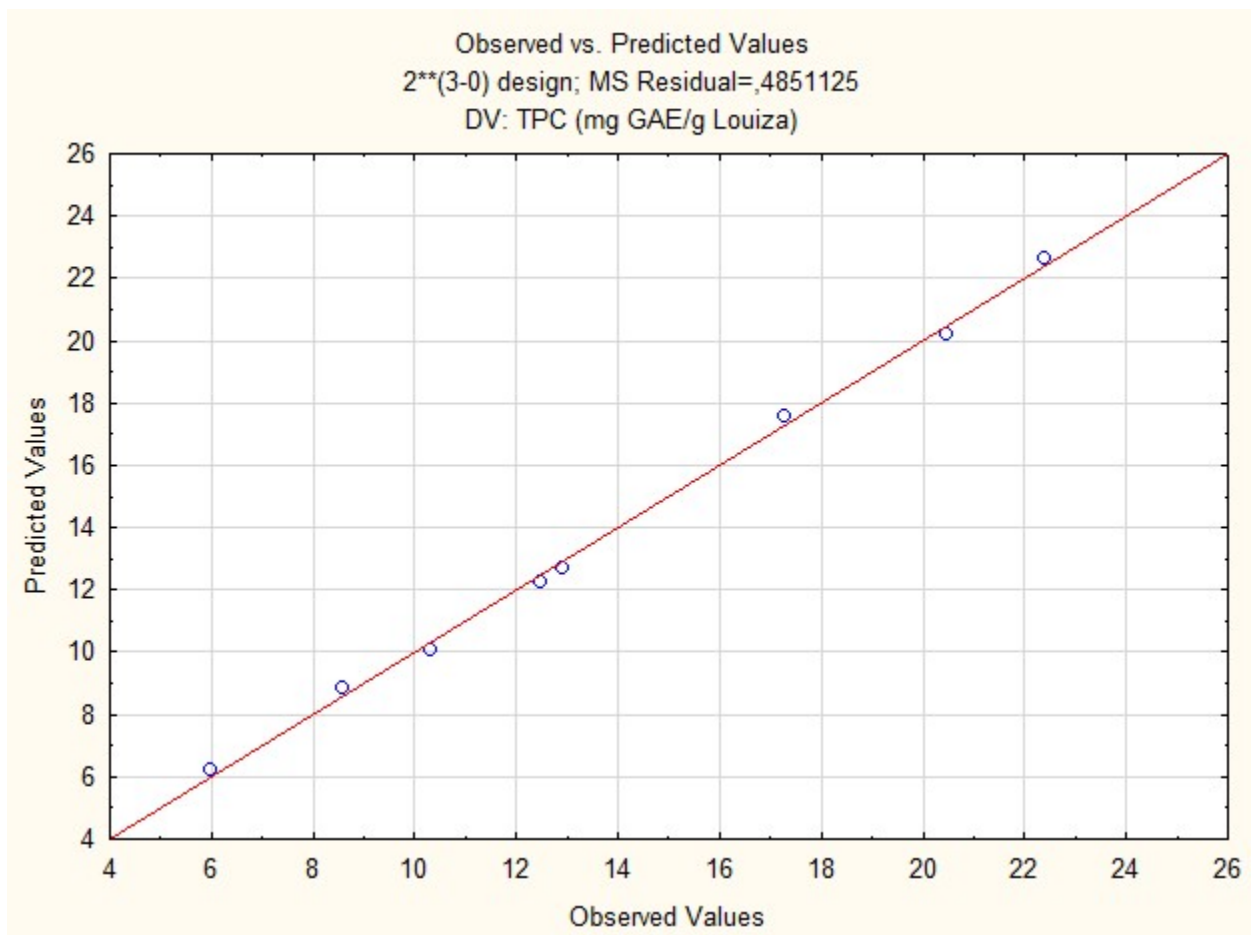
Η σημαντικότητα του κάθε παράγοντα αναπαρίσταται γραφικά και από το διάγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων για την UAE στο Σχήμα 3.1.. Στο σχήμα αυτό, οι παράγοντες όπως και η γραμμική αλληλεπίδρασή τους τίθενται σε φθίνουσα σειρά σημαντικότητας επίδρασης στην UAE, ανάλογα με την τιμή p που έχει λάβει η κάθε μία από τα αποτελέσματα της ANOVA. Οι παράγοντες που βρίσκονται πέρα από το όριο του 95% του επιπέδου εμπιστοσύνης θεωρούνται ως σημαντικοί, δηλαδή, στην περίπτωση μας η αναλογία διαλυτών/δείγματος.

Από τον Πίνακα 3.4., συμπεραίνεται ότι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% το προτεινόμενο μοντέλο επέδειξε ακρίβεια και καλή εφαρμογή, καθώς οι τιμές συντελεστή προσδιορισμού R^2 ($>0,95$) έδειξαν σημαντική συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και των προβλεπόμενων. Η ικανότητα αυτή πρόβλεψης του μοντέλου παρουσιάζεται από το διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι παρατηρούμενων τιμών στο Σχήμα 3.2..



Σχήμα 3.1. Διάγραμμα Pareto επίδρασης των υπό εξέταση παραγόντων της UAE.

Τέλος, ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού R^2_{adj} , ο οποίος δείχνει το ποσοστό των μεταβλητών απόκρισης από τις ανεξάρτητες μεταβλητές που πραγματικά επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή, αποδεικνύει την επάρκεια του μοντέλου καθώς η τιμή του είναι υψηλότερη του 0,80. Συγκεκριμένα, το ποσοστό μεγαλύτερο του 98% της μεταβλητής απόκρισης εξηγείται και υποδεικνύει την ακρίβεια του μοντέλου για την UAE.



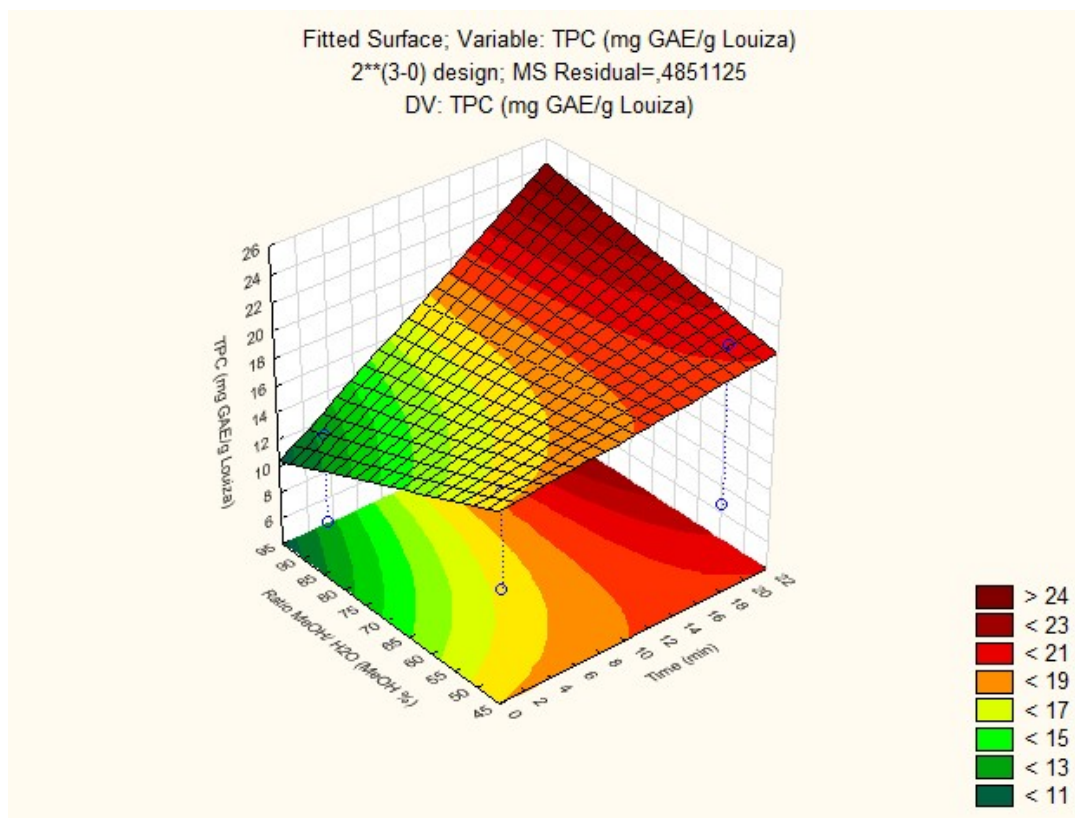
Σχήμα 3.2. Διάγραμμα παρατηρούμενων έναντι προβλεπόμενων τιμών της Δοκιμής Ελέγχου της UAE.

3.2.1. Επιφάνειες απόκρισης για την Δοκιμή Ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για την Βελτιστοποίηση της Απόδοσης της UAE σε Ολικά Φαινολικά

Τα διαγράμματα επιφανειών απόκρισης χρησιμοποιούνται για την τρισδιάστατη απεικόνιση της επίδρασης δύο παραγόντων, ενώ ο τρίτος τίθεται είτε σε μία μέση τιμή από τις καθορισμένες είτε ελεύθερα από τον χειριστή του προγράμματος, προκειμένου να ελέγξει όλες τις πιθανές αποκρίσεις του μοντέλου πρόβλεψης. Στα Σχήματα 3.3. – 5. παρουσιάζονται οι επιφάνειες απόκρισης της του μοντέλου της Δοκιμής Ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε ολικά φαινολικά.

Από την επιφάνεια απόκρισης του Σχήματος 3.3. διακρίνεται η αλληλεπίδραση του χρόνου σε σχέση με την αναλογία μεθανόλης/ νερό και την αναλογία διαλυτών/ δείγματος σταθερή, με τιμή 20 mLg^{-1} , η οποία αποτελεί την μέγιστη τιμή που δόθηκε κατά τον σχεδιασμό του πειράματος. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η χρονική διάρκεια της εκχύλισης και άρα της έκθεσης του δείγματος στους υπερήχους τόσο αυξάνεται και η απόδοση της UAE σε ολικά φαινολικά. Επίσης, πρέπει να δοθεί προσοχή στο γεγονός ότι όσο και να αλλάξει η

αναλογία μεθανόλης/ νερού, δεν είναι ικανή να επηρεάσει την απόδοση της UAE παρά μόνο σε χρόνους μεγαλύτερους από 18 min.

