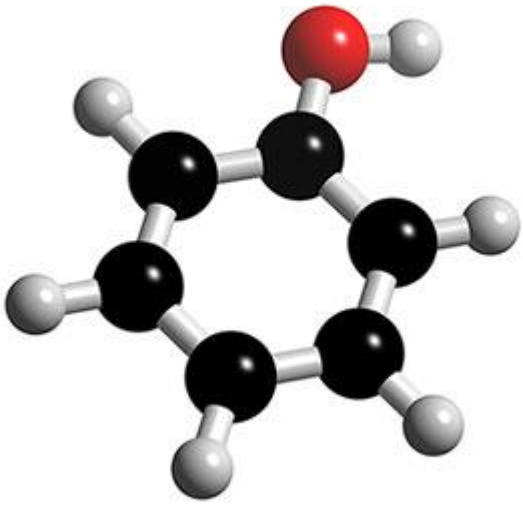
Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος Πολυτεχνείου Κρήτης

***ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ*:**

«Βελτιστοποίηση εκχύλισης φαινολών από τοπικά φυτά και δέντρα της Κρήτης»



Της Τσάκωνα Σοφίας

<u>Τριμελή επιτροπή</u>
Επιβλέπων καθηγητής: κ.Γκέκας Βασίλειος
Μέλη καθηγητές: κ. Παρανυχιανάκης Νικόλαος
κ. Ψυλλάκη Ελευθερία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κύριο Βασίλειο Γκέκα και το διδακτορικό φοιτητή Χάρη Γαλανάκη, για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής διπλωματικής μελέτης μου καθώς, και την καθοδήγηση τους κατά τη συγγραφή της τελευταίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ελευθερία Ψυλλάκη και τον κύριο Νικόλαο Παρανυχιανάκη, για την αποδοχή πρόσκλησης συμμετοχής στη διόρθωση και βαθμολόγηση της συγκεκριμένης μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένεια μου, για την κάθε είδους υποστήριξη που μου πρόσφερε, κατά τη διάρκεια της ενασχόλησης μου με τη μελέτη αυτή.

Τσάκωνα Σοφία, Ιανουάριος 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....5

ABSTACT.....7

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο.....9

1.1 Εισαγωγή 9

1.2 Χαρακτηριστικά και ευεργετικές ιδιότητες Φύλλων ελιάς, Φύλλων πορτοκαλιάς και Αρωματικών φυτών 12

1.2.1 Φύλλα ελιάς ____ 12

1.2.2 Φύλλα πορτοκαλιάς ____ 15

1.2.3 Αρωματικά Φυτά ____ 16

1.3 Φαινολικό περιεχόμενο Φ.Ε., Φ.Π και Αρωματικών φυτών..... 21

1.3.1 Γενικά____ 21

1.3.2 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών____ 23

1.3.3 Μικροσυστατικά φύλλων ελιάς ____ 24

1.3.4 Μικροσυστατικά φύλλων πορτοκαλιάς ____ 26

1.3.5 Μικροσυστατικά φασκομηλιάς ____ 27

1.3.6 Μικροσυστατικά δίκταμου ____ 27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο.....28

2.1 Τρόποι ανάκτησης Φαινολών - Εκχύλιση..... 28

2.2 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη για την ανάκτηση φαινολών με τη βοήθεια του Μοντέλου Unifac 33

2.2.1 Μοντέλο Unifac ____ 33

2.2.2 Εφαρμογή μοντέλου Unifac για τον υπολογισμό των συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για διάφορες φαινόλες ____ 36

2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού φαινολών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων 37

2.3.1 Μέθοδοι προσδιορισμού Φαινολών____ 37

2.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε αρωματικά φυτά και φύλλων καρποφόρων δέντρων ____ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο.....41

3.1 Υλικά..... 41

3.1.1 Πρώτη ύλη ____ 41

3.1.2 Συσκευές και σκεύη____ 41

3.1.3 Χημικές ουσίες____ 42

3.2 Μέθοδοι..... 43

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων____ 43

3.2.2 Διαδικασία εκχύλισης ____ 43

3.2.3 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών _____ 44
3.2.4 Προσδιορισμός διαφόρων βιοφαινολικών τάξεων _____ 44
3.2.5 Προσδιορισμός ο-διφαινόλων _____ 45
3.2.6 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων δειγμάτων _____ 45
3.2.7 Έκφραση αποτελεσμάτων _____ 46

3.3 Εφαρμογή μοντέλου Unifac 46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο 50

4.1 Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου Unifac 50
4.1.1 Υπολογισμός συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για κάθε φαινόλη ____ 50
4.1.2 Σύγκριση συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για κάθε εξεταζόμενο φυτό 54

4.2 Αποτελέσματα πειραματικού μέρους..... 57
4.2.1 Παρατηρήσεις εκχυλισμάτων των δειγμάτων _____ 57
4.2.2 Αποτελέσματα μεθόδων προσδιορισμού _____ 57

4. 3 Γενικά συμπεράσματα 68

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αρωματικά φυτά και τα φύλλα καρποφόρων δέντρων κεντρίζουν τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών, εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και άλλων ιδιοτήτων τους. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στην παρουσία φαινολών και η ανάκτηση τους αποτελεί πεδίο έρευνας.

Η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνεται στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης φαινολών φύλλων ελιάς, φύλλων πορτοκαλιάς, αέριου μέρους της φασκομηλιάς και αέριου μέρους του δίκταμου, που ευδοκιμούν στη Κρήτη. Η εργασία διακρίνεται σε δύο μέρη, θεωρητικό και πειραματικό.

Κατά το θεωρητικό μέρος, με τη βοήθεια του μοντέλου Unifac, υπολογίστηκαν οι συντελεστές ενεργότητας διαφόρων διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, νερό, ακετόνη, αιθυλακετόνη, διαιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο) για τις φαινόλες που περιέχονται στα εξεταζόμενα φυτά και δέντρα. Σύμφωνα με το μοντέλο, οι περισσότερες φαινόλες, οι οποίες περιέχονται στα υπό εξέταση φυτά διαλύονται ευκολότερα στην αιθανόλη. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες από τις κυριότερες φαινόλες, που εξετάσθηκαν, των φύλλων ελιάς και του φασκόμηλου διαλύονται ευκολότερα στην αιθανόλη παρά άλλους διαλύτες, ενώ οι φαινόλες των φύλλων πορτοκαλιάς και του δίκταμο προτιμούν τη μεθανόλη, ακετόνη και αιθανόλη.

Κατά το πειραματικό μέρος, διερευνήθηκε η ανάκτηση φαινολών από τα παραπάνω υποστρώματα με υδρο-αιθανολικά μίγματα, μελετήθηκαν οι διαφορετικές συνθηκές (π.χ. θερμοκρασία, χρόνος εκχύλισης, αναλογία/ξηρού δείγματος διαλύτη και περιεκτικότητα υδροαλκοολικού μίγματος) και υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών (μέθοδος Folin Ciocalteau), των υδροξυκινναμικών οξέων, των ο-διφαινολών και των φλαβονοειδών, καθώς και της αντιοξειδωτικής δραστικότητας (μέθοδος DPPH) των εκχυλισμάτων. Συγκεκριμένα, οι ολικές φαινόλες, τα υδροξυκινναμικά οξέα, οι ο-διφαινόλες και οι φλαβονόλες των εκχυλισμάτων από όλα τα υποστρώματα κυμάνθηκαν από 3,1 έως 73,3 mg, 1,4 έως 38,8 mg, 1,4 έως 62,1 mg, 1,4-38,0 mg/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων από τα φύλλα ελιάς κυμάνθηκαν στα 1,1-19,8 mg DPPH/g ξ.δ., από τα φύλλα πορτοκαλιάς στα 0,2-1,2 mg DPPH/g ξ.δ., από το φασκόμηλο στα 1,2-34,5 mg DPPH/g ξ.δ. και από το δίκταμο στα 0,7-16,5 mg DPPH/g ξ.δ..

Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ως προς τους παραπάνω εξεταζόμενους παραμέτρους ήταν από τα φύλλα ελιάς οι 60°C, 70% αιθανόλη, 20g/l ξ.δ./διαλύτη και 4h, από τα φύλλα πορτοκαλιάς οι 60°C, 70% αιθανόλη, 80g/l ξ.δ./διαλύτη και 8h, από το φασκόμηλο οι 60°C, 70% αιθανόλη, 80g/l ξ.δ./διαλύτη και 8h και από το δίκταμο οι 60°C, 25-50% αιθανόλη, 80g/l ξ.δ./διαλύτη και 4h.

ABSTACT

There has been an increasing interest in the aromatic plants and fruitful trees due to their antioxidant and other properties. These properties are owed in the presence of phenols and their isolation constitutes field research.

The interest of this project is focused in the optimisation of the exctraction of phenols by olive leaves, orange leaves, sage and dictamnus of Crete. The project consists of theoritical and exerimental part.

The Unifac model was used in theoritical part. It was determined the activity coefficient of varius solvents (methanol, ethanol, water, acetone, ethyl-acetate, diethylester and dichloromethane) for the phenols that exist in aromatic plants and fruitfull trees. Specifically, the model determined that the ethanol was a good solvent for these phenols. Most of main phenols of sage and olive leaves prefer to solve in ethanol than the other solvents, but most of main phenols of orange leaves and dictamnus prefer to solve in methanol, acetone and ethanol.

The processing conditions such as temperature, time, solvent to dry sample ratio and composition % ethanol-water were examinated in the practical part. Specifically, it is determined the total phenols, antioxidant activity, o-diphenols, hydroxycinnamic acid and flavonols of these plants. So, the total phenols, the hydroxycinnamic acid, the o-diphenols and the flavonoles of all plants extracts ranged from 3,1 to 73,3 mg, 1,4 to 38,8 mg, 1,4 to 62,1 mg and 1,4-38,0 mg /g d.s. respectively, in according to the conditions.

Finally, it is important to be refered that the values of antioxidant properties of olive leaves, orange leaves, sage and dictamnus ranged from 1,1-19,8, 0,2-1,2, 1,2-34,5 and 0,7-16,5 mg DPPH/g d.s. respectively.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί η βελτιστοποίηση των συνθηκών (θερμοκρασία, αναλογία δείγματος-διαλύτη, περιεκτικότητα EtOH, χρόνος εκχύλισης) ανάκτησης των φαινολών από τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση ανάκτησης των φαινολών και η σύγκριση αυτών με δύο αρωματικά φυτά, φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*) και δίκταμο (*Origanum dictamnus*). Η σύγκριση πραγματοποιείται τόσο στις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών που περιέχουν τα φύλλα ελιάς, πορτοκαλιάς και αρωματικών φυτών όσο και στις διαφορετικές συνθήκες βελτιστοποίησης της ανάκτησης.

Όλα τα υποστρώματα εκχυλίστηκαν σε διάφορες περιεκτικότητες αιθανόλης. Η αιθανόλη επιλέχθηκε έναντι των υπόλοιπων διαλυτών γιατί αποτελεί βρώσιμος διαλύτης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από τις βιομηχανίες τροφίμων και τις φαρμακοβιομηχανίες σε αντίθεση με άλλους διαλύτες. Επιπλέον, με τη βοήθεια του μοντέλου Unifac προσδιορίσθηκε αν η αιθανόλη αποτελεί «καλό» διαλύτη για την ανάκτηση των φαινολών σε σύγκριση με άλλους διαλύτες (μεθανόλη, ακετόνη, αιθυλακετόνη, διαιθυλεστέρα, διχλωρομεθάνιο).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο}

1.1 Εισαγωγή

Τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς αποτελούν ένα μέρος των στερεών αποβλήτων των ελαιουργείων και πορτοκαλοβιομηχανιών. Τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινολών, οι οποίες με την ρίψη τους στο περιβάλλον δημιουργούν δυσμενής επιπτώσεις τους υδάτινους αποδέκτες και συγκεκριμένα τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς.

Τα φύλλα ελιάς των ελαιουργείων συνήθως συγκεντρώνονται σε κατάλληλο σημείου ενός χωραφιού και σε τακτά χρονικά διαστήματα διατίθενται ως λιπάσματα στους αγρούς (*Βορβίλας, 2006*). Επίσης, τα φύλλα πορτοκαλιάς διατίθενται σε κτηνοτρόφους για ζωοτροφές ενώ, όσα δεν μπορούν να διατεθούν κατ' αυτόν το τρόπο οδηγούνται στο ΧΥΤΑ (*Γιώτη, 2008*).

Από την άλλη μεριά, οι φαινόλες αποτελούν συστατικά ευεργετικά για τον άνθρωπο εξαιτίας των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών (*Samec et al, 2009*), αντιβιοτικών και συντηρητικών ιδιοτήτων τους (*Oliveira et al, 2008*). Επομένως, οι φαινόλες από τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς μπορούν να ανακτηθούν και να χρησιμοποιηθούν από βιομηχανίες τροφίμων ως «πρόσθετα» τροφίμων και από φαρμακοβιομηχανίες ως αντιβακτηριακά σε στοματικά διαλύματα.

Τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς αποτελούν απόβλητα, με αποτέλεσμα να αποτελούν φθηνό υπόστρωμα σε σύγκριση με τα αρωματικά φυτά τα οποία καλλιεργούνται για αυτούς τους σκοπούς.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα από σχετικές μελέτες που αφορούν το φαινολικό περιεχόμενο των φύλλων ελιάς, φασκομηλιάς και δίκταμου παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 1.1α, 1.1β, 1.1γ). Δεδομένα, σχετικά με το φαινολικό περιεχόμενο και προφίλ των φύλλων πορτοκαλιών είναι μηδαμινά.

Πίνακας 1.1α:Βιβλιογραφικά δεδομένα για το φαινολικό περιεχόμενο και προφίλ και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς

Α/Α	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΝΟΨΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1.	dimethylsulfoxide (5 g δείγματος/l)	Φαινολικό περιεχόμενο, φαινολικό προφίλ και αντιοξιδωτικές ιδιότητες φύλλων	Benavente-Garcia et al, 2000
2.	EtOH /H_20 (80:20)	Βελτιστοποίηση συνθηκών ξήρανσης (θερμοκρασία, ταχύτητα αέρα και χρόνος εκχύλισης) για τη μέγιστη ανάκτηση φαινολών	Erbay et al, 2009
3.	EtOH /H_20 (διάφορες περιεκτικότητες)	Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης (περιεκτικότητα EtOH, pH και χρόνου εκχύλισης) για τη μέγιστη ανάκτηση φαινολών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων	Mylonaki et al, 2008
4.	EtOH /H_20 (1:1v/v)	Φαινολικό περιεχόμενο, φαινολικό προφίλ και αντιοξιδωτικές ιδιότητες φύλλων	Briante et al, 2002
5.	MetOH/H_20(4:1),MetOH (100g/l), αιθυλ-ακετόνη (200gr/l)	Φαινολικό περιεχόμενο, φαινολικό προφίλ και αντιοξιδωτικές ιδιότητες φύλλων	Bouaziz & Sayadi, 2005
6.	EtOH /H_20 (80:20)	Ανάκτηση φαινολών ελιάς με μικροκύματα και βελτιστοποίηση χρόνου	Japon- Lujanet al, 2006
7.	MetOH, EtOH (200g/l) ακετόνη /H_2O (1:1), εξάνιο και αιθυλ-ακετόνη	Σύγκριση Φαινολικού προφίλ ελαιολάδου και φύλλων ελιάς και προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων	Paiva-Martins & Pinto, 2008
8.	MetOH (10g δειγμ./l)	Εκχύλιση φαινολών με MetOH και βελτιστοποίηση υδρόλυσης χρόνου εκχύλισης	Skerget et al, 2005
9.	Εξάνιο (25g/l), αίθυλ-ακετόνη(5g/l), διεθυλαιθέρα(5g/l), MetOH(5g/l)	Εκχύλιση φαινολών με τη μέθοδο SPE, εκχύλιση υπερκρίσιμου διαλύτη	Le Floch et al, 1998
10.	MetOH/H_20(50:50v/v) Εξάνιο (52mg δειγμ. /ml)	Διαφορές στο φαινολικό περιεχόμενο κατά την πολτοποίηση, αποθήκευση και εποχή	Ryan et al, 2003
11.	MetOH/H_20 (25:1)	Προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου σε διαφορετικές ποικιλίες φύλλων και βελτιστοποίηση θερμοκρασίας ξήρανσης	Boudhrioua et al, 2008

Πίνακας 1.1β:Βιβλιογραφικά δεδομένα για το φαινολικό περιεχόμενο και προφίλ και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες φασκομηλιάς

Α/Α	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΝΟΨΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1.	EtOH (διάφορες αναλογίες)	Επίδραση μεγέθους, θερμοκρασίας, χρόνου εκχύλισης, περιεκτικότητας EtOH και αναλογία διαλύτη-δείγματος στην εκχύλιση φαινολών του είδους *Salvia officinalis*	Durling et al, 2005
2.	MetOH (33g/l)	Εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου των ειδών *Salvia fruticosa* και *S. pomifera* με MetOH	Pizzale et al, 2002
3.	EtOH, ακετόνη	Εκχύλιση του φαινολικού περιεχομένου του είδους *Salvia fruticosa* με EtOH και Ακετόνη -Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων	Exarcou et al, 2002
4.	H_20 (4,2g/l), αιθυλεστέρας (50g/l)	Προσδιορισμός πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του είδους *Salvia officinalis*	Atou et al, 2005
5.	Εξάνιο: διαιθυλεστέρας (70:30)	Φαινολικό περιεχόμενο ειδών *Salvia fruticosa* και *S. pomifera*	Demo et al, 1998

Πίνακας 1.1γ: Βιβλιογραφικά δεδομένα για το φαινολικό περιεχόμενο και προφίλ και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες δίκταμου

Α/Α	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΥΝΟΨΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1.	H_20 (4,2g/l), αιθυλεστέρας (50g/l)	Προσδιορισμός πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικές ιδιότητες	Atou et al, 2005
2.	MetOH (60%), ακετόνη (60%),αιθυλ-ακετόνη/H_20 (60:30)	Εκχύλιση με διάφορους διαλύτες και χρήση μικροκυμάτων για την ανάκτηση φαινολών	Proestos et al, 2008
3.	H_20 (12,5g/l)	Προσδιορισμός πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικές ιδιότητες	Yang et al, 2002
4.	Πετρελαϊκός αιθέρας, διαιθυλ-αιθέρας, αιθανόλη	Προσδιορισμός πολυφαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικές ιδιότητες	Kouri et al, 2007
5.	H_20, MetOH, ακετόνη, αιθανόλη (50g/l κάθε διαλύτη)	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων υδατικού εκχυλίσματος δίκταμου	Moller et al, 1999

1.2 Χαρακτηριστικά και ευεργετικές ιδιότητες Φύλλων ελιάς, Φύλλων πορτοκαλιάς και Αρωματικών φυτών

1.2.1 Φύλλα ελιάς

(*dimossminouslakonias.blogspot.com/2008/08/4.html*)

Γενικά

Τα φύλλα ελιάς αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό υποπροϊόντων των ελαιοτριβείων στην Ελλάδα. Τα απόβλητα παραγωγής ελαιολάδου, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων και κλαδιών, είναι πολύ τοξικά για τα φυτά, τους μικροοργανισμούς και τους υδρόβιους οργανισμούς. Επιπλέον, εκτιμάται ότι κατά την τυπική φροντίδα της καλλιέργειας της ελιάς κόβονται περίπου 25 Kg κλαδιών και φύλλων/ δέντρο ετησίως (*Mylonaki et al, 2008*).

Ιστορική Αναδρομή

Η ελιά αποτελεί ένα ιερό και πολύτιμο δέντρο από αρχαιοτάτων χρόνων. Το δέντρο της ελιάς είναι στενά συνδεδεμένο με την ιστορία της Μεσογείου, αφού το ήπιο κλίμα της ευνόησε τη διάδοση της καλλιέργειας του (*www.musioelias.gr*). Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της ελιάς καλλιεργούνταν για πάνω από 10.000 έτη, σύμφωνα με τον Όμηρο. Για τους αρχαίους Έλληνες, η ελιά αποτελούσε ένα θρεπτικό και θεραπευτικό φυτό που ζούσε για πάντα. Ο καρπός αλλά και τα υπόλοιπα μέρη της ελιάς θεωρούνται ακόμα και σήμερα εξίσου σημαντικά.

Τα φύλλα ελιάς έχουν μελετηθεί για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Από το 19^{ο} αιώνα, υπάρχουν αναφορές για τη συμβολή των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στην υγεία. Συγκεκριμένα, ήταν γνωστή η ικανότητας τους να μειώνουν τον πυρετό και να προστατεύουν και να θεραπεύουν από την ελονοσία αποτελεσματικότερα από το κινίνο. Από το δεύτερο μισό του 20^{ο} αιώνα, έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι ευεργετικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς οφείλονται στη λειτουργία των φαινολών της ελιάς (*Japon-Lujan & Luque De Castro , 2007*).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η ελιά είναι αειθαλές, καρποφόρο δέντρο και ανήκει στην οικογένεια Oleaceae και στο γένος Olea (*www.lesvosonline.gr/.../tree.htm).* Τα χαρακτηριστικά της οικογένειας αυτής είναι ο μικρός ή ελλείπων κάλυκας, η άστροφη στεφάνη, οι δύο στήμονες, τα συμφυή καρποπέταλα και η δίχωρη ωοθήκη. Τα άνθη συναντιούνται σε φοβοεοδείς ταξιανθίες. Τα φύλλα είναι στενά, λογχοειδή, μακρουλά ή πλατιά, βγαίνουν στο βλαστό δυο-δυο αντικριστά και ζουν 2-3 χρόνια (*ΥΓΦΠΠ, 2000*). Το γένος περιλαμβάνει τα παρακάτω 20 είδη (Πίνακας 1.2.1α) από τα οποία, το *Olea europea L*. παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον (*el.wikipedia.org/wiki/Ελιά*). Στη συγκεκριμένη εργασία, τα φύλλα ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκουν σε αυτό το είδος και συλλέχθηκαν από τη Κρήτη. Η προέλευση του όρου olea είναι Ελληνική και προέρχεται από τη λέξη οέλαιον. Το δέντρο της ελιάς ευδοκιμεί σε ξηροθερμικές περιοχές και αποτελεί ένα από τα λίγα δέντρα που αναπτύσσεται ακόμα και σε πετρώδη και άγονα εδάφη (*ΥΓΦΠΠ, 2000*).

Πίνακας 1.2.1α: Είδη δέντρου ελιάς

Κοινή Ονομασία	**Λατινική ονομασία**
Ελαία η αγρία ,κοινώς αγρελιά ή αγρελίδι	*Olea silvestris*
Ελαία η ευρωπαϊκή ή κοινή, το συνηθέστερα καλλιεργούμενο είδος ανά τον Κόσμο	***Olea europea***
Ελαία η αιολόκαρπος	*Olea aeolocarpus*
Ελαία η ηδύκαρπος	*Olea nigra dulcis*
Ελαία η ισπανική	*Olea hispanica*
Ελαία η κρανιόμορφος , κοινώς σουβλολιά	*Olea craniomorpha*
Ελαία η κρεμοκλαδής, κοινώς κρεβατοελιά	*Olea pendulata*
Ελαία η κωνική, κοινώς ελιά σαλωνίτικη	*Olea conica*
Ελαία η λευκόκαρπος	*Olea leucocarpa*
Ελαία η μακρόκαρπος, κοινώς αετονυχολιά	*Olea macrocarpa*
Ελαία η μικρόκαρπος, κοινώς λιανολιά ή λαδοελιά	*Olea microcarpa*
Ελαία η μαστοειδής, κοινώς λιάστρος	*Olea mamillaris*
Ελαία η πρώιμος, κοινώς καλοκαιρίδα	*Olea precox*
Ελαία η σαλέρνιος, κοινώς γαϊδουρολιά	*Olea salerniensis*
Ελαία η στρεπτή, κοινώς στριφτολιά	*Olea contorta*
Ελαία η στρογγυλοειδής	*Olea rotunda virida*
Ελαία η υποστρόγγυλος	*Olea subrotunda*
Ελαία η σφαιρική	*Olea sphaerica*

1.2.2 Φύλλα πορτοκαλιάς

Γενικά

Τα φύλλα πορτοκαλιάς αποτελούν μέρος των στερεών αποβλήτων των βιομηχανιών παρασκευής χυμού πορτοκαλιού. Το μεγαλύτερο πρόβλημα των στερεών αποβλήτων αποτελούν οι φλοιοί των πορτοκαλιών και λιγότερο τα φύλλα. Συνήθως, τα στερεά αυτά απόβλητα διατίθενται σε κτηνοτρόφους για να μετατραπούν σε ζωοτροφές.