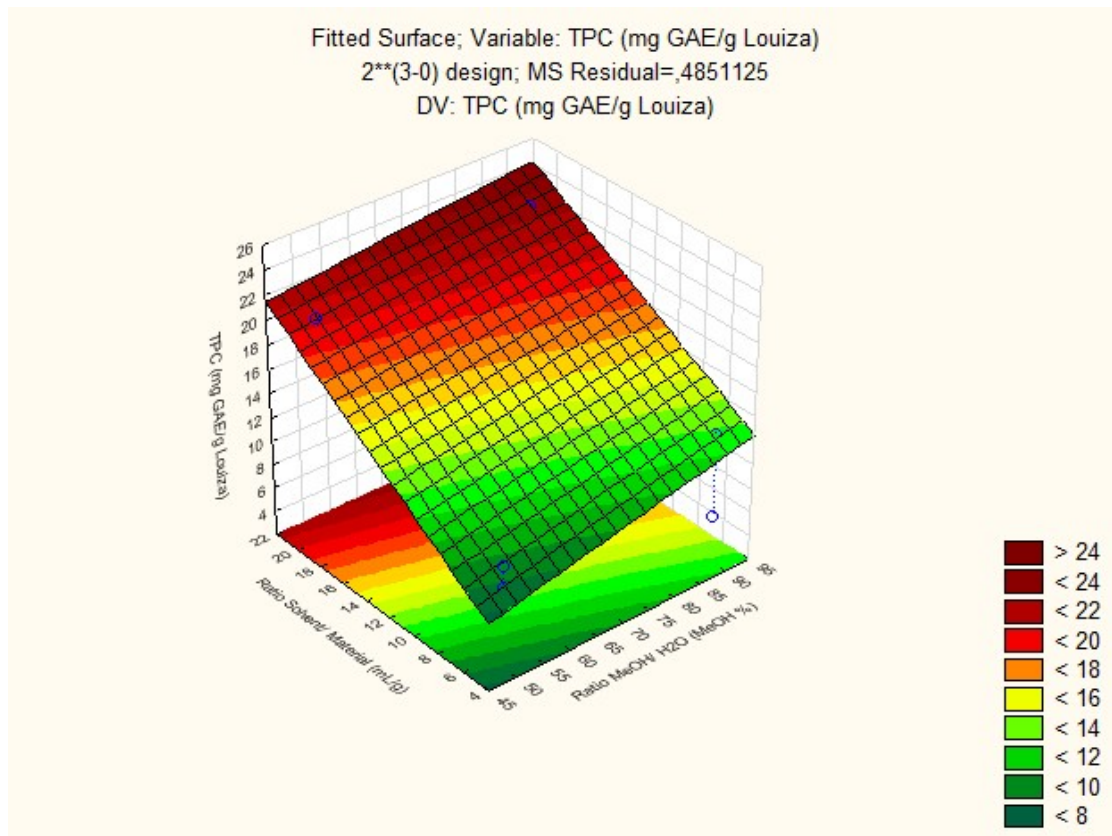


Σχήμα 3.3. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή την τιμή της Αναλογίας Διαλυτών/ Δείγματος, 20 mLg⁻¹

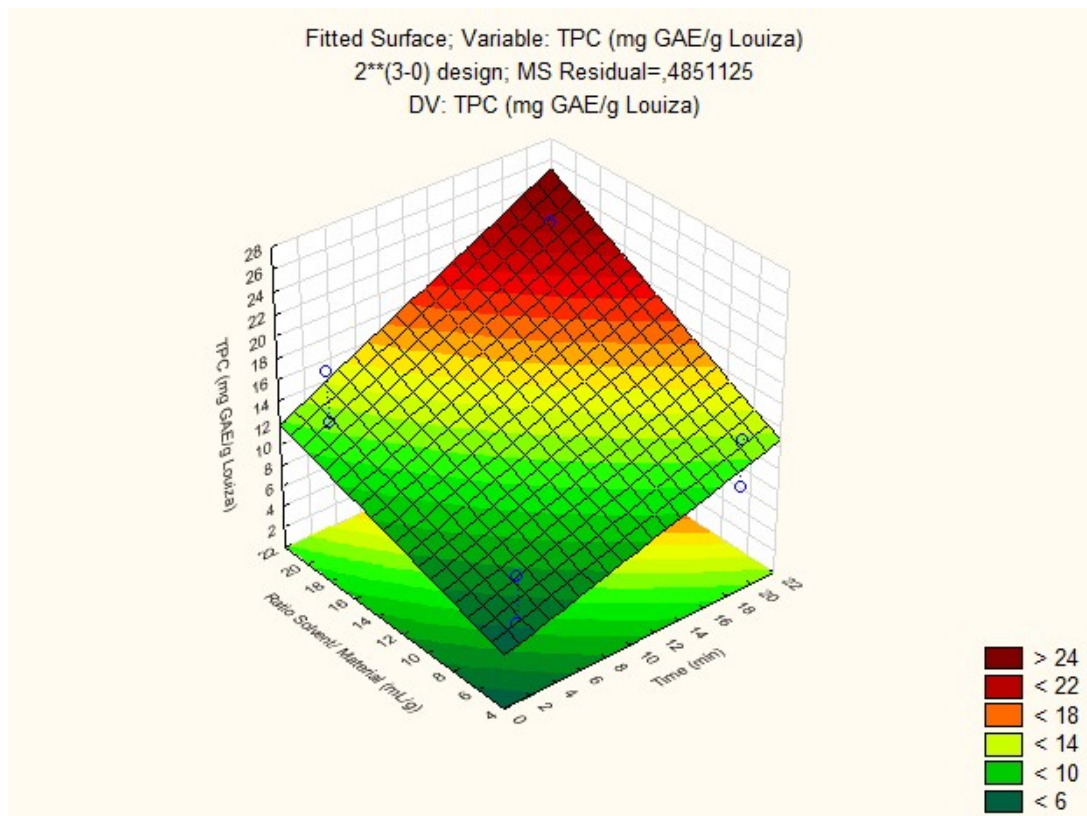
Στην επιφάνεια απόκρισης του Σχήματος 3.4. διακρίνεται η αλληλεπίδραση της αναλογίας μεθανόλης/ νερού και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος, με τον παράγοντα του χρόνου σταθερό και ορισμένο στη μέγιστη τιμή που δόθηκε κατά τον σχεδιασμό της Δοκιμής ελέγχου, των 20 min. Παρατηρείται και εδώ ότι η αναλογία μεθανόλης/ νερού δεν έχει σημαντικό ρόλο από μόνη της ως παράγοντας καθώς διακρίνεται αύξηση της απόδοσης μόνο σε υψηλές τιμές της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος (≥ 14 mLg⁻¹). Συνεπάγεται λοιπόν ότι η αξία του παράγοντα της αναλογίας μεθανόλης/ νερού εξαρτάται απόλυτα από τις τιμές του χρόνου και της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος, καθώς σε χαμηλές τιμές χρόνου (≤ 18 min) και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος (≤ 10 mLg⁻¹) η απόδοση της εκχύλισης είναι πολύ χαμηλή, δηλαδή, μικρότερη των 17 και 16 mg GAE ανά g λουίζας, αντίστοιχα.

Από την τελευταία επιφάνεια απόκρισης του Σχήματος 3.5. με την αλληλεπίδραση των παραγόντων χρόνου και αναλογία διαλυτών/ δείγματος, με σταθερή την αναλογία μεθανόλης/ νερού και ορισμένη στο 90% μεθανόλη, διακρίνεται ότι για να επιτευχθεί μεγαλύτερη απόδοση χρειάζεται να αυξηθούν από κοινού οι τιμές και των δύο παραγόντων

που αλληλεπιδρούν. Δηλαδή, χρειάζονται τιμές χρόνου πιθανόν μεγαλύτερες των 20 min και τιμές αναλογίας διαλυτών/ δείγματος μεγαλύτερες των 20 mLg⁻¹.



Σχήμα 3.4. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή την τιμή του Χρόνου, 20 min.



Σχήμα 3.5. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή την τιμή της Αναλογίας Μεθανόλης/ Νερού, 90%.

Καταλήγοντας, από την Δοκιμή ελέγχου των κρίσιμων παραγόντων για την Βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε Ολικά φαινολικά συμπεραίνουμε ότι τα όρια που τέθηκαν στους σημαντικούς παράγοντες χρειάζεται να ξεπεραστούν. Συγκεκριμένα, ο χρόνος της UAE θα πρέπει να ξεπεράσει το όριο των 20 min προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη μεταφορά των περιεχόμενων ενώσεων του υποστρώματος στους διαλύτες κατά την εφαρμογή των υπερήχων. Το εμπόδιο που τίθεται είναι φυσικό και αναφέρεται στην αντοχή της συσκευής παραγωγής των υπερήχων καθώς θερμαίνεται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας της πέραν του ορίου λειτουργίας της. Όσον αφορά την αναλογία διαλυτών μεθανόλης/νερού, είναι ξεκάθαρο ότι το φυσικό όριο του 100% MeOH δεν μπορεί να ξεπεραστεί. Επίσης, από τη βιβλιογραφία αναφέρεται η ανάγκη ύπαρξης του νερού ως καθαρά πολικός διαλύτης προκειμένου να εκχυλιστούν εκλεκτικά τα φαινολικά οξέα.[46] Επομένως, η αναλογία μεθανόλης/δείγματος θα πρέπει να κυμανθεί μεταξύ 80 και 95% MeOH προκειμένου να ικανοποιηθούν όλες οι απαραίτητες συνθήκες για την ανάκτηση των ολικών φαινολικών. Τέλος, η αναλογία διαλυτών/ δείγματος που είναι και στατιστικά σημαντική για το μοντέλο θα πρέπει να κυμανθεί σε τιμές μεγαλύτερες του 20 mLg⁻¹ προκειμένου να οδηγηθεί η UAE των ολικών φαινολικών σε μεγαλύτερες ανακτήσεις αν όχι στην βέλτιστη (Πίνακας 3.5.). Και εδώ τίθεται ο φυσικός περιορισμός του αμετάβλητου μεγέθους της ειδικής φιάλης της συσκευής των υπερήχων, η οποία μπορεί να δεχθεί έως και 100 mL όγκο διαλυτών.

Πίνακας 3.5. Προτεινόμενες τιμές παραγόντων με βάση τα αποτελέσματα της Δοκιμής Ελέγχου.

	Χρόνος εκχύλισης (min)	Αναλογία μεθανόλης/ νερού (% MeOH)	Αναλογία διαλυτών/ δείγμα (mLg⁻¹)
Προτεινόμενες τιμές παραγόντων βελτιστοποίησης	<20	80<x ₂ <95	<20

3.3. Βελτιστοποίηση των παραγόντων της UAE ολικών φαινολικών

3.3.1. Στατιστική ανάλυση και εφαρμογή του μοντέλου πειραματικού σχεδιασμού Box – Behnken (BBD)

Το ολοκληρωμένο πειραματικό σχέδιο, για τις παραμέτρους του BBD της UAE σε κωδικοποιημένη μορφή, αποτελείται από 16 πειραματικούς συνδυασμούς, σε τυχαία σειρά με τέσσερις επαναλήψεις του κεντρικού σημείου με σκοπό την αποφυγή τυχόν συστηματικών σφαλμάτων.[45] Οι επαναλήψεις του κεντρικού σημείου είναι απαραίτητες για τον υπολογισμό του καθαρού σφάλματος, το οποίο χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της διακύμανσης που παρουσιάζεται μεταξύ των επαναλήψεων. Τα πειράματα και τα αποτελέσματά τους για κάθε συνδυασμό παραγόντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6..

Πίνακας 3.6. Πειράματα του BDD και αποτελέσματα ολικών φαινολικών για τις UAE.

Αριθμός πειράματος	x_1 (χρόνος εκχύλισης, min)	x_2 (αναλογία μεθανόλης/ νερού, % MeOH)	x_3 (αναλογία διαλυτών/ δείγμα, mLg ⁻¹)	Απόδοση εκχύλισης (mg GAE ανά g δείγματος)
7	-1	0	1	47,02
2	1	-1	0	56,43
4	1	1	0	46,14
5	-1	0	-1	47,69
3	-1	1	0	38,96
1	-1	-1	0	34,53
11	0	-1	1	21,09
9	0	-1	-1	45,20
8	1	0	1	40,11
16	0	0	0	40,66
10	0	1	-1	42,64
13	0	0	0	41,59
15	0	0	0	34,16
6	1	0	-1	35,14
14	0	0	0	35,52
12	0	1	1	28,81

Οι ακριβείς τιμές για το BDD που αντιστοιχούν στις κωδικοποιημένες τιμές -1, 0 και 1 είναι 20, 30 και 40 min για τον χρόνο εκχύλισης, 75, 85 και 95% MeOH για την αναλογία μεθανόλης/ νερού και 30, 40 και 50mLg⁻¹ για την αναλογία διαλυτών/ δείγματος, αντίστοιχα.

Η ανάκτηση των περιεχόμενων ολικών φαινολικών κυμάνθηκε από 21,09 έως και 56,43 mg GAE ανά g δείγματος λουίζας. Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να υπολογιστεί η σημαντικότητα και καταλληλότητα του προτεινόμενου μοντέλου. Τα αποτελέσματα ANOVA παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Η δοκιμή F και οι τιμές p χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί η σημαντικότητα της κάθε παράγοντα. Ένας παράγοντας θεωρείται σημαντικός όταν η τιμή p είναι μικρότερη από 0,05. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της ANOVA για το BDD της UAE, φαίνεται ότι σημαντική επίδραση έχει ο τετραγωνικός όρος του χρόνου, ο γραμμικός όρος του χρόνου σε αλληλεπίδραση με τον τετραγωνικό της αναλογίας μεθανόλης/ νερού και ο τετραγωνικός του χρόνου σε αλληλεπίδραση με τον γραμμικό της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος.