(*users.sch.gr/kassetas/zzzzTREES6.htm*)

Η παραγωγή πορτοκαλιών προς επεξεργασία στην Ελλάδα κυμαίνεται περίπου στους 300.000 τόνους και τα στερεά απόβλητα στους 160.000 τόνους. Η παραγωγή αυτή αποτελεί το 80% στο σύνολο παραγωγής εσπεριδοειδών (*Ισραηλίδης, 2001*).

Ιστορική Αναδρομή

Η πορτοκαλιά ήταν δέντρο της Κίνας για αιώνες, ενώ εντατικά καλλιεργούνταν από την αρχαιότητα στη βόρεια Αφρική. Η κινέζικη καταγωγή του έδωσε στο δέντρο το λατινικό όνομα *Citrus cinensis*. Οι Πορτογάλοι θαλασσοπόροι, τον 15ο αιώνα έφεραν στην Ευρώπη το φυτό και πιθανολογείται ότι σε αυτούς οφείλεται το όνομα του, «πορτοκαλιά». Στη συνέχεια, από την Ελλάδα διαδόθηκε σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες και Ισπανοί ιεραπόστολοι τη μετέφεραν στη βόρεια Αμερική (*el.wikipedia.org/wiki*).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η χώρα που παράγει τα περισσότερα πορτοκάλια είναι η Βραζιλία με μεγάλη διαφορά με τη δεύτερη και τρίτη χώρα, ΗΠΑ και Μεξικό. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η Ισπανία και η Ιταλία κατέχουν τις πρώτες θέσεις. (*users.sch.gr/kassetas/zzzzTREES6.htm*)

Το εκχύλισμα φύλλων και ανθέων πορτοκαλιάς αποτελεί αντισπασμωδικό και εφιδρωτικό αφέψημα, καθώς επίσης έχει ευεργετικές ιδιότητες στην καρδιά (*www.ert.gr/afieromata/votana/votana16.html*). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι σκοτώνει

τις προνύμφες κουνουπιών και έχει αντιμικροβιακή και αντιμυκητική δράση (*Oliveira et al, 2005*).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το δέντρο της πορτοκαλιάς ανήκει στην οικογένεια Rutaceae και στο είδος *Citrus sinensis*. Είναι δέντρο ύψους 7,5 – 12 μέτρων με κόμη συμπαγή και κωνική. Το χρώμα του φλοιού των βλαστών είναι γκρίζο καφετί. Φέρει αγκάθια. Τα φύλλα είναι στιλπνά, με σχήμα ωοειδές, έχουν μίσχο και μικρό πτερύγιο.

Επίσης, η πορτοκαλιά είναι ανθεκτικότερη στις χαμηλές θερμοκρασίες από ότι τα άλλα εσπεριδοειδή που καλλιεργούνται για τους καρπούς τους, αλλά γενικά δεν αντέχει σε θερμοκρασίες κάτω των 4° C υπό το μηδέν και για το λόγο αυτό καλλιεργείται σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές με ήπιο χειμώνα. Το είδος *Citrus sinensis* αποτελείται από 160 περίπου ποικιλίες. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται οι ποικιλίες Βαλέντσια, Χίου, Άρτας, Σουλτανί του Φοδέλε, Μέρλιν και Σαγκουίνι (*el.wikipedia.org/wiki).*

1.2.3 Αρωματικά Φυτά

Τα αρωματικά φυτά παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, επειδή αποτελούν σημαντικές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών. Τόσο το αιθέριο έλαιο όσο και το εκχύλισμα των αρωματικών φυτών αποτελούν προϊόντα, που χρησιμοποιούνται από βιομηχανίες τροφίμων αλλά και από φαρμακοβιομηχανίες, εξαιτίας των αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών και άλλων ιδιοτήτων (*Exarchou et al, 2002*).

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν σημαντικό κομμάτι της ελληνικής χλωρίδας. Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες ευνοούν την καλλιέργεια τους, αποδίδοντας εξαίρετης ποιότητας προϊόντα. Τα πιο κοινά αρωματικά φυτά ανήκουν στις οικογένειες Lamiaceae, Astraceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Theaceae, Fabaceae, Aquafoliaceae, Malvaceae kai Hypericaceae (*Boskou et al, 2006*). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, επιλέχθηκαν δύο αρωματικά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae. Η επιλογή των φυτών και των ειδών τους έγινε με τρία κριτήρια. Πρώτον, τα βότανα ευδοκιμούν στη Κρήτη, δεύτερον, μπορούν να καλλιεργηθούν και τρίτον, είναι

δραστικά αντιοξειδωτικά. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω κριτήρια επιλέχθηκαν η φασκομηλιά (*Salvia fruticosa*) και ο δίκταμος (*Origanum dictamnus*).

Φασκομηλιά

Γενικά

Το φασκόμηλο ανήκει στα αρωματικά φυτά και καλλιεργείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες ως αφέψημα και ως καρύκευμα (*el.wikipedia.org/wiki/*). Το φυτό της φασκομηλιάς χρησιμοποιείται από τη φαρμακοβιομηχανία, την αρωματοβιομηχανία, ως αρωματικό στα τρόφιμα και τη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό τροφίμων. Αρχικά, οι ερευνητές έδειχναν μεγάλο ενδιαφέρον μόνο για το αιθέριο έλαιο του φυτού, όμως τις τελευταίες δεκαετίες άρχισε να μελετείται το φαινολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του (*Durling et al, 2007*).

(*igb.agri.gov.il/main/*)

Ως αφέψημα το φασκόμηλο είναι γνωστό ότι βοηθάει στην καταπράυνση του πονοκεφάλου, του στομαχόπονου, του πόνου της κοιλιακής χώρας και άλλων ασθενειών. Επίσης, το εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο του έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (*Gali*-Muhtasib, *2006*). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες το φασκόμηλο ενισχύει τη μνήμη, δίνοντας ελπίδες για την ασθένεια του Alzheimer (αιθέριο έλαιο) (*Thildesley et al, 2008*) και παρουσιάζει αντιδιαβητικές ιδιότητες (*Eidi et al, 2009*).

Ιστορική Αναδρομή

Το φασκόμηλο είναι γνωστό από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Οι αρχαίοι Έλληνες το θεωρούσαν ιερό φυτό, αφιερωμένο στο Δία και πολυφάρμακο. Για το βότανο αυτό οι Άραβες έλεγαν: «πως μπορεί να πεθάνει ένας άνθρωπος, που έχει στον κήπο του φασκόμηλο;». Για τους Λατίνους ήταν το φυτό της αθανασίας.

Κατά το μεσαίωνα, το φασκόμηλο χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τα προβλήματα υγείας και ο Καρλομάγνος είχε διατάξει να φυτεύεται σε λαχανόκηπους και στους κήπους των μοναστηριών. Επίσης, σε περίοδο επιδημιών (π.χ. χολέρα), πίστευαν ότι όποιος έχει φασκόμηλο στο κήπο του δε πρέπει να φοβάται το θάνατο.

Οι Κινέζοι το ονομάζουν το «ελληνικό βλαστάρι» και το θεωρούν ανώτερο από το τσάι. Η επιθυμία τους για την απόκτηση του ήταν πολύ έντονη με αποτέλεσμα να ανταλλάσσουν 2 δέσμες κινέζικο τσάι με 1 δέσμη φασκόμηλου.

Οι Γάλλοι το αποκαλούν το ελληνικό τσάι και όχι μόνο το χρησιμοποιούν για φαρμακευτικούς σκοπούς αλλά και στη μαγειρική.

Το φασκόμηλο και η χρήση του ήταν γνωστή από παλιά στους Ιάπωνες και στους ιθαγενείς Ινδιάνους της Αμερικής.

Τέλος, αναφορές για το φασκόμηλο έχουμε από το 16^{ο} αιώνα και από τότε ο βοτανολόγος John Gerard υποστήριζε ότι κάνει καλό στο κεφάλι, στο νευρικό σύστημα και στη μνήμη (*Λάζαρη, 2005*).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η Salvia είναι του γένος Αγγειόσπερμων Δικότυλων φυτών που ανήκει στη τάξη Λαμιώδη (Lamiales), της οικογένειας των Λαμιίδων ή Χειλιανθών (Lamiaceae ή Labiatae).

Το *Salvia* περιλαμβάνει περίπου 900 είδη ποωδών και ξυλωδών φυτών που είναι ιθαγενή των εύκρατων και τροπικών περιοχών της γης. Είναι φυτά με φύλλα ακέραια ή διαιρεμένα, ανάλογα με το είδος, τα οποία διατάσσονται αντίθετα, και άνθη κόκκινα, μοβ ή μπλε που διατάσσονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους. Ορισμένα καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά για τα εντυπωσιακά άνθη τους (*S. splendens* της Βραζιλίας). Παρόλο που υπάρχουν πολλές ποικιλίες και χημειότυποι, τελικά μόνο λίγοι είναι σημαντικά εμπορεύσιμοι. Τα κυριότερα είδη με εμπορεύσιμο χαρακτήρα είναι:

1.*Salvia pomifera* Ελελίσφακος ο μηλοφόρος
2.*Salvia grandiflora* Ελελίσφακος ο μεγανθής
3.*Salvia triloba ή fruticosa* Ελελίσφακος ο τρίλοβος
4.*Salvia officinalis* Ελελίσφακος ο φαρμακευτικός

Το είδος *Salvia pomifera,* κοινώς γνωστή ως πικρή φασκομηλιά (Gretan sage), αυτοφύεται στη Ν. Ελλάδα σε υψόμετρο 0-500m, στη Κρήτη μέχρι τα 1200m, σε πετρώδη λοφοπλαγιές.

Το είδος *Salvia triloba ή fruticosa* κοινώς γνωστή ως αλισφακιά, φασκιά, φασκός, φασκομηλιά (Greek sage) φύεται στη Νότια Ελλάδα και τα νησιά του Αιγαίου σε

περιοχές χαμηλών υψομέτρων (< 300m) με εξαίρεση τη Κρήτη (μέχρι 1200m) κυρίως σε θαμνώδεις τόπους, συχνά σε παραθαλάσσιους γκρεμούς. Είναι μικρό αειθαλές θάμνος, με βλαστό όρθιο, τετραγωνικό, ισχυρό, χνουδωτό, ύψους 30-60 εκατοστά, φύλλα προμήκη ή λογχοειδή, χνουδωτά, σταχτιά με δύο λοβούς στην βάση και άνθη ιώδη σε βότρεις 2-6 ανά σπόνδυλο. Το είδος αυτό είναι πολύ αρωματικό ημιθαμνώδες φυτό, το οποίο χρησιμοποιείται στην παραγωγή αφεψήματος από τα ξηρά φύλλα του, και αποτελεί το κοινό φασκόμηλο, το οποίο καταναλώνεται κυρίως στην Ελλάδα.

Το είδος *Salvia officinalis* κοινώς γνωστή ως φασκομηλιά, φασκόμηλο, αλιφασκιά, χαμοσφασκιά, μοσχοκίδι, αγριοσφακιά φύεται στην Ήπειρο σε υψόμετρο 300-800m. Αυτοφύεται κυρίως σε θαμνώδη μέρη της Μακεδονίας. Ευδοκιμεί σε θερμές όσο και σε ψυχρές περιοχές (νησιά και ηπειρωτική Ελλάδα) (*Λάζαρη, 2005*).

Στην παρούσα μελέτη, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο είδος *Salvia triloba ή fruticosa* το οποίο ευδοκιμεί στη Κρήτη, αλλά και μπορεί να καλλιεργηθεί.

Δίκταμος

Γενικά

Το δίκταμο αποκαλείται το «βλαστάρι» της Κρήτης επειδή φύεται μόνο στα βουνά του νησιού. Η καλλιεργούμενη έκταση συνολικά στη Κρήτη κυμαίνεται από 20-100 στρέμματα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχει χαρακτηρισθεί ως απειλούμενο είδος, αν και έχει διασωθεί μέσω της καλλιέργειας (*www.embaros.com*). Το δίκταμο αποτελεί ένα αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων, στη φαρμακοβιομηχανία, στην αρωματοποιία, για τον αρωματισμό διαφόρων ποτών (κυρίως βερμούτ) κ.α. Οι θεραπευτικές του και άλλες ιδιότητες είναι απεριόριστες.

Το έκχυσμα του δίκταμου αποτελεί τονωτικό αλλά και αντί-σπασμωδικό. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ως αφέψημα καταπραΰνει τον πονοκέφαλο, τη νευραλγία, την ουλίτιδα, τον πονόδοντο, την αμυγδαλίτιδα, τον πονόλαιμο και το κοινό κρυολόγημα. Επιπλέον, το θεραπευτικό αυτό φυτό βοηθάει την πέψη και τη μείωση του στομαχόπονου. Η τοπική χρήση του φυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντισηπτικό και αντί-

φλεγμονώδες (*Chinou et al, 2007*). Από την άλλη μεριά το αιθέριο έλαιο του φυτού έχει αντιμικροβιακή δράση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων (*Liolios et al,2008*).

Ιστορική Αναδρομή

Το δίκταμο όπως και τα υπόλοιπα προαναφερόμενα φυτά είναι γνωστά από την αρχαιότητα για τις ευεργετικές ιδιότητες του. Οι θαυματουργές αυτές ιδιότητες του αναφέρονται από πολλούς αρχαίους συγγραφείς όπως τον Όμηρο, τον Αριστοτέλη, τον Ευριπίδη κ.α. αλλά και από αρχαίους γιατρούς όπως, τον Ιπποκράτης (*Kouri et al, 2007*).

Κατά τη μυθολογία, ήταν αφιερωμένο στη Θεά Άρτεμη γιατί βοηθούσε, όπως και εκείνη στον τοκετό. Για τον ίδιο λόγο, οι αρχαίοι παρίσταναν το άγαλμα της θεάς με στεφάνι από δίκταμο.

Η συλλογή του δίκταμου ήταν δουλεία επικίνδυνη και γινόταν κυρίως τον Αύγουστο που ήταν ανθισμένος από ανθρώπους που είχαν εξοικειωθεί στην αναρρίχηση με σκοινιά. Εξαιτίας αυτής της επικινδυνότητας, πήρε και το όνομα «έρωντας», γιατί πρέπει να έχει κανείς το πάθος του έρωτα για να αποφασίσει να διακινδυνέψει τη ζωή του για να το μαζέψει (*www.embaros.com*).

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Το δίκταμο ανήκει στο είδος *Origanum dictamnus*, στο γένος Origanum και στην οικογένεια των Λαμιίδων ή Χειλιανθών (Lamiaceae ή Labiatae). Το γένος Origanum αποτελείται από περίπου 42 είδη, τα οποία φύονται στη Μεσόγειο και μερικά από αυτά ευδοκιμούν και καλλιεργούνται στην Ευρώπη (*Kouri et al*, 2007).

Το δίκταμο είναι θαμνώδης πόα, με λευκό εριώδες τρίχωμα, φτάνει μέχρι τα 35cm σε ύψος. Ο βλαστός του φυτού είναι τετραγωνικός, πολύκλαδος και έχει φύλλα ωοειδή, με στρογγυλωμένη ή ελαφρώς καρδιόσχημη βάση, ακέραια, δικτυωτής νεύρωσης. Το φύλλο καλύπτεται από μεγάλο αριθμό μη αδενωδών οξύληκτων διακλαδισμένων τριχών. Σε αυτές οφείλεται η βελούδινη υφή του φύλλου. Ο ρόλος τους αυτών των τριχών είναι προστατευτικός. Το φύλλο φέρει επίσης αδενώδης τρίχες, οι οποίες εμφανίζονται ως διαυγή σταγονίδια διασκορπισμένα σ' όλη την επιφάνεια του. Οι αδενώδεις τρίχες αριθμητικά υπολείπονται των μη αδενωδών τριχών. Οι αδενώδεις

τρίχες θεωρούνται οι βασικές πηγές παραγωγής του αιθέριου ελαίου (*www.anthorama.gr/files/origanum_dictamnus.htm*).

1.3 Φαινολικό περιεχόμενο Φ.Ε., Φ.Π και Αρωματικών φυτών

1.3.1 Γενικά

Τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς αλλά και τα αρωματικά φυτά έχει αποδειχθεί ότι είναι πλούσια σε φαινόλες, οι οποίες προσδίδουν στα φυτά πολλές από τις ευεργετικές τους ιδιότητες, όπως αντιβακτηριακές, αντιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές κ.α. Οι φαινόλες που περιέχονται στα φυτά αυτά ανήκουν σε δύο κυρίως κατηγορίες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα.

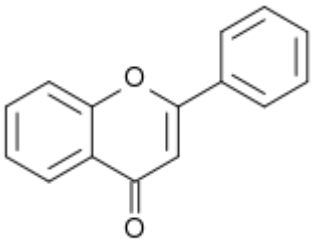
Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο άφθονη κατηγορία φαινολών που συναντώνται στο φυτικό βασίλειο. Το ενδιαφέρον με αυτές τις ουσίες είναι ότι τη δεκαετία του ‘30, που απομονώθηκαν για πρώτη φορά, ονομάστηκαν «βιταμίνη Ρ» εξαιτίας των παρόμοιων ιδιοτήτων τους με τη βιταμίνη C (*Tsimidou et al, 2006*).

Τα φλαβονοειδή συντίθενται στα φυτά μέσω δύο κύριων συνθετικών οδών, την οδό shikimate και την οδό του οξικού οξέος. Το περιεχόμενο των φυτών σε αυτές τις φαινόλες επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το γονότυπο των φυτών, τις συνθήκες του περιβάλλοντος, το βαθμό ωρίμανσης, τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης κ.α.. Τα φλαβονοειδή, όπως και όλες οι φαινόλες, βρίσκονται στα εξωτερικά τμήματα των φυτών ή φύλλων με αποτέλεσμα τη μην ομαλή κατανομή τους στους φυτικούς ιστούς.

Επιπλέον, τα φλαβονοειδή αποτελούν ουσίες που αποτρέπουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων στις φωσφολιπιδικές μεμβράνες των κυττάρων και εγκλωβίζουν τις ρίζες που ξεκινούν τις αλυσίδες στη διεπιφάνεια των μεμβρανών (*Γκέκας και Μπαλτά, 2005*).

Η κατηγορία αυτή χαρακτηρίζεται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μια 3- αλειφατική ανθρακική αλυσίδα (C_6-C_3-C_6) (*Tsimidou et al, 2006*).



Εικόνα1.3.1α: Μοριακή δομή κύριας δομής φλαβόνης (2-phenyl-1,4-benzopyrone)

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε διαφορετικές κατηγορίες όπως φαίνεται στο Πίνακα 1.2.3β.

Πίνακας1.3.1β: Υποκατηγορίες Φλαβονοειδών

Α/Α	**Υποκατηγορία Φλαβονοειδών**	**Παραδείγματα**
1.	Φλαβόνες	Luteolin, Apigenin, κ.α.
2.	Φλαβονόνες	Hesperitin, Naringenin κ.α.
3.	Φλαβονόλες	Quercetin, Kaempferol, κ.α.
4.	Φλαβανόλες	Taxifolin
5.	Φλαβαν-3-όλες	(+)-catechin
6.	Χαλκόνες	butein
7.	Ανθοκυάνες	Delphinidin, Cyanidin, κ.α.
8.	Ισοφλαβόνες	Genistein, Daidzein

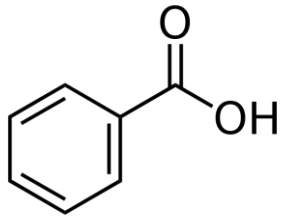
Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών, κυρίως εξαιτίας των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων αλλά και επειδή σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και την in vivo διάσπαση των φλαβονοειδών (*Tsimidou et al, 2006*).

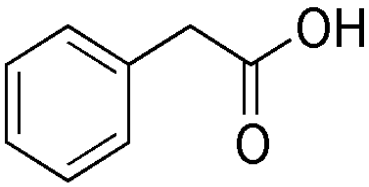
Το ένα τρίτο της ολικής φαινολικής διατροφικής κατανάλωσης αποδίδεται στα φαινολικά οξέα. Τα φυτά αποτελούν πλούσια πηγή αυτών των ουσιών, οι οποίες συνήθως βρίσκονται με τη μορφή υδροξυλιωμένων κινναμωμικών οξέων (π.χ. p-κουμαρικό, καφεϊκό οξύ κ.α.). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται στα φυτά συνήθως

ως κινινικά οξέα ή ως υδατάνθρακες εστέρων ενώ τα υδροξυβενζοϊκά οξέα κυρίως ως γλυκοζίτες (*Γκέκας και Μπαλτά, 2005*).

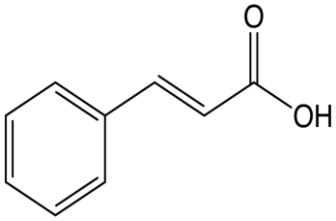
Τα φαινολικά οξέα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου ενωμένου είτε με μία καρβοξυλομάδα (βενζοϊκό οξύ C6-C1) είτε με μια μικρή ανθρακική αλυσίδα (phenylacetic acid C6-C2 και κινναμικό οξύ C6-C3) (*Tsimidou et al, 2006*)



Εικόνα 1.3.1α:Βενζοϊκό οξύ



Εικόνα1.3.1β: Phenylacetic acid



Εικόνα1.3.1γ: Κινναμικό οξύ

1.3.2 Μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών

Η σημαντικότερη δράση των φαινολών είναι η δράση τους στις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να δημιουργηθούν αργά και αυθόρμητα από τη δράση της θερμοκρασίας και της ακτινοβολίας, ειδικά κατά τη θέρμανση και την παρουσία του φωτός (Εικόνα 1.2.3α,Α) . Οι ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων ακαριαία αντιδρούν με το οξυγόνο, δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου (Εικόνα 1.2.3α,Β), οι οποίες μετατρέπονται σε άλλα μόρια λιπιδίων μέσω μιας ελεύθερης ρίζας (Εικόνα 1.2.3α,Γ).