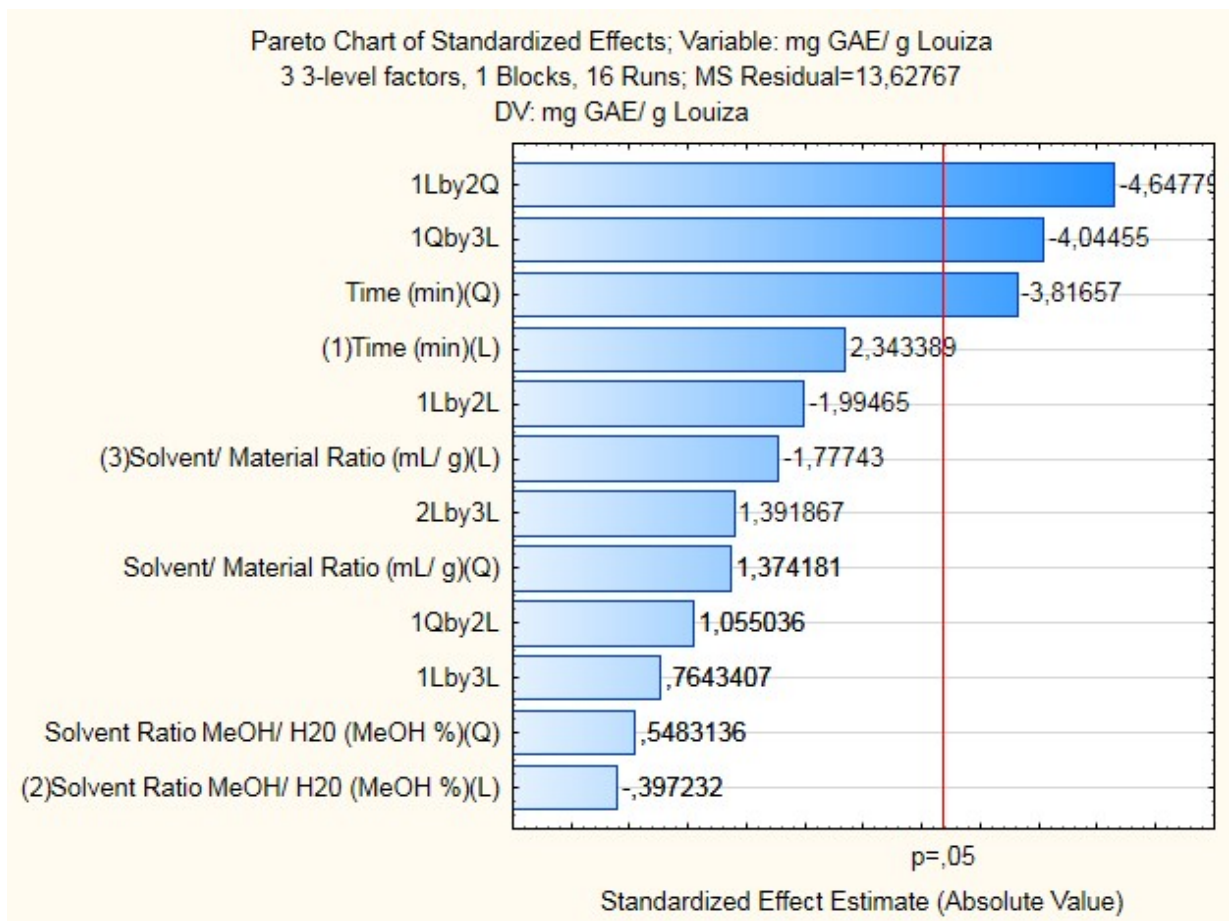
Πίνακας 3.7. ANOVA της ανάκτησης ολικών φαινολικών μέσω της UAE

Παράγοντες	Άθροισμα των τετραγώνων (SS)	Τιμή - F	Τιμή - p
x ₁ (L)	74,836	5,49147	0,100910
x ₁ (Q)	198,504	14,56624	0,031647^a
x ₂ (L)	2,150	0,15779	0,717770
x ₂ (Q)	4,097	0,30065	0,621643
x ₃ (L)	43,053	3,15924	0,173566
x ₃ (Q)	25,734	1,88837	0,263053
x ₁ (L)*x ₂ (L)	54,219	3,97862	0,140051
x ₁ (L)*x ₂ (Q)	294,384	21,60194	0,018781^a
x ₁ (Q)*x ₂ (L)	15,169	1,11310	0,368865
x ₁ (L)*x ₃ (L)	7,962	0,58422	0,500284
x ₁ (Q)*x ₃ (L)	222,926	16,35836	0,027207^a
x ₂ (L)*x ₃ (L)	26,401	1,93729	0,258205
Καθαρό σφάλμα (βαθμοί ελευθερίας)			40,883 (3)
Συνολικό SS (βαθμοί ελευθερίας)			1043,348 (15)
R ²			0,96082
R ² _{adj}			0,80408

(L): γραμμικός όρος, (Q): τετραγωνικός όρος

^a Παράγοντες με τιμή p ≤ 0,05

Η σημαντικότητα της κάθε παράγοντα αναπαρίσταται γραφικά από το διάγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων για την UAE στο Σχήμα 3.6. Στο σχήμα αυτό, οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων παρουσιάζονται σε φθίνουσα σειρά σημαντικότητας επίδρασης στην UAE, ανάλογα με την τιμή p που έχει λάβει η κάθε μία από τα αποτελέσματα της ANOVA. Οι παράγοντες που βρίσκονται πέρα από το όριο του 95% του επιπέδου εμπιστοσύνης θεωρούνται ως σημαντικοί, δηλαδή, στην προκειμένη περίπτωση ο τετραγωνικός όρος του χρόνου, ο γραμμικός όρος του χρόνου σε αλληλεπίδραση με τον τετραγωνικό όρο της αναλογίας μεθανόλης/ νερού και ο τετραγωνικός όρος του χρόνου σε αλληλεπίδραση με τον γραμμικό όρο της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος.

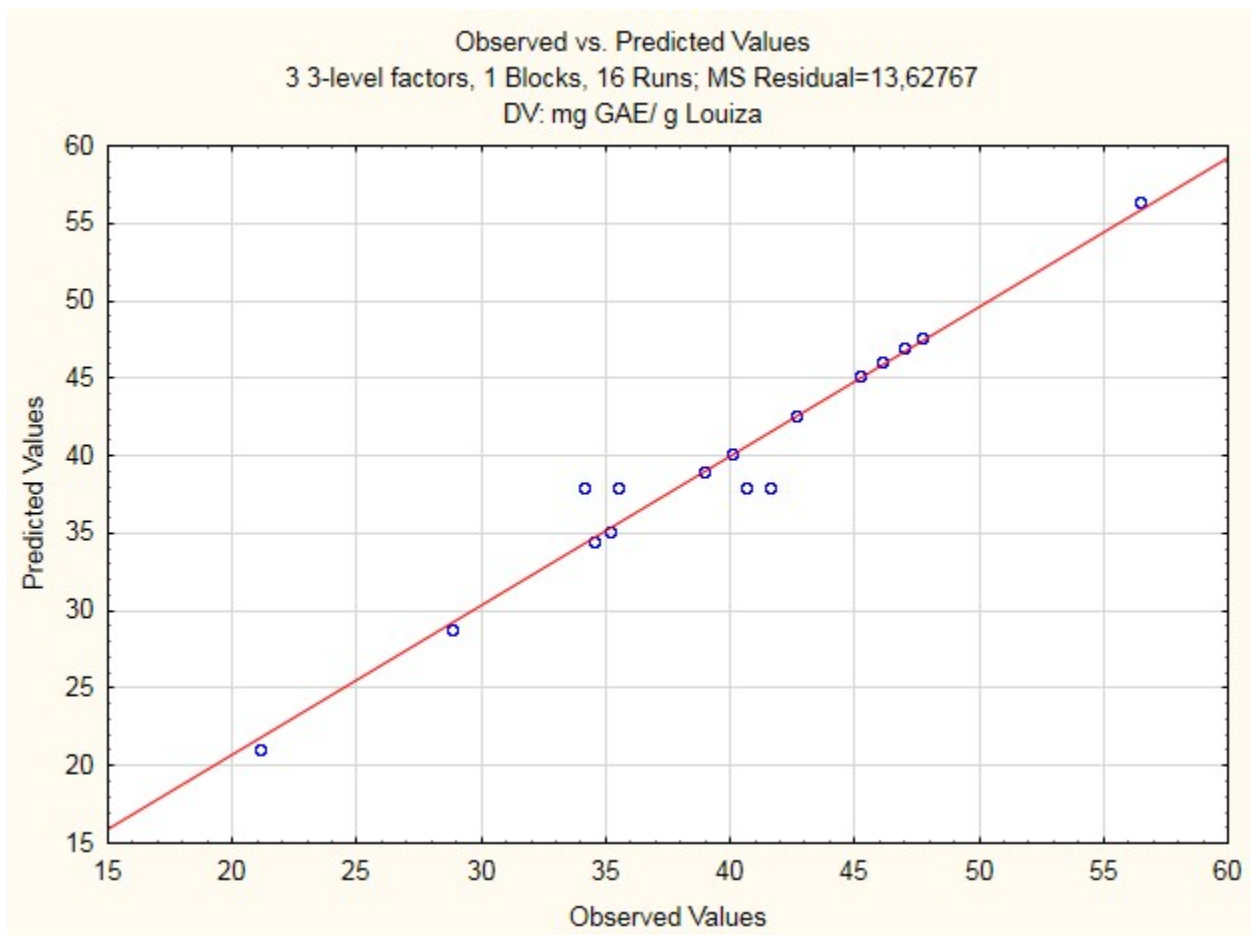


Σχήμα 3.6. Διάγραμμα Pareto των κανονικοποιημένων επιδράσεων της UAE.

Τα πειραματικά δεδομένα εφραμόστηκαν στην πολυωνυμική καμπύλη παλινδρόμησης και τα προτεινόμενα μοντέλα με βάση τα δεδομένα, θα μπορούσαν να εκφραστούν με βάση τις κωδικοποιημένες τιμές από την παρακάτω εξίσωση (1):

$$Y = -2759,42 - 0,12x_1^2 - 0,37x_2^2 - 0,03x_3^2 + 96,80x_1 + 61,32x_2 + 7,98x_3 - 1,93x_1*x_2 + 0,01x_1*x_2^2 + 0x_1^2*x_2 - 0,62x_1*x_3 + 0,01x_1^2*x_3 + 0,03x_2*x_3 \quad (1)$$

Από τον Πίνακα 3.7., συμπεραίνεται ότι σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% το προτεινόμενο μοντέλο επέδειξε ακρίβεια και καλή εφαρμογή, καθώς οι τιμές συντελεστή προσδιορισμού R^2 ($>0,95$) έδειξαν σημαντική συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και των προβλεπόμενων. Η ικανότητα αυτή πρόβλεψης του μοντέλου παρουσιάζεται από το διάγραμμα προβλεπόμενων έναντι παρατηρούμενων τιμών στο Σχήμα 3.7..