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες, που παράγονται από την αποσύνθεση υδρουπεροξειδίων των λιπιδίων ή διμερών υδρουπεροξειδίων σε προχωρημένο στάδιο οξείδωσης, είναι ακόμα πιο σημαντικές, από τη πλευρά της αυτοοξείδωσης (Εικόνα 1.2.3α,Δ). Οι ρίζες τόσο των υπεροξειδίων των λιπιδίων (LOO·)(Εικόνα 1.2.3α,Ε) όσο των lipidoxy (LO·)(Εικόνα 1.2.3α,ΣΤ), αντιδρούν με τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δημιουργώντας υδροξύ και υπεροξειδιακά συστατικά, τα οποία μετατρέπονται απευθείας σε ελεύθερες

αντιοξειδωτικές ρίζες. Αυτές οι αντιοξειδωτικές ρίζες είναι σχετικά σταθερές (Εικόνα 1.2.3α,Ζ), έτσι ώστε η επόμενη αντίδραση να είναι αμελητέα, αν η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών δεν είναι πολύ υψηλή (*Pokorno, 2006*).

$$L-H \longrightarrow L\cdot + H\cdot \quad (A)$$

$$L\cdot - O_2 \longrightarrow L-OO\cdot \quad (B)$$

$$L-OO\cdot + L-H \longrightarrow L-OOH + L\cdot \quad (\Gamma)$$

$$L-OOH \longrightarrow L-O\cdot + \cdot O-H \quad (\Delta)$$

$$L-OO\cdot + A-H \longrightarrow L-OOH + A\cdot \quad (E)$$

$$L-O\cdot + A-H \longrightarrow L-OH + A\cdot \quad (\Sigma T)$$

$$A\cdot + L-H \longrightarrow A-H + L\cdot \quad (Z)$$

$$A\cdot + O_2 \longrightarrow A-OO\cdot \quad (H)$$

$$A\cdot + A\cdot \longrightarrow A-A \quad (\Theta)$$

Εικόνα 1.3.2α: Μηχανισμός δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών στην οξείδωση των λιπιδίων**.**

L= λιπίδιο, A= αντιοξειδωτικό, (1)= δημιουργία ελεύθερων ριζών λιπιδίων, (2)= οξείδωση ριζών λιπιδίων με το οξυγόνο του αέρα (3)= αντίδραση ριζών υπεροξειδίου με μόριο λιπιδίου, (4)= αποσύνθεση υπεροξειδίων του λιπιδίου σε ελεύθερες ρίζες (5)= αντίδραση ριζών υπεροξειδίου με ένα αντιοξειδωτικό (6)= αντίδραση οξείδιο λιπιδίου με ένα αντιοξειδωτικό (7)= αντίδραση ελεύθερων ριζών αντιοξειδωτικού, δημιουργώντας μια ελεύθερη ρίζα λιπιδίου (8)= οξείδωση ελεύθερης ρίζας του αντιοξειδωτικού, δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου του αντιοξειδωτικού (9)= διμερισμός των δύο ελεύθερων ριζών του αντιοξειδωτικού (*Pokorno, 2006*).

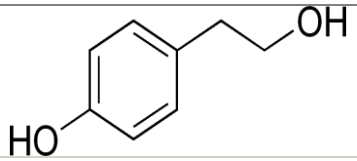
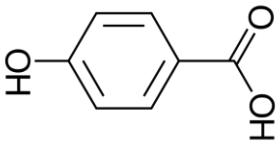
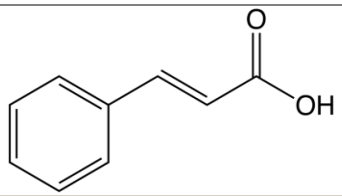
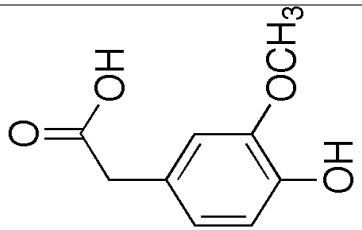
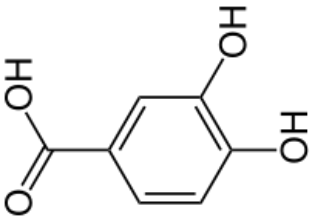
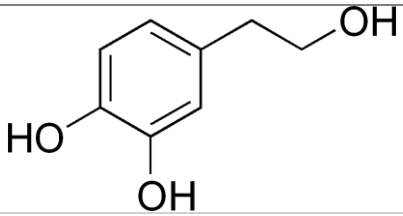
1.3.3 Μικροσυστατικά φύλλων ελιάς

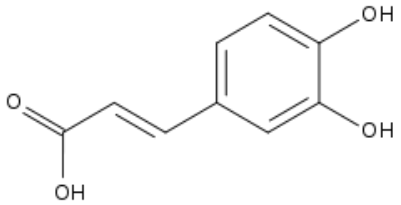
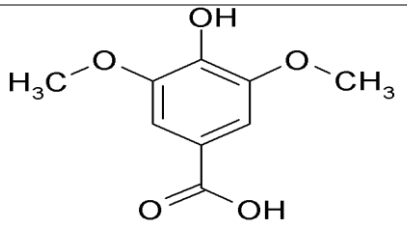
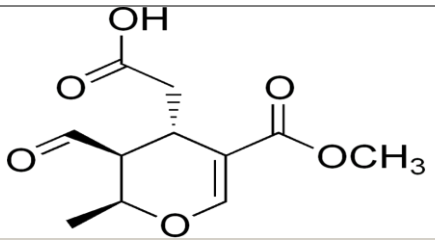
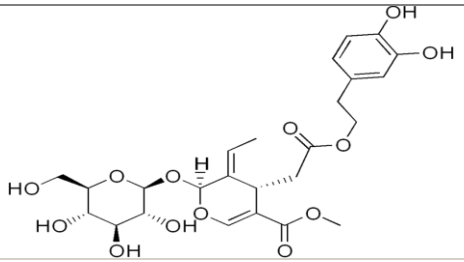
Τα φύλλα ελιάς, όπως προαναφέρθηκε, περιέχουν φαινόλες οι οποίες έχουν ευεργετικές ιδιότητες για τον άνθρωπο. Το φαινολικό περιεχόμενο μπορεί να ξεπερνάει τα 40g/Kg ξηρού δείγματος και ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία ελιάς αλλά και τις συνθήκες περιβάλλοντος (*Mylonaki et al, 2008*). Οι κυριότερες φαινόλες που περιέχονται στα φύλλα ελιάς αναγράφονται στον Πίνακα (*Le Floch et al, 1997*).

Οι πιο σημαντικές φαινόλες είναι η ελαιοευρωπεΐνη και η υδροξύ-τυροσόλη. Η ελαιοευρωπαΐνη αποτρέπει τις καρδιακές παθήσεις, προστατεύοντας από την οξείδωση των μεμβρανών των λιπιδίων, βελτιώνει το μεταβολισμό λιπιδίων, μειώνοντας τα

προβλήματα παχυσαρκίας, προστατεύει τα ένζυμα και τον υπερτασικό θάνατο κυττάρων σε καρκινοπαθείς και παρουσιάζει αντιβιοτικές ιδιότητες.

Ένα παράγωγο της ελαιοευρωπαΐνης αποτελεί η υδροξύ- τυροσόλη. Η υδροξύ-τυροσόλη έχει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από άλλα αντιοξειδωτικά όπως τις βιταμίνες C και E ή της 2,6- di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT). Τέλος, αυτές οι φαινόλες μπορούν να βοηθήσουν στη πρόληψη κατά της μακροφάγου δράσης, στην εμπόδιση βακτηριακής ανάπτυξης στα δόντια και στη πρόληψη κατά των ασθενειών της στοματικής κοιλότητας και περιοδοντίτιδας (*Japon-Lujan & Luque De Castro, 2007*).

Φαινόλες	**Χημική Δομή**
Τυροσόλη	
OH- Βενζοϊκό οξύ	
Κινναμικό οξύ	
Ομοβαννιλικό οξύ	
Πρωτοκατεχικό οξύ	
OH- tyrosol	

Καφεϊκό οξύ	
Συρινγκικό οξύ	
Elenolic acid	
Ελαιευρωπεΐνη	
κ.α.	

1.3.4 Μικροσυστατικά φύλλων πορτοκαλιάς

Όπως προαναφέρθηκε, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ελάχιστα στοιχεία για τις ιδιότητες και το περιεχόμενο των φύλλων πορτοκαλιάς. Αναφορές γίνονται ότι τα φύλλα αυτά έχουν αντιμικροβιακές και αντιμυκητικές ιδιότητες και ότι περιέχουν φλαβόνες (απιγενίνη, διοσμετίνη, λουτεολίνη), καφεΐνη, εσπεριδίνη και διοσμίνη (*Oliveira et al, 2005*). Η λουτεολίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονική δράση (*en.wikipedia.org/wiki/Luteolin*). Επίσης, η εσπεριδίνη και διοσμετίνη έχει μελετηθεί ότι έχουν αντιφλεγμονική, διουρητική, αντιυπερτασική και αντιοξειδωτική δράση.

Ενώ για τα φύλλα της πορτοκαλιάς δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες, για το χυμό και το φλοιό των πορτοκαλιών υπάρχουν αρκετές αναφορές για το φαινολικό περιεχόμενο

τους. Συγκεκριμένα, ο φλοιός των πορτοκαλιών περιέχει φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, φελουρικό οξύ και σιναπικό οξύ) (*Peleg et al, 1991*) και φλαβονοειδή (hesperidin, naringin, rutin, quercetin, hesperitin, luteolin, kamphenol κ.α.) (*Swatsing et al, 2000*).

1.3.5 Μικροσυστατικά φασκομηλιάς

Η φασκομηλιά αποτελεί ένα φαρμακευτικό φυτό με πολλές θεραπευτικές ιδιότητες που οφείλονται στις φαινόλες του εκχυλίσματος του αλλά και στο αιθέριο έλαιο του. Επομένως, αρκετές έρευνες σχετικά με το φαινολικό προφίλ έχουν πραγματοποιηθεί. Συγκεκριμένα, τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του αέριου μέρους της φασκομηλιάς είναι το carnosic acid, carnosol και το rosmarinic acid (*Durling et al, 2007*). Όμως, το εκχύλισμα του περιέχει και φλαβονοειδή (απιγενίνη, λουτεολίνη, κουαρσετίνη κ.α.) (Atou et al, 2005) και φαινολικά οξέα (κουμαρικό οξύ, βαννιλικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμικό οξύ, καφεϊκό οξύ κ.α.) τα οποία συμβάλουν στη συνολική αντιοξειδωτική δράση (*Μπαλαμώτη, 2004*).

1.3.6 Μικροσυστατικά δίκταμου

Το δίκταμο, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζει πολλές θεραπευτικές ιδιότητες οι οποίες οφείλονται στις φαινόλες που περιέχει το εκχύλισμα του αλλά και στο αιθέριο έλαιο του.

Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το δίκταμο περιέχει φαινολικά οξέα όπως βαννιλικό, καφεϊκό, κουμαρικό και φελουρικό οξύ, φλαβονόλες και φλαβονόνες και άλλα φλαβονοειδή (*Kouri et al, 2007, Proestros et al, 2008*). Επίσης, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο του δίκταμου αποτελείται κυρίως από καρβακρόλη, θυμόλη, γ- terpinene και p-cymene (*Kouri et al, 2007, Liolos et al, 2008*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}

2.1 Τρόποι ανάκτησης Φαινολών - Εκχύλιση

Ως εκχύλιση νοείται η μεταφορά μιας ουσίας από μια φάση όπου βρίσκεται, είτε υπό μορφή διαλύματος είτε διασποράς, σε μία υγρή φάση.

Η εκχύλιση αποτελεί μια από τις παλαιότερες «χημικές» δραστηριότητες του ανθρώπου. Η παραλαβή ενός αφεψήματος, ενός αρώματος, μιας χρωστικής ή και μιας δραστικής φαρμακευτική ουσίας από διάφορα φυτά αποτελούν τις πρώτες προσπάθειες του ανθρώπου να μεταφέρει από τη φυτική ύλη στην υδατική φάση διάφορες ουσίες (*www.chem.auth.gr/content/organic_lab/CHEM/EXTRACTION.pdf*).

Η αρχή της μεθόδου της εκχύλισης είναι η κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, οι οποίες δεν αναμειγνύονται. Η τεχνικές εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεών με υγρό (extraction), η εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE) και η εκχύλιση υγρού ή στερεού σώματος διαλυμένου σε υγρό από άλλο υγρό (liquid-liquid extraction) (*Κουλαδούρος και Κωνσταντίνου, 2004*).

Συγκεκριμένα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την ανάκτηση φαινολών από διάφορα αρωματικά φυτά και φύλλα ελιάς, με τη μέθοδο της εκχύλισης. Η εκχύλιση που συνήθως προτιμάται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η εκχύλιση στερεών με υγρό με χρήση διάφορων διαλυτών (Πίνακας 2.1.1α, 2.1.1β) και λιγότερο η εκχύλιση SPE (*Le Floch et al, 1998*).

Στην παρούσα μελέτη η εκχύλιση που λαμβάνει χώρα αφορά την εκχύλιση στερεού-υγρού. Το υπόστρωμα των φυτών αποτελεί τη στερεά φάση και η αιθανόλη (σε διαφορετικές περιεκτικότητες) την υγρή φάση, στην οποίο θα μεταφερθούν η κατηγορία ουσιών που μας ενδιαφέρουν (φαινόλες).

Η μέθοδο της εκχύλισης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες εφαρμογές διαδικασίες της βιομηχανίας τροφίμων, με κύρια την εκχύλιση στερεού- υγρού και δευτερευόντως την εκχύλιση υγρού- υγρού (*Pinelo et al, 2006*).

Η εκχύλιση ενός συστατικού (π.χ. φαινόλες) που περιέχεται σε ένα στερεό (π.χ. φύλλα ελιάς) αποτελεί μια διαδικασία, η οποία είναι πιο πολύπλοκη από τη μεταφορά μάζας της διεπιφάνειας στερεού-υγρού. Η διάχυση του διαλύτη στο στερεό είναι καθοριστικός

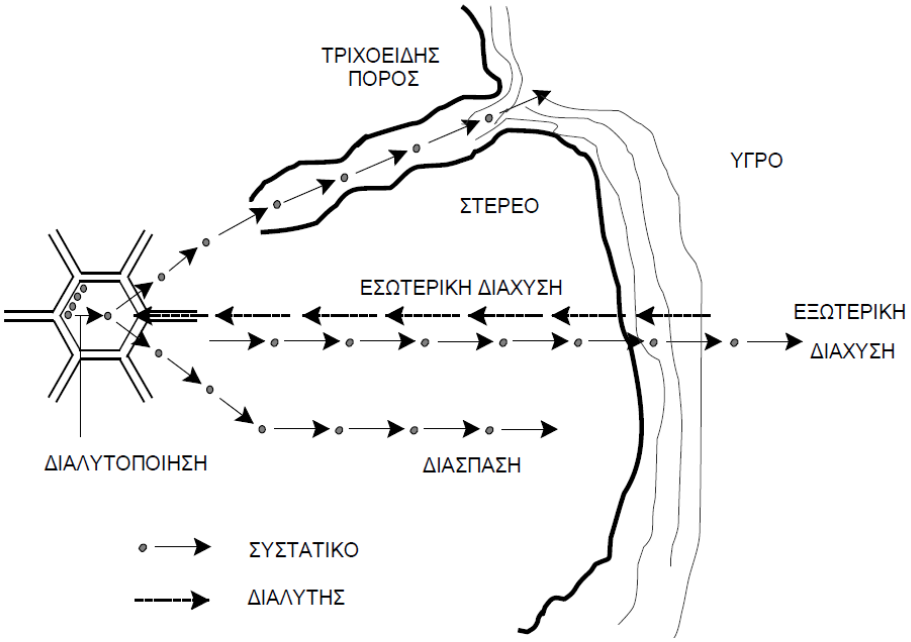
μηχανισμός για τη μεταφορά μάζας στην όλη διεργασία, επειδή τις περισσότερες φορές το στερεό περιέχει από τη φύση του μια υγρή φάση ή εμποτίζεται από το διαλύτη. Όταν ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό πραγματοποιείται μια σειρά από βήματα που επηρεάζουν το διαχωρισμό του συστατικού από το στερεό και την παραλαβή του στον κύριο όγκο του διαλύτη (Σχήμα 2.1.1α). Πρώτον, πραγματοποιείται η είσοδος του διαλύτη στη μήτρα του στερεού-φυτού. Το δεύτερο βήμα είναι η διαλυτοποίηση του συστατικού και το τρίτο η μεταφορά του συστατικού προς το εξωτερικό της μήτρας του στερεού. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η μεταφορά του συστατικού από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού προς τον κύριο όγκο του διαλύτη και η μετακίνηση του συστατικού με το διαλύτη. Τέλος, διαχωρίζεται το εκχύλισμα από το στερεό. Τα βήματα αυτά δεν πραγματοποιούνται με τον ίδιο ρυθμό. Ο ρυθμός εκχύλισης του συστατικού καθορίζεται από το βήμα με το βραδύτερο ρυθμό, που συνήθως είναι η μεταφορά του συστατικού στο εσωτερικό του στερεού (*Τζια και Ωραιοπούλου, 2007*).

Ο ρυθμός και η απόδοση της εκχύλισης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Πρώτον, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα χημικά χαρακτηριστικά του διαλύτη καθώς επίσης, η δομή και η σύσταση του φυσικού προϊόντος τα οποία εξασφαλίζουν ότι το σύστημα φυτού-διαλύτη παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά, η οποία δε μπορεί να προβλεφθεί (*Pinelo et al, 2006*). Η δομή των φυτικών ιστών συνίσταται από κύτταρα, μεσοκυττάρια διαστήματα και τριχοειδής πόρους. Τα κυτταρικά τοιχώματα και η μεμβράνη του φυτού εμποδίζει τη διάχυση και ανάλογα με το ποσοστό λιγνίνης που περιέχουν η αντίσταση ποικίλει.

Δεύτερον, η θερμοκρασία αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα της εκχύλισης. Η διαπερατότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών μπορεί να αυξηθεί και η εκλεκτικότητα των μορίων που μεταφέρονται να περιοριστεί με θερμική μετουσίωση των τοιχωμάτων και των μεμβρανών.

Επιπλέον, το μέγεθος του στερεού-φυτού που υποβάλλεται σε εκχύλιση επηρεάζει την απόδοση της. Συγκεκριμένα, όταν το φυτό αλέθεται σε μικρότερα κομματάκια αυξάνεται η επιφάνεια επαφής και μειώνεται η απόσταση διάχυσης, με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο ρυθμός διάχυσης. Όσο το μέγεθος μικραίνει (μέχρι ενός σημείου), τόσο τα σπασμένα εξωτερικά κύτταρα αποτελούν μεγαλύτερο ποσοστό των συνολικών κυττάρων του σωματιδίου και ο ρυθμός εκχύλισης αυξάνεται επί πλέον. Από την άλλη μεριά, σε πολύ μικρά μεγέθη, η κίνηση του διαλύτη δυσκολεύει καθώς επίσης και ο διαχωρισμός στερεού-υγρού (*Τζια και Ωραιοπούλου , 2007*).

Τέλος, ο χρόνος, η πίεση, η αναλογία διαλύτη-φυτού, ο όγκος της εκχύλισης αποτελούν σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης και συγκεκριμένα τη μέγιστη παραλαβή του επιθυμητού συστατικού που ανακτάται (*Luthrial, 2008*).



Σχήμα 2.1.1α:Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης συστατικού από στερεά σωματίδια με χρήση διαλύτη(*Τζια και Ωραιοπούλου , 2007*)

Πίνακας 2.1.1α: Διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση φαινολών σε αρωματικά φυτά με τη μέθοδο της εκχύλισης

Α/Α	ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΦΥΤΟ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1.	τσάι και άλλα βότανα	Νερό, αιθυλεστέρας	Atoui et al, 2005
2.	*Salvia fruticosa*	EtOH	Durling et al, 2007
3.	Μαύρο και πράσινο τσάι	Νερό	Hodgson et al, 1999
4.	*Salvia fruticosa, officinalis* και Origanum species	MetOH	Pizzale et al.,2002
5.	Διάφορα βότανα	phosphate buffer	Wei Zheng & Wang, 2001
6.	Greek oregano και greek sage	EtOH και Ακετόνη	V. Exarchou et al, 2002
7.	Διάφορα βότανα	MetOH, hexane, dichloromethane,ethyl- acetate	Parejo et al, 2002
8.	*Siderities* syriaca	Petroleum ether, dichloromethane, EtOH	Armata et al, 2008
		MetOH,t-butyl methylether, butanol	
9.	Χαμομήλι	Νερό	Harbourn et al, 2009
10.	Green tea	Νερό	Molan et al , 2009
11.	*Origanum dictamnus*	petroleum ether, diethyl ether, ethanol	Kouri et al, 2007
		petroleum ether, ethylacetate	
		EtOH	
12.	*Sideritis eurapea*	n-hexane, MetOH, νερό, diethy ester, n-butanol	Tsaknis & Lalas , 2005

Πίνακας 2.1.1β: Διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση φαινολών σε φύλλα ελιάς με τη μέθοδο της εκχύλισης

Α/Α	ΑΡΩΜΑΤΙΚΟ ΦΥΤΟ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1.	Φύλλα ελιάς	Dimethylsufoxide (DMSO)	Benavente-Garcia et al, 2000
2.	Φύλλα ελιάς	H_20/EtOH	Briante et al, 2002
3.	Φύλλα ελιάς	EtOH/H_20	Erbay et al, 2009
4.	Φύλλα ελιάς	Dichloromethane, EtOH/water	Mylonaki et al, 2008
5.	Φύλλα ελιάς	MetOH/water, hexane	Ryan, et al, 2003
6.	Φύλλα ελιάς	MetOH or EtOH, acetone/water	Paiva- Martins et al, 2007
		n-hexane, ethylacetate	
7.	Φύλλα ελιάς	MetOH	Skerget, et al, 2005
8.	Φύλλα ελιάς	MetOH/water	Bouaziz & Sayadi, 2005
		MetOH	
		ethyl acetate	
9.	Φύλλα ελιάς	EtOH/water	Japón-Luján et al, 2006
10.	Φύλλα ελιάς	MetOH/water	Boudhrioua et al, 2009
11.	Φύλλα ελιάς	MetOH	Papoti et al , 2009
12.	Φύλλα ελιάς	MetOH,hexane	Ortega-Garcia et al, 2008
13.	Φύλλα ελιάς	EtOH	Japón-Luján et al, 2008

2.2 Επιλογή κατάλληλου διαλύτη για την ανάκτηση φαινολών με τη βοήθεια του Μοντέλου Unifac

2.2.1 Μοντέλο Unifac

Γενικά

Το μοντέλο Unifac αποτελεί προηγμένη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συντελεστών ενεργότητας σε υγρά διαλύματα. Η γεωμετρία (σχήμα, μέγεθος), η δομή (χωρισμός σε κύριες χημικές ομάδες και υπομονάδες) και η ενεργειακή αλληλεπίδραση μεταξύ των ομάδων και των μορίων αποτελούν χαρακτηριστικά που λαμβάνονται υπόψη στο Unifac.

Οι πρώτες και κύριες ιδιότητες των υπομονάδων που περιλαμβάνονται είναι ο σχετικός όγκος R_k, η σχετική επιφάνεια Q_k και οι παράμετροι αλληλεπίδρασης α_{mk} (σε μονάδες Kelvin) μεταξύ τους. Οι ιδιότητες R_k ,Q_k και α_{mk} ανευρίσκονται σε Πίνακες στη Βιβλιογραφία για ένα μεγάλο αριθμό υποομάδων.

Ο συντελεστής ενεργότητας γi, ενός συστατικού i, δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\ln\gamma i = \ln\gamma i^{C} + \ln\gamma i^{R}$$

όπου:

C ο δείκτης (όχι δύναμη) που αναφέρεται στο συνδυαστικό μέρος (που έχει σχέση με το σχήμα και το μέγεθος των μορίων)

R ο αντίστοιχος δείκτης που αναφέρεται στο υπολειπόμενο μέρος (των ενεργειακών αλληλεπιδράσεων) και (*Γκέκας, 2003*)

Πεδίο Εφαρμογής του μοντέλου Unifac

Το Unifac αποτελεί ένα εύχρηστο μοντέλο και μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλές διαφορετικές περιπτώσεις.