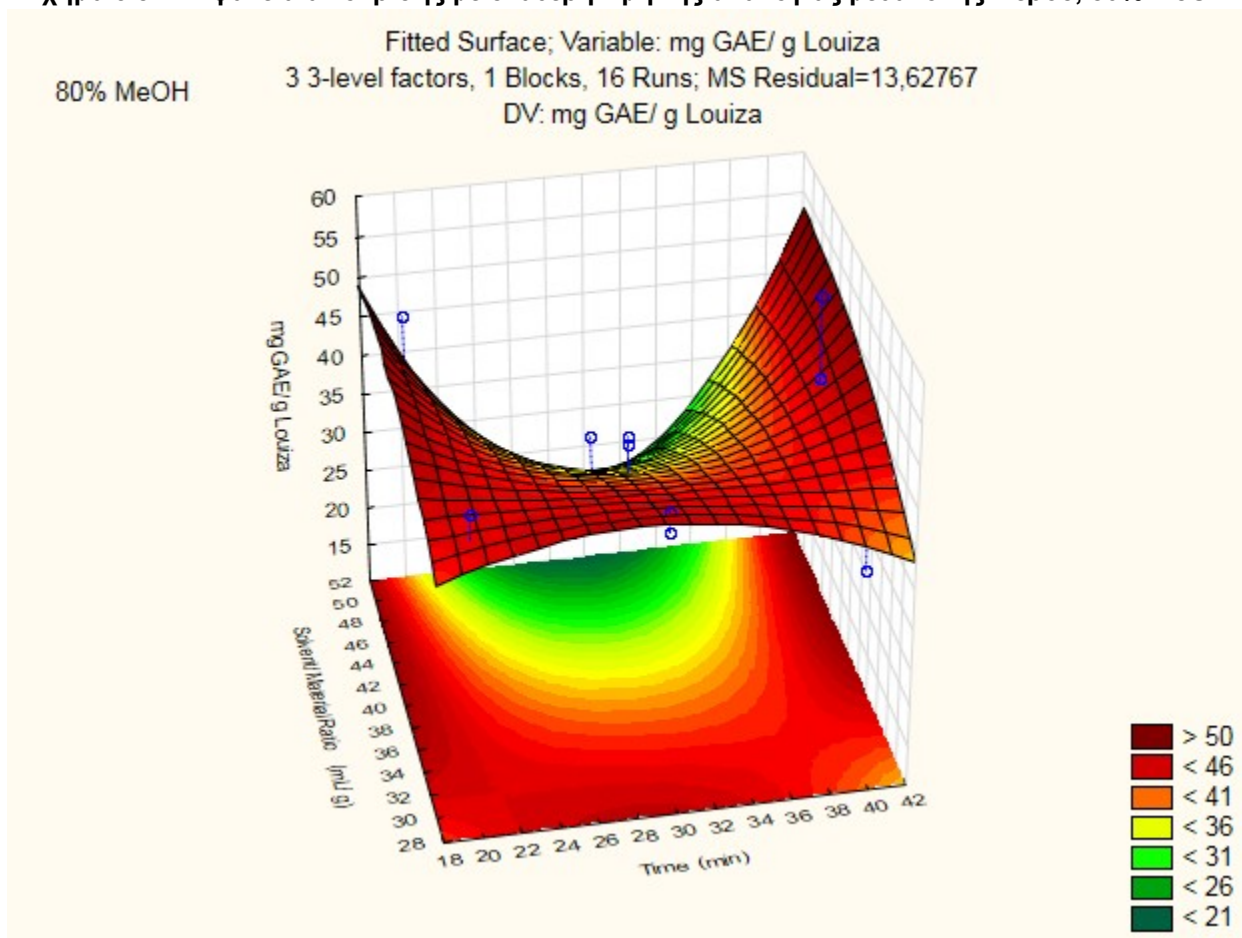
Σχήμα 3.7. Διάγραμμα παρατηρούμενων έναντι προβλεπόμενων τιμών της Δοκιμής ελέγχου της UAE.

Τέλος, ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού R^2_{adj} , ο οποίος δείχνει το ποσοστό των μεταβλητών απόκρισης από τις ανεξάρτητες μεταβλητές που πραγματικά επηρεάζουν την εξαρτημένη μεταβλητή, αποδεικνύει την επάρκεια του μοντέλου καθώς η τιμή του είναι στα όρια του 0,80. Συγκεκριμένα, το ποσοστό 80,4% της μεταβλητής απόκρισης εξηγείται και υποδεικνύει την ακρίβεια του BDD για την UAE.

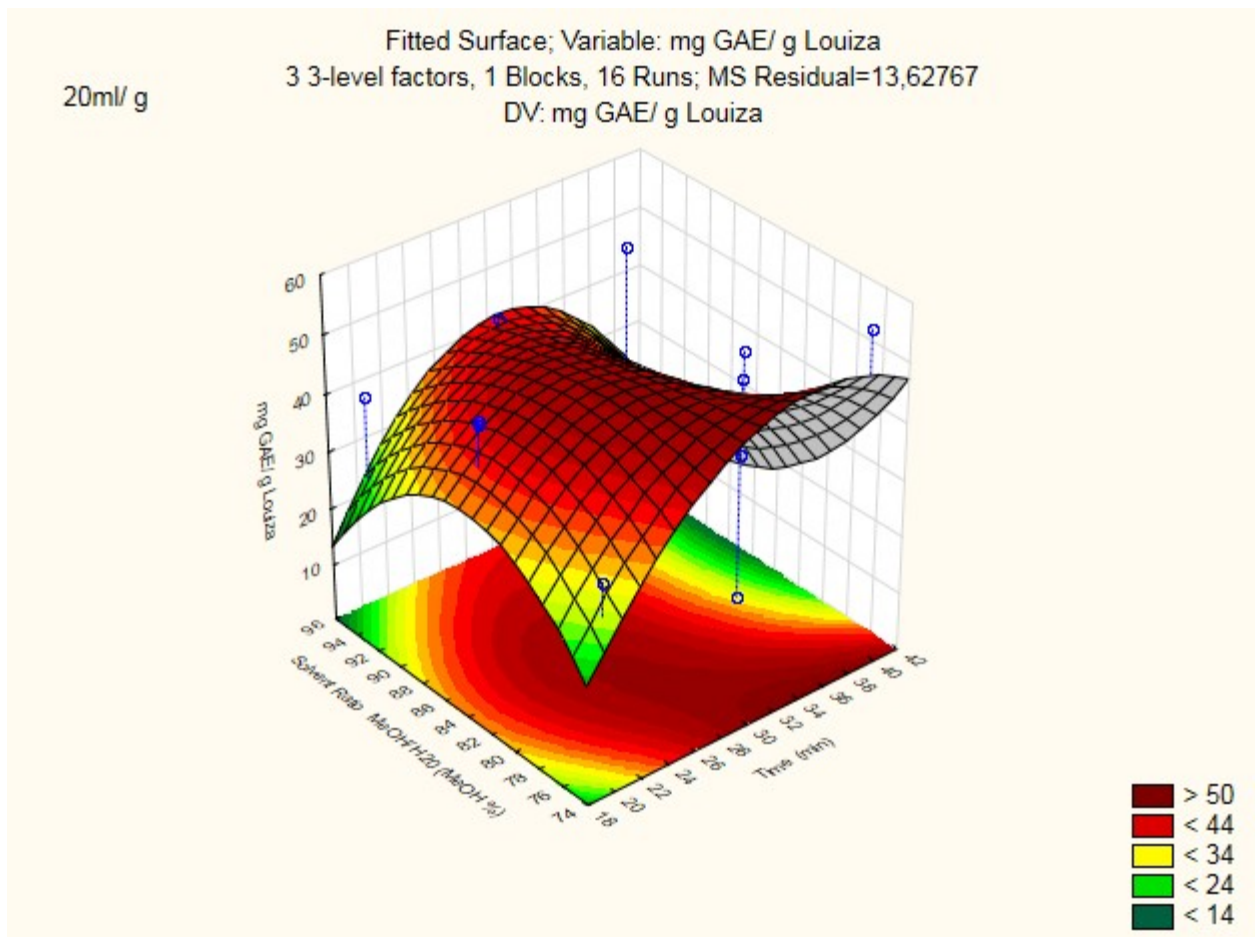
3.3.2. Επιφάνειες απόκρισης για το BDD της UAE των ολικών περιεχομένων φαινολικών

Στα Σχήματα 3.8. – 10. παρουσιάζονται οι επιφάνειες απόκρισης του πειραματικού μοντέλου BDD για την βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε ολικά φαινολικά.

Σχήμα 3.8. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή τιμή της αναλογίας μεθανόλης/ νερού, 80% MeOH.

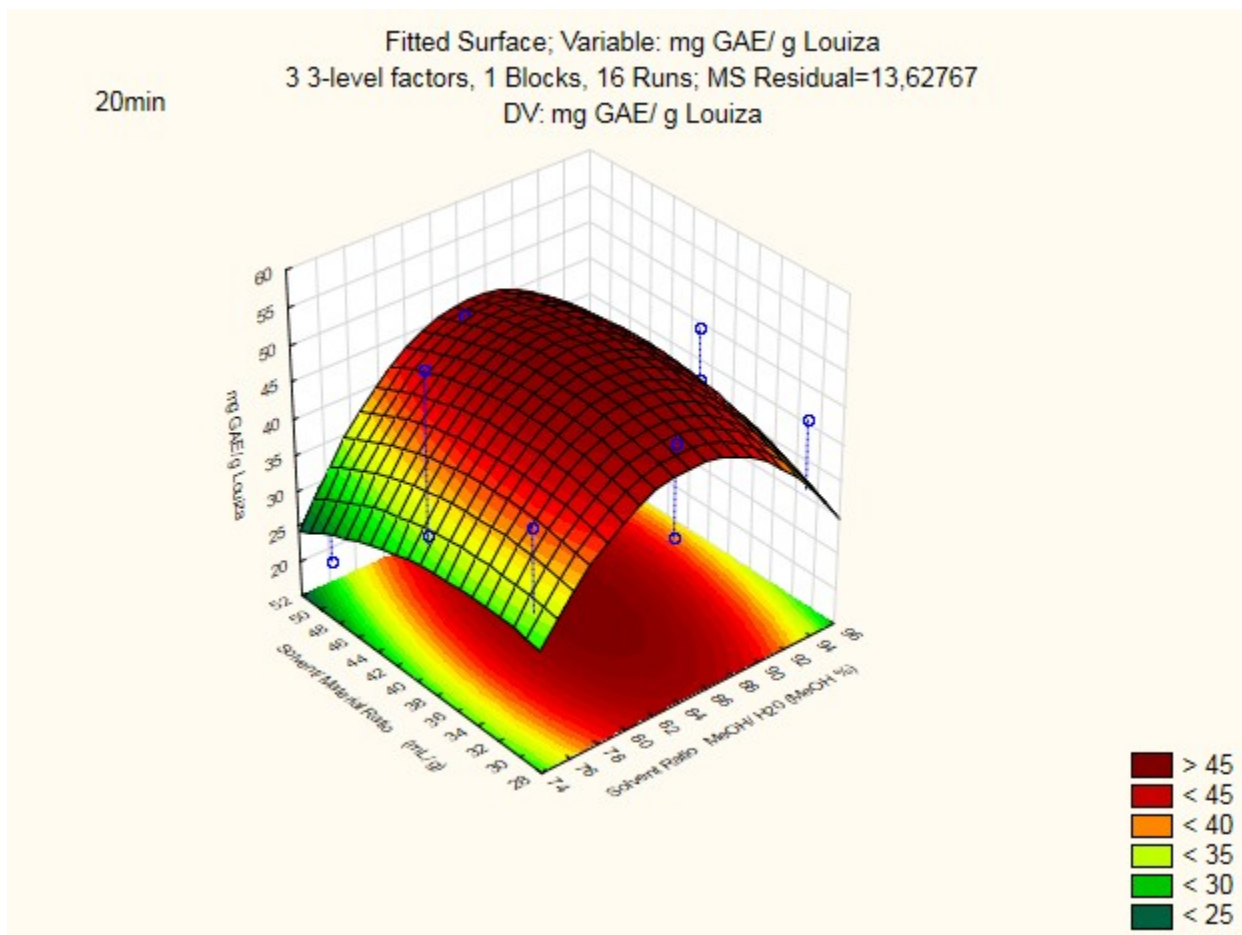


Στην επιφάνεια απόκρισης του Σχήματος 3.8. φαίνεται η αλληλεπίδραση του χρόνου (min) ως προς την αναλογία διαλυτών/ δείγμα (mLg^{-1}) και την αναλογία μεθανόλης/ νερό ορισμένη στο 80% MeOH. Η αναλογία μεθανόλης/ νερού τέθηκε σε τιμή εκτός των τιμών που έλαβε κατά τον σχεδιασμό του πειράματος καθώς προέκυψε ότι σε αυτή την τιμή και όχι στην τιμή 85% MeOH (κωδικοποιημένη 0) που ορίζει η μέθοδος ως σταθερή και ενδιάμεση, έδωσε καλύτερη προσαρμογή και πρόβλεψη της βελτιστοποίησης των υπολοίπων παραγόντων μέσω της βελτιστοποίησης της απόδοσης σε ολικά φαινολικά (mg GAE/ g λουίζας). Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η αναλογία διαλυτών/ δείγματος αυξάνεται και η απόδοση σε ολικά φαινολικά που παριστάνονται με τις έντονα κόκκινες περιοχές. Αυτή η ταση περιορίζεται στο χρονικό διάστημα από 22 min έως 38 min όπου παρουσιάζεται αύξηση της απόδοσης αλλά μικρότερη από ότι στις ακρέες τιμές χρόνου, μικρότερου των 22 min και μεγαλύτερου των 38 min.