Όμως, το μοντέλο αυτό παρουσιάζει και κάποιους περιορισμούς όσο αφορά στην εφαρμογή του. Συγκεκριμένα, η πίεση δε πρέπει να ξεπερνά τα λίγα bar (περίπου 5bar), η θερμοκρασία πρέπει να είναι υπό των 150 ^{o}C, οι υπολογισμοί γίνονται μόνο για

ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των πυκνωμένων μη ηλεκτρολυτών και δε πρέπει να περιλαμβάνουν πάνω από 10 δομικές ομάδες (*Randhol and Engelien, 2000*).

Το πρόγραμμα xUnifac

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα xUnifac το οποίο αποτελεί μια έκδοση του Unifac σε μορφή λογιστικού φύλλου. Η έκδοση αυτή δίνει τη δυνατότητα της εξέτασης της επίδρασης κάθε παραμέτρου στο συντελεστή ενεργότητας. Επίσης, δίνεται η δυνατότητα της προσθήκης υπομονάδων και ομάδων με όριο 200 και 100 αντίστοιχα, καθώς και ο ορισμός χημικών ενώσεων (έως 300).

Επομένως, ο χρήστης μπορεί να εισάγει δεδομένα όπως τα συστατικά του μείγματος, τη θερμοκρασία (^{o}K) και το μοριακό κλάσμα κάθε συστατικού και το πρόγραμμα να υπολογίσει το συντελεστή ενεργότητας (*Γκέκας, 2003*)(*Randhol and Engelien, 2000*)..

Τα στάδια που ακολουθούνται για την εφαρμογή του προγράμματος είναι το εξής:

1. Εισαγωγή των χημικών ενώσεων που θέλουμε να εξετάσουμε (διαλυμένες ουσίες και διαλύτης) στο Φύλλο «**Define Component**»

Component Table

Name:	water				r:	0,92	q:	1,4	l:	-2,32	Sim w:	1
	Sub group:	H2O										
	No of sbgr:	1										
		17	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	benzene				r:	3,1878	q:	2,4	l:	1,7512	Sim w:	6
	Sub group:	ACH										
	No of sbgr:	6										
		10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	ethanol				r:	2,5755	q:	2,588	l:	-1,638	Sim w:	3
	Sub group:	CH3	CH2	OH								
	No of sbgr:	1	1	1								
		1	2	15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	n-Pentane				r:	3,8254	q:	3,316	l:	-0,2784	Sim w:	5
	Sub group:	CH3	CH2									
	No of sbgr:	2	3									
		1	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	acetone				r:	2,5735	q:	2,336	l:	-0,386	Sim w:	2
	Sub group:	CH3	CH3CO									
	No of sbgr:	1	1									
		1	19	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	methanol				r:	1,4311	q:	1,432	l:	-0,4356	Sim w:	1
	Sub group:	CH3OH										
	No of sbgr:	1										
		16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	2-propanol				r:	3,2491	q:	3,124	l:	-1,6236	Sim w:	4
	Sub group:	CH3	CH	OH								
	No of sbgr:	2	1	1								
		1	3	15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	Caffeic acid				r:	6,1675	q:	4,771	l:	1,815	Sim w:	8
	Sub group:	ACH	ACOH	AC	CH=CH	COOH						
	No of sbgr:	3	2	1	1	1						
		10	18	11	6	43	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	Gallic acid				r:	5,4147	q:	4,184	l:	1,7388	Sim w:	7
	Sub group:	ACH	ACOH	AC	COOH							
	No of sbgr:	2	3	1	1							
		10	18	11	43	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	caffeic acid				r:	6,1675	q:	4,771	l:	1,815	Sim w:	8
	Sub group:	ACH	ACOH	AC	CH=CH	COOH						
	No of sbgr:	3	2	1	1	1						
		10	18	11	6	43	-1	-1	-1	-1	-1	-1

xUNIFAC / Introduction / Calculation / **Define Component** / Table Rk, Qk / Table Interaction / Calc Combinatorial Part

2. Επιλογή στο φύλλο «**Calculation**» την υπό εξέταση ουσία και το διαλύτη και εισαγωγή της αναλογίας αυτών και της επιθυμητής θερμοκρασίας

	Components	Molefractions (of up to five different mixtures)				
No	Do not choose "[n/a]"	1	2	3	4	5
1	Caffeic acid	1,0000E-01	1,0000E-01	1,0000E-01		
2	acetone	9,0000E-01				
3	water		9,0000E-01			
4	ethanol			9,0000E-01		
5	[empty]					
6	[empty]					
7	[empty]					
8	[empty]					
9	[empty]					
10	[empty]					
11	[empty]					
12	[empty]					
13	[empty]					
14	[empty]					
15	[empty]					
	Σ(x_i)	1,0000E+00	1,0000E+00	1,0000E+00	0,0000E+00	0,0000E+00

Temperature

T = 300 K

Press the **F9** key to calculate the result

NB: After selecting a component, you must click in this sheet before pressing F9

	ln γi					Activity coefficient, γi				
No	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-2,1444E+00	-9,4405E-01	-2,2003E+00			1,1713E-01	3,8905E-01	1,1077E-01		
2	-7,3719E-02					9,2893E-01				
3		-2,8387E-02					9,7201E-01			
4			-1,1154E-01					8,9445E-01		
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										

xlUNIFAC / Introduction \ Calculation / Define Component / Table Rk, Qk / Table Interaction / Calc Combinatorial Part / Calc Residual

3. Στο ίδιο φύλλο «**Calculation**» υπολογίζεται ο συντελεστής ενεργότητας σε κάθε περίπτωση

4. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει στο πρόγραμμα μια υπομονάδα, βρίσκοντας στην βιβλιογραφία το Q_k και R_k της, ο χρήστης μπορεί να τη προσθέσει στο φύλλο «**Table R_k,Q_k**»

Table over R and Q values for subgroups

Main group	Subgroup	Group name	R_k	Q_k
1	1	CH3	0,9011	0,848
1	2	CH2	0,6744	0,540
1	3	CH	0,4469	0,228
1	4	C	0,2195	0,000
2	5	CH2=CH	1,3454	1,176
2	6	CH=CH	1,1167	0,867
2	7	CH2=C	1,1173	0,988
2	8	CH=C	0,8886	0,676
2	9	C=C	0,6605	0,485
3	10	ACH	0,5313	0,400
3	11	AC	0,3652	0,120
4	12	ACCH3	1,2663	0,968
4	13	ACCH2	1,0396	0,660
4	14	ACCH	0,8121	0,348
5	15	OH	1,0000	1,200
6	16	CH3OH	1,4311	1,432
7	17	H2O	0,9200	1,400
8	18	ACOH	0,8952	0,680
9	19	CH3CO	1,6724	1,488
9	20	CH2CO	1,4457	1,180
10	21	CHO	0,9980	0,948
11	22	CH3COO	1,9031	1,728
11	23	CH2COO	1,6764	1,420
12	24	HCOO	1,2420	1,188
13	25	CH3O	1,1450	1,088
13	26	CH2O	0,9183	0,780
13	27	CH-O	0,6908	0,468
13	28	FCH2O	0,9183	1,100
14	29	CH3NH2	1,5959	1,544
14	30	CH2NH2	1,3692	1,236
14	31	CHNH2	1,1417	0,924
15	32	CH3NH	1,4337	1,244
15	33	CH2NH	1,2070	0,936
15	34	CHNH	0,9795	0,624
16	35	CH3N	1,1865	0,940
16	36	CH2N	0,9597	0,632
17	37	ACNH2	1,0600	0,816
18	38	C5H5N	2,9993	2,113
18	39	C5H4N	2,8332	1,833
18	40	C5H3N	2,6670	1,553
19	41	CH3CN	1,8701	1,724

xlUNIFAC / Introduction / Calculation / Define Component / **Table Rk, Qk** / T

2.2.2 Εφαρμογή μοντέλου Unifac για τον υπολογισμό των συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για διάφορες φαινόλες

Με τη χρήση του μοντέλου αυτού, μπορεί να προβλεφθεί η προτίμηση μιας ουσίας (π.χ. φαινόλης) να μεταφερθεί-διαχυθεί σε έναν διαλύτη σε σχέση με έναν άλλο. Επομένως, ανάλογα με το συντελεστή ενεργότητας του διαλύτη για συγκεκριμένη ουσία μπορούμε να προβλέψουμε αν αποτελεί «καλός» διαλύτης. Όσο πιο μικρός είναι

ο συντελεστής ενεργότητας ενός διαλύτη τόσο καλύτερος διαλύτης αποτελεί για συγκεκριμένη θερμοκρασία.

2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού φαινολών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων

2.3.1 Μέθοδοι προσδιορισμού Φαινολών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το προσδιορισμό φαινολών είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F.C.), που αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο, αφού χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλα τα πειράματα προσδιορισμού ολικών φαινολών αρωματικών φυτών (*Atoui et al, 2005, Durling et al, 2007, Zheng & Wang, 2001, Exarchou et al, 2002, Parejo et al, 2002, Harbourn et al, 2009*) και η μέθοδος High Performance Liquid Chromatografy (HPLC), που χρησιμοποιείται σε μικρότερη κλίμακα. Από την άλλη μεριά, για το προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου φύλλων ελιάς χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος HPLC (*Benavente-Garcia et al, 2000, Erbay et al, 2009, Mylonaki et al, 2008, Paiva-Martins & Pinto, 2008, Skerget, et al, 2005, Bouaziz & Sayadi, 2005, Japón-Luján et al, 2006, Paiva- Martins & Gordon, 2001, Ryan, et al, 2003)* ενώ σπάνια χρησιμοποιείται η F.C.

Η μέθοδος F.C. αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη μέθοδος για τον υπολογισμό των ολικών φαινολών ενώ η HPLC είναι πιο πολύπλοκη αλλά χρησιμοποιείται και για ποιοτική ανάλυση.

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αποτελεί μια ήπια αλκαλική υδρόλυση ακετυλιωμένων φαινολικών ενώσεων. Είναι μια ποσοτική μέθοδος. Η αρχή της μεθόδου είναι ότι με την παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σ' ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος, το οποίο φωτομετρείται στα 725nm. Το Na_2CO_3

χρησιμοποιείται στη μέθοδο έτσι ώστε να ρυθμίσει την αλκαλικότητα (*Singleton and Rossi, 1965*).

Με τη χρωματομετρική και οξειδοαναγωγική αντίδραση Folin-Ciocalteu πραγματοποιείται προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, χωρίς το διαχωρισμό μεταξύ των μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι μείγμα μολυβδαινικού νατρίου Na_2MoO_4, βολφραμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέως (H_3PO_4), όπου προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης F.C. με τα φαινολικά συστατικά είναι ένα σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφαιρμίου (Mo-W) χαρακτηριστικού μπλε χρώματος (*Κόλτζαλη, 2006*).

2.3.2 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε αρωματικά φυτά και φύλλων καρποφόρων δέντρων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αρωματικών φυτών είναι η μέθοδος DPPH (1,2 διφαινύλο-2-πικρυλυδραζύλιο) η οποία αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (*Atoui et al, 2005, Exarchou et al , 2002, Parejo et al, 2002, Armata et al, 2008, Atmani et al, 2009, Molan et al, 2009, Kouri et al, 2006, Koler et ala, 2003, Tsaknis & Lala, 2005*), η μέθοδος Rancimat test (*Exarchou et al, 2002, Lorena et al, 2002, Tsaknis& Lala, 2005*), η μέθοδος ORAC , Oxygen Radical Absorbance Capacity (*Wei Zneng, 2001*), η μέθοδος phospatidyleholine liposome oxidation (*Exarchou, 2002*), η μέθοδος hydroxyl radical scavenging activity (*Parejo, 2002*), η μέθοδος syperoxide radical scavenging (*Parejo et al, 2002*), η μέθοδος Co(II) EDTA- induced luminol cheniluminescence (*Armata et al, 2008*), η μέθοδος β- carotene bleaching (*Koleva et al, 2003*), η μέθοδος static headspace chromatography (HS- GC) (*Koleva et al, 2003*) και η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) (*Exarcou and Gerotanassis, 2006*).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων φύλλων ελιάς είναι η μέθοδος DPPH (1,2 διφαινύλο-2-πικρυλυδραζύλιο) (*Mylonaki et al, 2008, Bouaziz & Sayadi, 2005, Paiva-Martins & Gordon, 2001, Paiva-*

Martins & Pinto, 2008, Ferreira et al, 2007), η μέθοδος ABST.+ (*Benavente- Garcia et al, 2000, Erbay et al, 2009*), η μέθοδος DMPD (*Briante et al, 2002*) και η μέθοδος β-carotene linoleate model systems (*Bouaziz & Sayadi , 2005*).