Σχήμα 3.9. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή την τιμή της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος, 20 mLg⁻¹.

Στην επιφάνεια απόκρισης του Σχήματος 3.9. παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση του χρόνου (min) με την αναλογία μεθανόλης/ νερό (%MeOH) και την αναλογία διαλυτών/ δείγματος ορισμένη στο 20 mLg⁻¹. Η αναλογία διαλυτών/ δείγματος ορίσθηκε σε τιμή αυτή τη φορά εκτός του ορίου των τιμών των παραγόντων που τέθηκαν για την δημιουργία του πειράματος. Αυτό συνέβη, καθώς σε αυτή την τιμή παρουσιάστηκε καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου με αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση της απόδοσης της UAE σε ολικά φαινολικά. Παρατηρείται ότι σε χρόνους μεταξύ 20 και 36 min και αναλογία μεθανόλης/νερού μεταξύ 92 και 76 % MeOH παρουσιάζεται η κορύφη της καμπυλής της επιφάνειας απόκρισης.



Σχήμα 3.10. Επιφάνεια απόκρισης με σταθερή την τιμή του χρόνου, 20 min.

Τέλος, στο Σχήμα 3.10. παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση της αναλογία μεθανόλης/ νερό (%MeOH) και αναλογία διαλυτών/ δείγμα (mLg^{-1}), με τον χρόνο ορισμένο σταθερό στα 20 min. Σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος είναι εντός των ορισμένων τιμών που τέθηκαν για τον σχεδιασμό του μοντέλου πειράματος και έχει λάβει την χαμηλότερη τιμή (κωδικοποιημένη -1). Από την επιφάνεια απόκρισης φαίνεται ότι έχει επιτευχθεί η εύρεση της κορυφής της επιφάνειας και άρα το βέλτιστο σημείο απόδοσης της UAE με βάση τους παράγοντες που τέθηκαν ως σημαντικοί. Παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση σε ολικά φαινολικά μπορεί να επιτευχθεί σε τιμές αναλογίας μεθανόλης/ νερού ίση με 85%, αναλογίας διαλυτών/ δείγματος ίση με 40 mLg^{-1} και χρόνου ίσο με 20 min.

Θέτοντας τους παράγοντες στις προτεινόμενες θεωρητικές τιμές θα ανακτηθεί το μέγιστο των ολικών περιεχομένων φαινολικών ενώσεων με την αποδοτικότερη χρήση των διαλυτών, του δείγματος και του χρόνου δράσης των υπερήχων της UAE. Οι τιμές αυτές των παραγόντων είναι θεωρητικές και βασίζονται στην εξίσωση (1) του σχεδίου BBD.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της BBD βελτιστοποίησης, οι επιλεγμένες τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8. Σύμφωνα πάντα και με το διάγραμμα Pareto του

Σχήματος 3.6. ο σημαντικότερος παράγοντας της UAE είναι ο γραμμικός όρος του χρόνου σε αλληλεπίδραση με τον τετραγωνικό όρο της αναλογίας μεθανόλης/ νερού. Επίσης, ο χρόνος είναι σημαντικός ως τετραγωνικός όρος αλλά και ως τετραγωνικός σε αλληλεπίδραση με τον γραμμικό όρο της αναλογίας διαλυτών/ δείγματος.

Πίνακας 3.8. Προβλεπόμενες και παρατηρούμενες αποκρίσεις των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων.

Μεταβλητές (Ανεξαρτητες και Εξαρτημένες)	Τιμές
Αναλογία διαλυτών (v/v)	Μεθανόλη/ νερό - 85:15
Θερμοκρασία (°C)	>10 °C
Χρόνος (min)	20 min
US Ισχύς (W)	600 W
Αναλογία διαλυτών/ δείγματος (mLg ⁻¹)	1:40 (w/v) (1 g σε 40 mL)
Παλμική συχνότητα (s)	30 s On – 5 s Off
Προβλεπόμενη τιμή (mg GAE ανά g λουίζας)	49,89 mg GAE/ g λουίζας
Πειραματική τιμή (mg GAE ανά g λουίζας) ^α (n=3) ^β	42,08 (±0,12) ^γ mg GAE/ g λουίζας

^α Περιεχόμενα ολικά φαινολικά υπολογισμένα στα 750 nm μέσο πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος, Σχήμα Π1.

^β αριθμός των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση κάτω από επαναλήψιμες συνθήκες.

^γ Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση

3.3.3. Απόδειξη της ικανότητας πρόβλεψης του BBD της UAE

Η ακρίβεια και η καταλληλότητα της εξίσωσης του μοντέλου για την UAE αξιολογείται με τη σύγκριση των πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών της ανάκτησης των ολικών φαινολικών με βάση τις τιμές των παραγόντων που προτάθηκαν από το μοντέλο ως βέλτιστες. Οι πειραματικές και οι προβλεπόμενες τιμές της ανάκτησης των ολικών φαινολικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8.. Οι πειραματικές τιμές ανάκτησης των ολικών φαινολικών υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, τις τιμές απορρόφησης φασματοφωτόμετρου στα 750 nm χρησιμοποιώντας την καμπύλη αναφοράς πρότυπης ένωσης (γαλλικό οξύ) (Παράρτημα, Σχήμα Π4). Προκειμένου να αποτιμηθεί η επιτυχής εφαρμογή του σχεδίου BBD υπολογίζεται το ποσοστό εφαρμογής της πειραματικής απόκρισης ως προς την προβλεπόμενη απόκριση, με το αποτέλεσμα να υπολογίστηκε στο 84,34% της προβλεπόμενης απόκρισης. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μέσω της

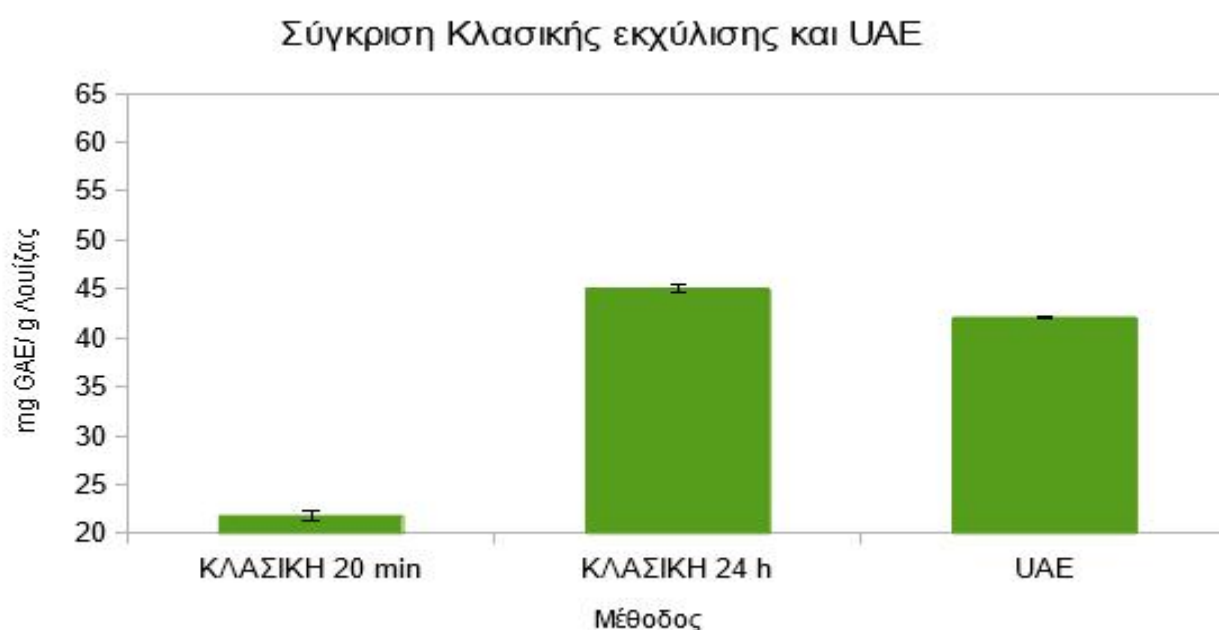
μεθόδου Επιφανειών απόκρισης επιβεβαίωσαν ότι το μοντέλο BBD της UAE είναι έγκυρο και ικανό για την ανάκτηση των ολικών περιεχομένων φαινολικών.

3.4. Σύγκριση τιμών ανάκτησης ολικών φαινολικών μεταξύ κλασικής μεθόδου εκχύλισης και UAE

Προκειμένου να αποτιμηθεί η αξία της χρήσης των υπερήχων στις εκχυλίσεις καθώς και η χρήση της στατιστικής μεθόδου του Πειραματικού σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις των ολικών περιεχομένων φαινολικών με την κλασική μέθοδο εκχύλισης σε δύο χρόνους 20 min και 24 h (Πίνακας 3.9.), ενώ χρησιμοποιήθηκαν και οι τιμές παραγόντων της βελτιστοποίησης για την αναλογία μεθανόλης/ νερού και αναλογίας διαλυτών/ δείγματος. Τα αποτελέσματα παρυσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα του Σχήματος 3.11..

Πίνακας 3.9. Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε mg GAE ανά g ξηρού δείγματος λουίζας. (Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, n=3)

Μέθοδοι	Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών (mg GAE/ g λουίζας)
Κλασική εκχύλιση 20 min	21,78 \pm 0,48
Κλασική εκχύλιση 24 h	44,99 \pm 0,40
UAE	42,08 \pm 0,12



Σχήμα 3.11. Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο προσδιορισμού συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών, Folin - Ciocalteu.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι τα 20 min με συνεχή ανάδευση δεν είναι ικανά να φτάσουν τις τιμές απόδοσης της UAE, με την Κλασική εκχύλιση των 20 min να δίνει $21,78 \pm 0,48$ mg GAE/ g λουίζας έναντι της UAE, η οποία έδωσε $42,08 \pm 0,12$ mg GAE/ g λουίζας. Η κλασική εκχύλιση σε χρόνο 24 h έφτασε τα $44,99 \pm 0,40$ mg GAE/ g λουίζας, με τα οποία ελάχιστα ξεπέρασε την UAE κατά $2,91$ mg GAE/ g λουίζας δηλαδή 6,5% της απόδοσης της κλασικής εκχύλισης 24 h. Αποδεικνύεται ότι με τη χρήση των υπερήχων υπάρχει η δυνατότητα να επιτύχουμε παρόμοιες αποδόσεις με την κλασική μέθοδο εκχύλισης 24 h σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα. Επίσης, η επιτυχία της UAE οφείλεται και στην ταυτόχρονη χρήση της στατιστικής μεθόδου του Πειραματικού σχεδιασμού, μέσω της οποίας προβλέφθηκε η σημαντικότητα της παραμέτρου του χρόνου, ενώ αν δεν υπήρχε ο περιορισμός της αντοχής της συσκευής παραγωγής των υπερήχων, θα μπορούσε να διαμορφωθεί διαφορετικά το πείραμα προκειμένου να επιτευχθεί ακόμα μεγαλύτερη ανάκτηση ολικών φαινολικών από το δείγμα λουίζας.

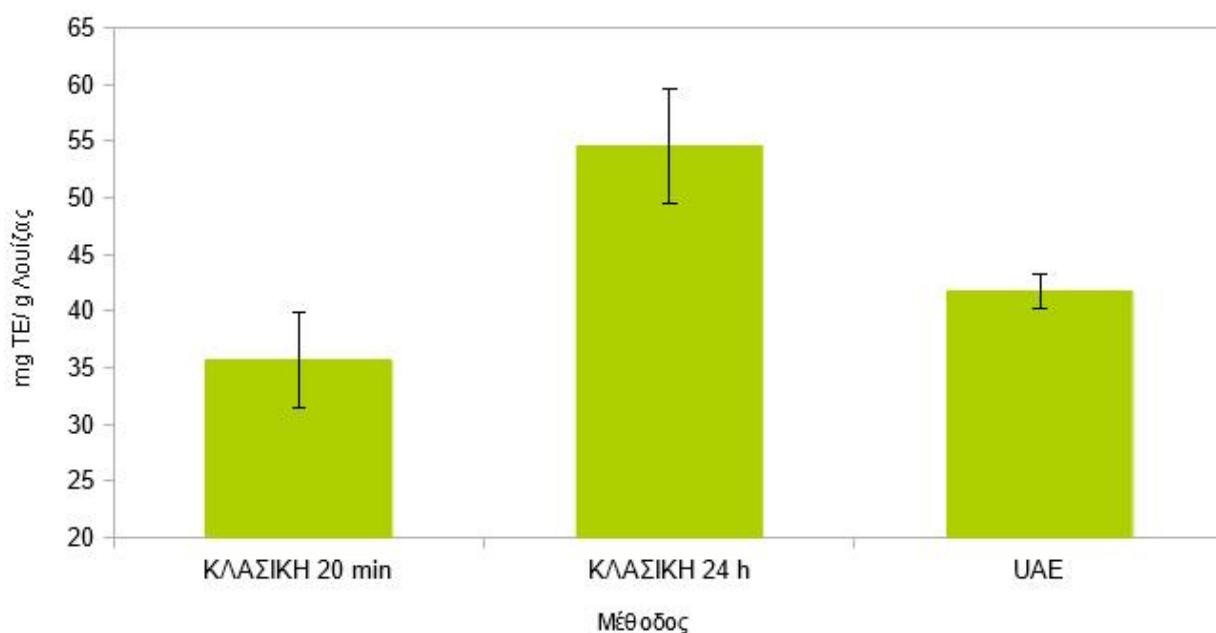
3.5. Αποτίμηση του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των φύλλων της *Lippia citriodora*

Για την αποτίμηση του αντιοξειδωτικού χαρακτήρα των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της λουίζας χρησιμοποιήθηκαν και η μέθοδος ABTS^{•+}, αποτίμησης *in vitro* της αντιριζικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων και η μέθοδος FRAP, αποτίμησης *in vitro* της αναγωγικής-αντιοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων. Για όλες τις μεθόδους πραγματοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς της πρότυπης ένωσης που επιλέχθηκε για την κάθε μία μέθοδο και παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2 ως Σχήματα Π2 - Π4.

Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα των μεθόδων ABTS^{•+} και FRAP. (Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση, n=3)

	ABTS ^{•+} (mg TE/ g λουίζας)	FRAP (mg Fe (II)/ g λουίζας)
Κλασική εκχύλιση 20 min	$35,6 \pm 4,2$	$110,3 \pm 2,6$
Κλασική εκχύλιση	$54,5 \pm 5,1$	$216,1 \pm 3,1$
UAE	$41,7 \pm 1,5$	$291,7 \pm 1,2$

Σύγκριση Κλασικής Εκχύλισης και UAE

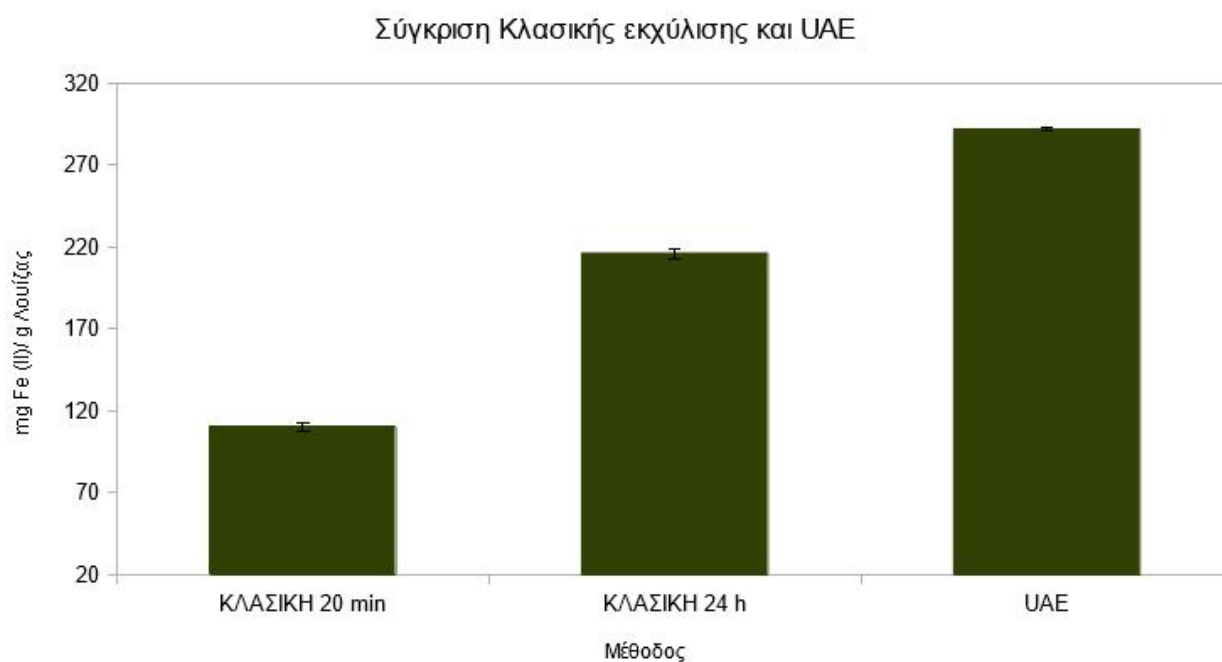


Σχήμα 3.12. Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο αποτίμησης *in vitro* της αντιριζικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της λουίζας.

Στο Σχήμα 3.12. αναπαρίσταται η *in vitro* αντιριζική δράση των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της λουίζας. Παρατηρείται ότι με την κλασική μέθοδο εκχύλισης 24 h παραλαμβάνεται το μεγαλύτερο μέρος αυτών των ενώσεων $54,5 \pm 5,1$ mg TE/ g λουίζας, με την βελτιστοποιημένη μέθοδο των υπερήχων να ακολουθεί με $41,7 \pm 1,5$ mg TE/ g λουίζας. Παρατηρείται επίσης ότι τα 20 min φάνηκαν ικανός χρόνος για την εκχύλιση των ενώσεων με αντιριζική δράση καθώς η διαφορά με τους υπερήχους είναι $6,03$ mg TE/ g λουίζας δηλαδή 14,5% της απόδοσης της UAE και με την κλασική μέθοδο εκχύλισης 24 h $18,89$ mg TE/ g λουίζας δηλαδή 34,7% της απόδοσης της κλασικής μεθόδου εκχύλισης 24 h. Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι πιθανώς οι ενώσεις αυτές δεν βρίσκονται δεσμευμένες ισχυρά στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την εύκολη και άμεση εκχύλιση τους, με την επιδράση του παράγοντα του χρόνου να αποδεικνύεται και πάλι ως σημαντική καθώς παρατηρείται η μέγιστη απόδοση στις 24 h.

Στο Σχήμα 3.13. αναπαρίσταται η αναγωγική – αντιοξειδωτική *in vitro* δράση των περιεχόμενων στα φύλλα της λουίζας ενώσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι την μεγαλύτερη απόδοση είχε η βελτιστοποιημένη μέθοδος UAE με $291,7 \pm 1,2$ mg Fe (II)/ g λουίζας. Αυτό οφείλεται 1) στην ικανότητα των υπερήχων να διαρρηγνύουν τα κύτταρα και να απελευθερώνουν το σύνολο των περιεχόμενων ενώσεων είτε έχουν αντιοξειδωτική, είτε αντιριζική, είτε οποιαδήποτε άλλη δράση που δεν εξετάζεται στην παρούσα εργασία. 2)

Παρατηρείται επίσης ότι η δράση των υπερήχων δεν υποβαθμίζει τις αντιοξειδωτικές – αναγωγικές ενώσεις αντίθετα ενισχύει την αποδέσμευση τους από άλλες ενώσεις που ίσως υποβίβαζαν την δράση τους παραδείγματος χάριν μέσω της διάσπασης γλυκοζιτικών δεσμών της λουτεολίνης με σάκχαρα.[47] Και 3) πιθανώς με την διάρρηξη των κυττάρων και την απελευθέρωση διάφορων ενώσεων κάποιες από αυτές να έχουν συνεργιστική αντιοξειδωτική ή αναγωγική δράση. Από το διάγραμμα είναι φανερό η πρόοδος της εκχύλισης αυτών των ενώσεων από τα 20 min έως τις 24 h της κλασικής και την άμεση επίδραση των υπερήχων.



Σχήμα 3.13. Διάγραμμα Σύγκρισης Κλασικής εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο αποτίμησης *in vitro* της αναγωγικής – αντιοξειδωτικής δράσης των περιεχόμενων ενώσεων των φύλλων της λουίζας.

3.6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της χρήσης των υπερήχων στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων από το φυτό *Lippia citriodora* και ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της εκχύλισης του συνόλου των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων με χρήση της συγχρονής τεχνικής υψηλής ενέργειας, των υπερήχων.

Αρχικά με βάση την βιβλιογραφία ορίστηκε ο παράγοντας της έντασης στα 600 W και ως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες το νερό και η μεθανόλη. Έπειτα, με βάση εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν και συγκρίνοντας τα αποτελέσματά τους, εκφρασμένα σε mg GAE ανά g λουίζας, ορίστηκε η παλμική συχνότητα των υπερήχων στα 30 s On και 5 s Off. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν ως σημαντικοί παράγοντες ο χρόνος (min), η αναλογία μεθανόλης/

νερού (MeOH%) και η αναλογία διαλυτών/ δείγματος (mLg^{-1}). Με τη χρήση της στατιστικής μεθόδου του Πειραματικού σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε Δοκιμή Ελέγχου των ορίων των τιμών των σημαντικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα της Δοκιμής Ελέγχου παρουσιάστηκαν με τη μορφή τριών Επιφανειών Απόκρισης: α) χρόνου προς αναλογία μεθανόλης/ νερού με σταθερό τον παράγοντα της αναλογίας διαλυτών/ δείγμα, β) αναλογίας μεθανόλης/ νερού προς αναλογία διαλυτών/ δείγματος με σταθερό τον παράγοντα του χρόνου και γ) χρόνου προς αναλογία διαλυτών/ δείγματος με σταθερό τον παράγοντα την αναλογίας μεθανόλης/ νερού. Μέσω της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων και των Επιφανειών Απόκρισης της Δοκιμής Ελέγχου καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι για να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση στην παραλαβή των ολικών φαινολικών θα πρέπει: 1) ο χρόνος να κυμανθεί σε τιμές μεγαλύτερες των 20 min, 2) η αναλογία μεθανόλης/ νερού να κυμανθεί μεταξύ 80 και 95% και 3) η αναλογία διαλυτών/ δείγματος σε τιμές μεγαλύτερες των 20 mLg^{-1} .

Με βάση τα συμπεράσματα της Δοκιμής Ελέγχου πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της εκχύλισης με χρήση υπερήχων για την παραλαβή των ολικών φαινολικών ενώσεων. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό - μαθηματικό σχέδιο Box – Behnken, στο οποίο τέθηκαν τρία επίπεδα για κάθε σημαντικό παράγοντα. Οι τιμές των παραγόντων ήταν: α) για τον χρόνο 20, 30 και 40 min, β) για την αναλογία μεθανόλης/ νερού 75, 85 και 95% MeOH και γ) για την αναλογία διαλυτών/ δείγματος 30, 40 και 50 mLg^{-1} . Από τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποκρίσεων φάνηκε ότι ο στατιστικά σημαντικότερος παράγοντας ήταν ο χρόνος (τετραγωνικός όρος) καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του με την αναλογία μεθανόλης/ νερού (γραμμικός όρος χρόνου επί τετραγωνικό όρο αναλογίας μεθανόλης/ νερού) και την αναλογία διαλυτών/ δείγματος (τετραγωνικός όρος χρόνου επί γραμμικό όρο αναλογίας διαλυτών/ δείγματος). Επίσης, από την μελέτη των Επιφανειών Απόκρισης συμπεραίνεται ότι οι βέλτιστες θεωρητικές τιμές των παραγόντων ήταν: 1) χρόνος 20 min, 2) αναλογία μεθανόλης/ νερού 85% και 3) αναλογία διαλυτών/ δείγματος 40 mLg^{-1} , ενώ η βέλτιστη προβλεπόμενη απόκριση υπολογίστηκε μέσω της πολυωνυμικής εξίσωσης του BBD και ήταν 49,89 mg GAE ανά g λουίζας. Κατά την εφαρμογή των βέλτιστων θεωρητικών τιμών των παραγόντων η απόκριση ήταν 42,08 ($\pm 0,12$) mg GAE ανά g λουίζας, το οποίο όταν τέθηκε ως προς την προβλεπόμενη απόκριση έδωσε ποσοστό εφαρμογής 84,34% επί της προβλεπόμενης απόκρισης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με τη κλασική μέθοδο, δηλαδή, παραμονή του δείγματος σε διαλύτη με συνεχή ανάδευση, με σκοπό τη σύγκριση απόδοσης με την UAE.

Για τις κλασικές εκχυλίσεις οι παράγοντες τέθηκαν στις τιμές που προβλεφθηκαν ως βέλτιστες από το BBD δηλαδή, αναλογία μεθανόλης/ νερού 85%, αναλογία διαλυτών/ δείγματος 40 mLg^{-1} ενώ ο χρόνος ορίστηκε στα 20 min και στις 24 h. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η UAE είχε μικρότερη απόδοση από την κλασική μέθοδο σε χρόνο 24 h κατά 2,91 mg GAE ανά g λουίζας ή 6,5%, ενώ είχε μεγαλύτερη απόδοση από την κλασική μέθοδο σε χρόνο 20 min κατά 20,30 mg GAE ανά g λουίζας ή 48,2%. Επίσης, εξετάστηκε η αντιριζική δράση και η αναγωγική – αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων των μεθόδων κλασικής εκχύλισης και UAE με τη μέθοδο προσδιορισμού αντιριζικής δράσης της ABTS** και με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής – αντιοξειδωτικής δράσης της FRAP αντίστοιχα. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της ABTS** προέκυψε ότι οι ενώσεις που παρουσιάζουν αντιριζική δράση εκχυλίστηκαν σε μεγάλο μέρος στα 20 min της κλασικής μεθόδου εκχύλισης καθώς η διαφορά με την UAE ήταν 6,03 mg TE/ g λουίζας δηλαδή 14,5% και με την κλασική εκχύλιση στις 24 h 18,89 mg TE/ g λουίζας δηλαδή 34,7%. Αντίθετα, η σύγκριση των αποτελεσμάτων της FRAP έδειξε ότι τα εκχυλίσματα της UAE είχαν την μεγαλύτερη αναγωγική – αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους εκχύλισης 20 min και 24 h. Αυτό οφείλεται πιθανώς στην αποδέσμευση των ενεργών ενώσεων με τη βοήθεια της ενέργειας των υπερήχων και την μεταφορά τους στο εκχύλισμα, την διάσπαση δεσμών που περιορίζαν τη δράση ενώσεων με αντιοξειδωτικό χαρακτήρα και τέλος την πιθανή συνεργιστική δράση ενώσεων που απελευθερώθηκαν μετά την διάρρηξη των κυττάρων. Τέλος, η διαφορά που παρουσιάζει η μέθοδος FRAP με τις Folin-Ciocalteu και ABTS** πιθανώς προκύπτει από την φύση των ενώσεων που εκχυλίζονται με την χρήση των υπερήχων, οι οποίες παρουσιάζουν δράση αντιοξειδωτική δράση αλλά δεν είναι φαινολικής φύσεως. Για τον λόγο αυτό θα προτεινόταν να πραγματοποιηθούν και άλλες εξετάσεις προσδιορισμού φαινολικού περιεχομένου και αντιριζικής δράσης όπως η μέθοδος ικανότητας δέσμευσης / ανάσχεσης της σταθερής ρίζας DPPH.

Συνοψίζοντας, από την εφαρμογή των υπερήχων κατά την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από τα φύλλα της *Lippia citriodora* και την ταυτόχρονη χρήση της στατιστικής μεθόδου του Πειραματικού Σχεδιασμού μπορεί να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της εκχύλισης σε επίπεδο εκλεκτικότητας ενώσεων όπως έγινε με τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες σύμφωνα και με την εισαγωγή έχει αποδειχθεί ότι έχουν αναλγητική, αντιπυρετική, αντιοξειδωτική, και αντιφλεγμονώδη δράση ενώ η χαρακτηριστική ένωση της οικογένειας Verbenaceae, *Verbascoside* παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, ανοσοκατασταλτική και αντικαρκινική δράση. Ακόμα, η UAE σε συνδυασμό με τη χρήση

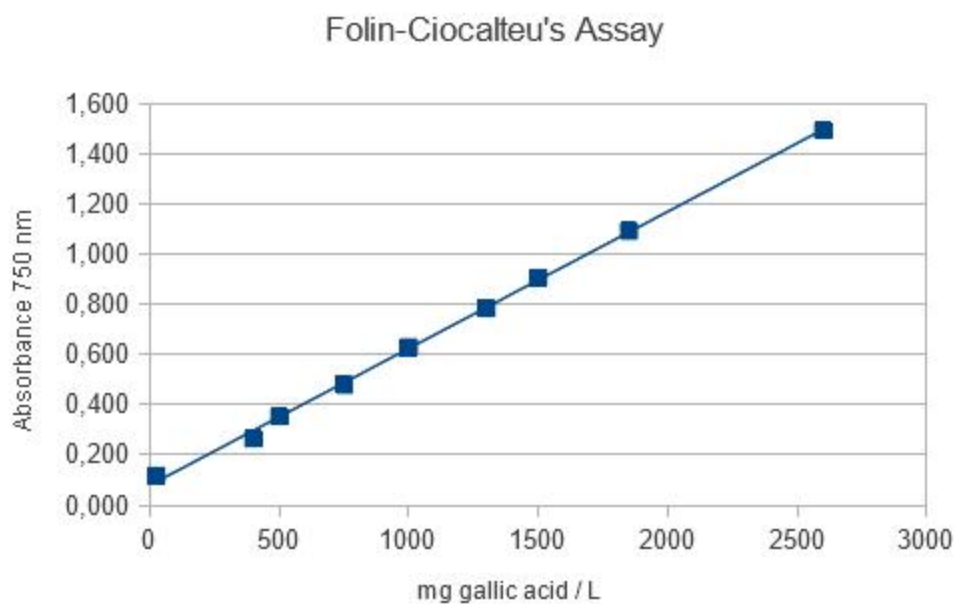
του Πειραματικού Σχεδιασμού μπορεί να αποτελέσει μέθοδο εκχύλισης και παραλαβής βιοδραστικών ενώσεων και σε βιομηχανικό επίπεδο καθώς μπορεί να εξασφαλίσει την αξιοποίηση των ελάχιστων αναγκαίων πόρων (ενέργειας, διαλυτών, υποστρώματος, χρόνου) με αποτέλεσμα οικονομικά οφέλη για την επιχείρηση αλλά και οφέλη για το περιβάλλον (λιγότεροι ρύποι, απόβλητα). Τέλος, θα μπορούσαν να σχεδιαστούν εκχυλίσεις με τη χρήση περισσότερων σύγχρονων μεθόδων σε συνδυασμό με τους υπερήχους όπως εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων, με τη χρήση ενζύμων, με τη χρήση υγρού υπό πίεσης ή και με τη χρήση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Επίσης, η βελτιστοποίηση της μεθόδου θα μπορούσε να εφαρμοστεί για συγκεκριμένη ένωση εφόσον η απόκριση των πειραμάτων βασιστεί σε αναλυτικές μεθόδους όπως η υγρή χρωματογραφία και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.

Παράρτημα 1 - Πίνακες

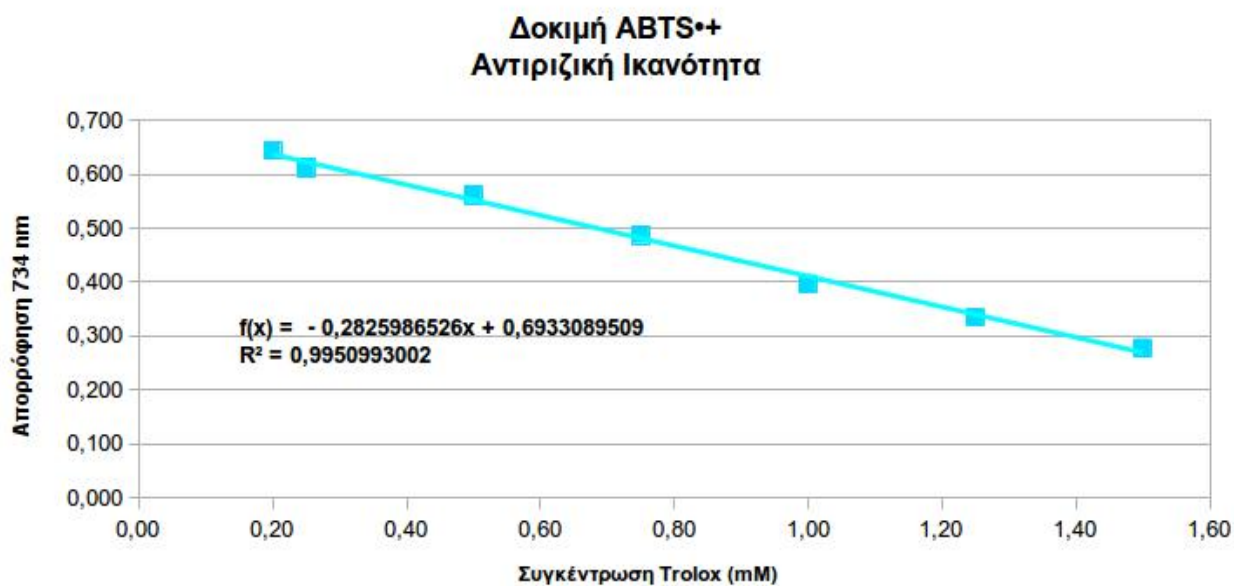
Πίνακας Π1. Καμπύλες αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin – Ciocalteu.

Δοκιμή	Συνάρτηση καμπύλης αναφοράς	R ²
Πειράματα Επιλογής Παλμικής Συχνότητας	$f(x) = 0,0005448336x + 0,0783362569$	0,9989
Δοκιμή ελέγχου παραμέτρων	$f(x) = 0,0012116111x + 0,0027112897$	0,9972
Κεντρικός πειραματικός σχεδιασμός	$f(x) = 0,0003860387x + 0,0138681623$	0,9993

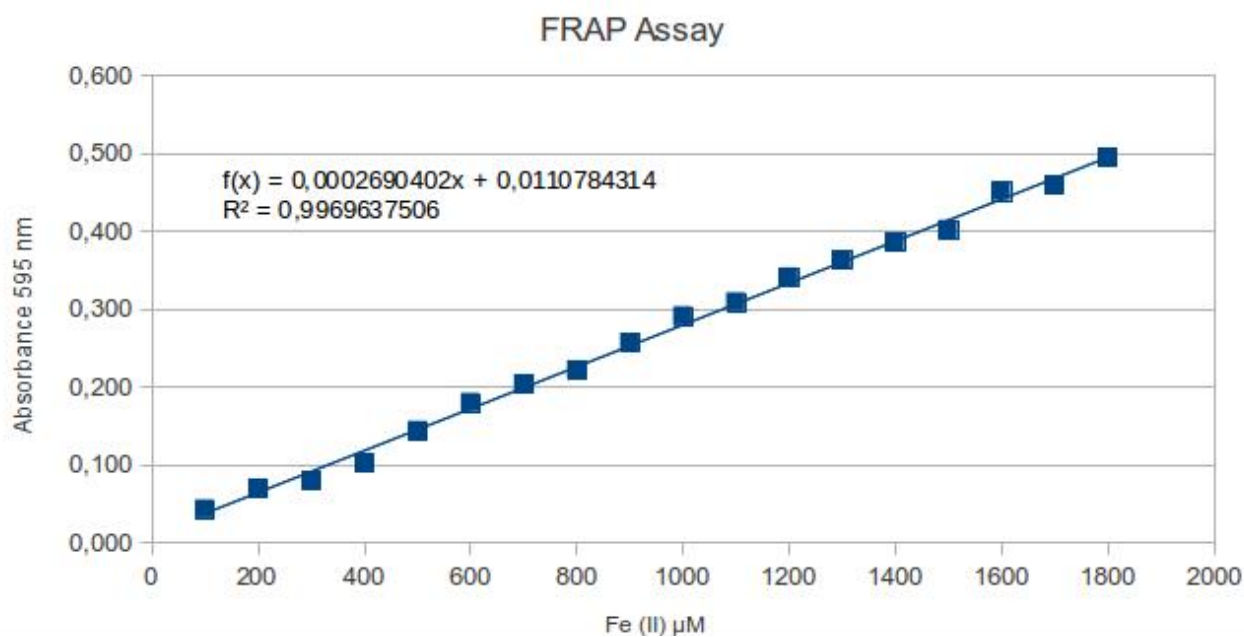
Παράρτημα 2 - Σχήματα



Σχήμα Π2. Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu, αξιολόγηση των προβλεπόμενων συνθηκών και της κλασικής εκχύλισης.



Σχήμα Π3. Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας Trolox για τη δοκιμή ABTS•+.



Σχήμα Π4. Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του δισθενούς σιδήρου Fe (II).

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια – Ξενόγλωσσοι Όροι

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

UAE	Ultrasound Assisted Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Υπερήχων
EAE	Enzyme Assisted Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Ενζύμων
EAAE	Enzyme Assisted Aqueous Extraction	Υδατική Εκχύλιση με τη χρήση Ενζύμων
EACP	Enzyme Assisted Cold Pressing	Ψυχρή Εκχύλιση υπό Πίεση με τη χρήση Ενζύμων
MAE	Microwave Assisted Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Μικροκυμάτων
PEF	Pulsing Electric Field assisted extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Παλλόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Υπερκρίσιμου Ρευστού
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Εκχύλιση με τη χρήση Υγρού υπό Πίεση
CC	Column Chromatography	Χρωματογραφία Στήλης
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδος
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
MS	Mass Spectrum	Φάσμα Μάζας
IR	Infrared Radiation	Υπέρυθρη Ακτιβολία
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
HAT	Hydrogen Atom Transfer	Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου
ET	Electron Transfer	Μεταφορά Ηλεκτρονίου
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
TPC	Total Phenolic Content	Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο
GAE	Gallic Acid Equivalents	Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος
SS	Sums of Squares	Άθροισμα των Τετραγώνων
BBD	Box – Behnken Design	Σχέδιο Box - Behnken
L, Q	Linear, Quadratic	Γραμμικός, Τετραγωνικός
OVAT	One Variable At a Time	Μονοπαραγοντική
RSM	Response Surface Methodology	Μέθοδος Επιφανειών Απόκρισης
ΕΚΠΑ	Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών	
ΤΕΙ	Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα	
ΕΙΕ	Εθνικό Ίδρυμα Αθηνών	
ΙΒΦΧΒ	Ινστιτούτο Βιολογίας Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας	

	Nutraceuticals	Φαρμακοτρόφιμα
	Reflux	Αναρροή
ANOVA	Analysis Of Variance	Ανάλυση της Διακύμανσης

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- [1] D. R. S. A. Krishnaiah Bono, “Phytochemical antioxidants for health and medicine - A move towards nature,” *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 1, no. INKO 4, 2007, pp. 97–104.
- [2] J. M. Bueno, F. Ramos-Escudero, P. Sáez-Plaza, A. M. Muñoz, M. José Navas, and A. G. Asuero, “Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 42, no. 2, 2012, pp. 102–125.
- [3] H. El Gharras, “Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 12, 2009, pp. 2512–2518.
- [4] I. Ioana, V. Irina, and P. Valentin I., “A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables,” *Food Chem.*, vol. 126, no. 126, 2011, pp. 1821–1835.
- [5] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier, “Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 14, 2013, pp. 1818–92.
- [6] A. Crozier, I. B. Jaganath, and M. N. Clifford, “Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 26, no. 8, 2009, pp. 1001–1043.
- [7] M. Naczki and F. Shahidi, “Extraction and analysis of phenolics in food,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1054, no. 1–2, 2004, pp. 95–111.
- [8] F. Shahidi, *Bailey ’S Industrial Oil and Fat*, vol. 1–6. 2005.
- [9] C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V Plata-Oviedo, and R. M. Peralta, “Phenolic compounds in fruits - an overview,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 10, 2012, pp. 2023–2044.
- [10] F. Charalambos *et al.*, “Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions,” *Food Chem.*, vol. 211, 2016, pp. 963–971.
- [11] E. S. Ong, “Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 812, no. 1–2 SPEC.

ISS., 2004, pp. 23–33.

- [12] M. G. Naser Aldeen, R. Mansoor, and M. AlJoubbeh, “Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (*Lippia citriodora*) dried leaves during growth stages,” *Nutr. Food Sci.*, vol. 45, no. 5, 2015, pp. 766–773.
- [13] J. O. Ombito, E. N. Salano, P. K. Yegon, K. Ngetich, and E. M. Mwangi, “A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (*Verbenaceae* family),” *J. Sci. Innov. Res.*, vol. 3, no. 4, 2014, pp. 460–466.
- [14] J. M. Prado, P. C. Veggi, and M. A. a. Meireles, “Supercritical Fluid Extraction Of Lemon Verbena (*Aloysia triphylla*): Process Kinetics and Scale-Up, Extract Chemical Composition and Antioxidant Activity, and Economic Evaluation,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 4, 2014, pp. 569–579.
- [15] C. C. Zeppenfeld *et al.*, “Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*),” *Aquac. Nutr.*, vol. 22, no. 4, 2016, pp. 933–940.
- [16] E. Portmann *et al.*, “Aqueous Extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (*Verbenaceae*): Assessment of Antioxidant Capacity and DNA damage,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 31, no. 1113, 2012, pp. 192–202.
- [17] M. E. Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata, and A. Villar, “*Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 76, no. 3, 2001, pp. 201–214.
- [18] R. Shahhoseini, N. Hosseini, and M. Ghorbanpour, “Study of Essential Oil Content and Composition of Different Parts of Lemon verbena (*Lippia citriodora*) Grown in Iran,” *J. Essent. Oil Bear. Plants*, vol. 17, no. 1, 2014, pp. 120–125.
- [19] L. Funes *et al.*, “Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils’ oxidative stress in chronic exercise,” *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 111, no. 4, 2011, pp. 695–705.
- [20] E. E. Stashenko, J. R. Martínez, M. P. Cala, D. C. Durán, and D. Caballero, “Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (*Verbenaceae*) aromatic plants,” *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 1, 2013, pp. 192–202.
- [21] A. Roidaki, Pg. Zoumpoulakis, and C. Proestos, “Comparison of Extraction Methods for the

Determination of Antioxidant Activity in Extracts of Hippophae Rhamnoides L . and Lippia Citriodora . The Effect of Seasonal Collection,” *Austin J. Nutr. Food Sci.*, vol. 3, no. 1, 2015, pp. 1–8.

- [22] C. G. Pereira and M. A. A. Meireles, “Evaluation of lobal yield , composition , antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from Lemon Verbena (*Aloysia triphyllia* [L’ Herit.] Britton) and mango (*mangifera indica* L.) leaves,” *J. Food Process Eng.*, vol. 30, no. 2007, 2007, pp. 150–173.
- [23] N. Crabas, B. Marongiu, A. Piras, T. Pivetta, and S. Porcedda, “Extraction , Separation and Isolation of Volatiles and Dyes from *Calendula officinalis* L . and *Aloysia triphylla* (L ’ Her .) Britton by Supercritical CO 2,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 15, no. October, 2003, pp. 350–355.
- [24] D. Huan, Prior, “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. APRIL, 2005, pp. 1841–1856.
- [25] A. Carnat, A. P. Carnat, D. Fraisse, and J. L. Lamaison, “The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea,” *Fitoterapia*, vol. 70, no. 1, 1999, pp. 44–49.
- [26] J. L. Singulani *et al.*, “Chemical composition and antioxidant activity of Lippia species,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 27, 2012, pp. 4416–4422.
- [27] C. Argyropoulou, D. Daferera, P. A. Tarantilis, C. Fasseas, and M. Polissiou, “Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 35, no. 12, 2007, pp. 831–837.
- [28] S. S. El-Hawary, M. F. Yousif, A. a. Abdel Motaal, and L. M. Abd-Hameed, “Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt,” *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.*, vol. 50, no. 1, 2012, pp. 1–6.
- [29] T. V. Parodi *et al.*, “Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*,” *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 40, no. 2, 2014, pp. 323–334.
- [30] J. Azmir *et al.*, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review,” *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, 2013, pp. 426–436.

- [31] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry," *Talanta*, vol. 76, no. 5, 2008, pp. 965–977.
- [32] B. K. Tiwari, "Ultrasound: A clean, green extraction technology," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 71, 2015, pp. 100–109.
- [33] D. Z. Lantzouraki, V. J. Sinanoglou, P. Zoumpoulakis, and C. Proestos, "Comparison of the Antioxidant and Antiradical Activity of Pomegranate (*Punica Granatum* L.) by Ultrasound-Assisted and Classical Extraction," *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 7, 2016, pp. 969–978.
- [34] F. Chemat, Zill-E-Huma, and M. K. Khan, "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, no. 4, 2011, pp. 813–835.
- [35] X. P. Nunes et al., "Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products." INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [36] B. D. Craft, A. L. Kerrihard, R. Amarowicz, and R. B. Pegg, "Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 11, no. 2, 2012, pp. 148–173.
- [37] J. Piljac, S. Martinez, L. Valek, T. Stipcevic, and K. Kovacevic Ganic, "A Comparison of Methods Used to Define the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Croatian Wines," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 3, 2005, pp. 271–276.
- [38] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9, 1999, pp. 1231–1237.
- [39] N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, and A. Milner, "A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates," *Clin. Sci.*, vol. 84, no. 4, 1993, pp. 407–412.
- [40] I. . Benzie and J. . Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay," *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 1, 1996, pp. 70–6.
- [41] O. Firuzi, J. Zhuo, C. M. Chinnici, T. Wisniewski, and D. Praticò, "{5-Lipoxygenase} gene disruption reduces amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.,"

{FASEB} *J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, no. 4, 2008, pp. 1169–1178.

- [42] K. I. Berker, K. Güçlü, I. Tor, and R. Apak, “Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents,” *Talanta*, vol. 72, no. 3, 2007, pp. 1157–1165.
- [43] R. Pulido, L. Bravo, and F. Saura-calixto, “Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. Journal of Agricultural and,” *Food Chem.*, vol. 48, 2000, pp. 3396–3402.
- [44] V. J. Sinanoglou *et al.*, “Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphurous*. Antifungal and antibacterial properties,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 6, 2015, pp. 3264–3272.
- [45] T. Tsiaka, P. Zoumpoulakis, V. J. Sinanoglou, C. Makris, G. A. Heropoulos, and A. C. Calokerinos, “Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 877, 2015, pp. 100–110.
- [46] M. Oroian and I. Escriche, “Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis,” *Food Res. Int.*, vol. 74, Apr. 2015, pp. 10–36.
- [47] P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M. Seabra, and M. de Lourdes Bastos, “Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 25, no. 10, 2002, pp. 1324–7.