Μηχανισμός δράσης δέσμευσης ελεύθερων ριζών

Δύο μηχανισμοί αναφέρονται για τη δέσμευση ελεύθερων ριζών φαινολών που βρίσκονται στα φυτά (AH).

$1^{ος}$ μηχανισμός

$$AH + ROO^{\cdot} \longrightarrow A^{\cdot} + ROOH$$

$2^{ος}$ μηχανισμός

$$AH + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROO^{-} \text{---} AH^{\cdot +} \longrightarrow ROOH + A^{\cdot}$$

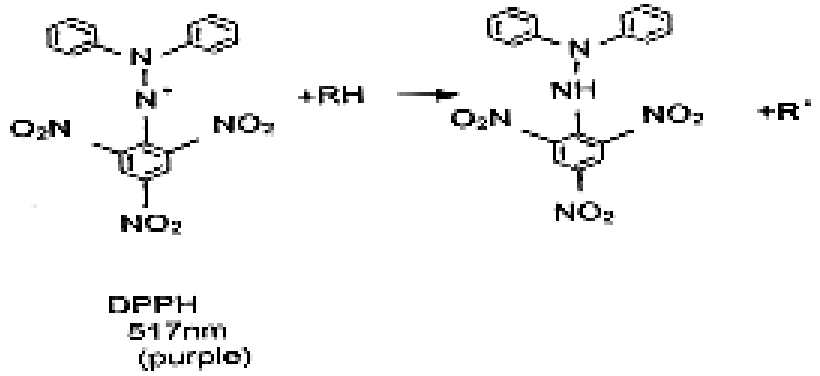
Οι μηχανισμοί αυτοί είναι σημαντικοί για τη δεσμευτική ικανότητα των δραστικών AHs μέσα σε ένα χημικό ή βιολογικό σύστημα. Η πρώτη αντίδραση περιγράφει τη δράση των φαινολών στη διεργασία αυτοοξείδωσης λιπιδίων ενώ ο δεύτερος φαίνεται να κυριαρχεί σε πολικά διαλύματα. Στα πολικά διαλύματα, ένας εσωμοριακός υδρογονικός δεσμός μπορεί να αναπτυχθεί ανάμεσα σε AH και μόριο του διαλύματος, ο οποίος εμποδίζει το άμεσο άτομο H διευκολύνοντας τη διαδικασία, και κατά συνέπεια η αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η υψηλή πολικότητα του διαλύτη (π.χ. νερού) σταθεροποιεί το ιονικό ζευγάρι επομένως, η μεταφορά του ηλεκτρονίου γίνεται το ελεγχόμενο βήμα του δεύτερου μηχανισμού (*Tsimidou et al, 2006*).

Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος DPPH αποτελεί μέθοδο εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στη προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελεύθερων ριζών (*Σωτηρούδης, 2008*).

Το DPPH είναι μια σταθερή οξειδωτική ελεύθερη ρίζα με αζωτούχο κέντρο και διαλυτό στη μεθανόλη. Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι το αντιοξειδωτικό αντιδρά με το DPPH και το μετατρέπει σε 1,1 διφαινυλο-2-πυκροζυναδρίνη (σταθερό προϊόν) (Σχήμα 3.2.2α). Η δράση των αντιοξειδωτικών αποδίδεται στην ικανότητα τους να δίνουν υδρογόνα. Όπως προαναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν αυτοοξειδώσεις

των ακόρεστων λιπών. Από την άλλη πλευρά, τα αντιοξειδωτικά διακόπτουν την αλυσίδα των οξειδώσεων προσφέροντας υδρογόνα από τις ομάδες των φαινολικών υδροξυλίων. Με αυτό το τρόπο, παράγεται ένα σταθερό τελικό προϊόν (1,1 διφαινυλο-2-πυκροζυναδρίνη) που δεν επιτρέπει την περαιτέρω οξείδωση (*Τερμεντζή και Κοκκάλου, 2004*).



Σχήμα 3.2.2α: Αντίδραση DPPH με το αντιοξειδωτικό
(*sites.google.com/site/methods4u/dpphassay*)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}

3.1 Υλικά

3.1.1 Πρώτη ύλη

1. Φύλλα ελιάς μαζεμένα από Τσικαλαριά Σούδας
2. Φύλλα πορτοκαλιάς μαζεμένα από Τσικαλαριά Σούδας
3. Αέριο μέρος καλλιεργήσιμου Φασκόμηλου από παραγωγό νομού Χανίων
4. Αέριο μέρος καλλιεργήσιμου δίκταμου από παραγωγό νομού Χανίων

3.1.2 Συσκευές και σκεύη

5. Φούρνο ξήρανσης με ανεμιστήρα στο εσωτερικό του και θερμοστατικό έλεγχο ώστε η θερμοκρασία λειτουργίας να κυμαίνεται 102± 1°C
6. Ξηραντήρια με P_2O_5
7. Ζυγό ακριβείας
8. Υδατόλουτρο με μηχανισμό ταυτόχρονης ανάδευσης και ελεγχόμενη θερμοκρασία
9. Απλό ψυγείο (για τη συντήρηση των δειγμάτων)
10. 6 φιάλες με βιδωτό πώμα των 100 ml
11. Εκχυλιστική χοάνη και φίλτρα Watman No 1
12. Πλαστικά δοχεία (50 ml) (τοποθέτηση δείγματος)
13. 10 ογκομετρικές φιάλες (10 ml)
14. 10 ογκομετρικές φιάλες (5 ml)
15. Δοκιμαστικοί σωλήνες
16. pipetta (100μl-1000 μl)
17. pipetta (1000μl- 5000 μl)
18. Φασματοφωτόμετρο UV
19. Κυψελίδες πλαστικές (μιας χρήσης)

20. Κυψελίδες γυάλινες (Q,G)
21. Ποτήρια ζέσεως 50 ml
22. Κωνική φιάλη
23. Ογκομετρικοί κύλινδροι
24. Σπάτουλες ανοξείδωτες
25. Μαγνητικός αναδευτήρας
26. Μαγνητάκι
27. Υδροβολέας

3.1.3 Χημικές ουσίες

1. Αντιδραστήριο Folin- Ciocalteau (2 N)
2. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (35 gr Na_2CO_3 /100 ml αποσταγμένου νερού)
3. Διάλυμα καφεϊκού οξέος (Διάλυμα Α:1 g καφεϊκού οξέος / 100 ml μεθανόλης, Διάλυμα Β: 1 ml Διαλύματος Α / 100 ml αποσταγμένου νερού , 100 ppm)
4. Διάλυμα Sodium molybdate dihydrate (5%w/v σε Αιθανόλη 50%)
5. Αιθανόλη/Νερό (1:1)
6. HCl (2%)
7. Aqueous ethanol διάλυμα (Αιθανόλη (95%v/v) με 0,1% HCl)
8. Αιθανόλη (95%v/v)
9. Διάλυμα γαλλικού οξέως (Διάλυμα Α:1g γαλλικού οξέος/ 100 ml 10% αιθανόλη, Διάλυμα Β: 1ml Διαλύματος Α / 100 ml 10%Αιθανόλη, 100 ppm)
10. Διάλυμα καφεϊκού οξέος (Διάλυμα Α: 1 g καφεϊκού οξέος/100 ml 10% Αιθανόλη, Διάλυμα Β: 1 ml Διαλύματος Α / 100ml 10%Αιθανόλη, 100ppm)
11. Διάλυμα quercetin (Διάλυμα Α: 1 g quercetin / 100ml 95%Αιθανόλη, Διάλυμα Β: 1ml Διαλύματος Α / 100 ml 95%Αιθανόλη, 100 ppm)
12. Διάλυμα DPPH (32 mg DPPH / 1000 ml 85% Μεθανόλη)

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

1. Πλύσιμο φύλλων με νωπό χαρτί
2. Τεμαχισμός φύλλων σε 5 mm
3. Ξήρανση στους 102 ^{o}C για 3 h
4. Μετά τη ξήρανση, κρύωμα τεμαχισμένων φύλλων 45 λεπτά σε ξηραντήριο

3.2.2 Διαδικασία εκχύλισης

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων- φύλλων σε EtOH εντός γυάλινων φιαλιδίων (ανάλογα με το πείραμα η αναλογία δείγματος διαλύτη κυμαίνονταν από 20 g/l-80 g/l και σε περιεκτικότητες EtOH από 25%-100%)
2. Στη συνέχεια τοποθέτηση δειγμάτων-φύλλων σε υδατόλουτρο σε διάφορες θερμοκρασίες ανάλογα με το πείραμα (25, 40, 60 ^{o}C)
3. Μετά το πέρας των ωρών που απαιτείται ανάλογα με το πείραμα (1, 2, 4,6 h) πραγματοποιείται φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο Whatman No 1
4. Τοποθέτηση διαλύματος σε πλαστικά δοχεία για περαιτέρω ανάλυση
5. Ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε δείγμα είναι 3 φορές.

Πίνακας 3.2.2: Συνθήκες εκχύλισης για κάθε είδος πειράματος

Είδος Πειράματος	**Θερμοκρασία (^{o}C)**	**Χρόνος Εκχύλισης (h)**	**Αναλογία δείγματος/ διαλύτη**	**Περιεκτικότητα Αιθανόλη / νερό**
Θερμοκρασία	25 – 60	2	40 gr/l	70%
Χρόνος εκχύλισης	40	1-8	40 gr/l	70%
Αναλογία	40	2	20 gr/l – 80 gr/l	70%
Περιεκτικότητα	40	2	40 gr/l	25- 100%

3.2.3 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

Για το προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Folin- Ciocalteau και ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Τοποθέτηση σε φιάλη (25 ml) 5 ml δείγματος και 0,25 ml του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau (2 N) και ανάδευση για ακριβώς 3 min
2. Προσθήκη 1 ml Na_2CO_3, 35% w/v
3. Συμπληρώνεται η φιάλη με αποσταγμένο νερό
4. Τοποθέτηση φιάλης στο σκοτάδι για 1 h
5. Μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στους στα 725 nm
6. Για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείται blank sample, στο οποίο ακολουθούνται τα ίδια βήματα 1-5 με τη διαφορά ότι, αντί για το δείγμα προστίθεται αποσταγμένο νερό
7. Προετοιμασία καμπυλών αναφοράς. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέως και γαλλικού οξέως. Η τελική συγκέντρωση υπολογίζεται μέσω καμπύλης αναφοράς.
8. Ο προσδιορισμός για κάθε τριπλό δείγμα έγινε επί δύο

3.2.4 Προσδιορισμός διαφόρων φαινολικών τάξεων

Με τη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω υπολογίζονται οι ολικές φαινόλες, τα υδροξύκινναμικά οξέα και οι φλαβονόλες. Οι διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Ανάδευση 1 ml δείγματος με 1 ml aqueous ethanol διαλύματος σε φιάλη των 10 ml
2. Συμπλήρωμα της φιάλης μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ (2%v/v)
3. Μετά το πέρας 15 min, μέτρηση απορρόφησης στα 280 nm, 320 nm, 360 nm, 520 nm
4. Παρασκευή blank δείγματος ανακατεύοντας 1 ml αποσταγμένου νερού με 1 ml aqueous ethanol διαλύματος

5. Δημιουργία καμπύλης αναφοράς με χρήση καφεϊκού οξέος, quercetin και γαλλικού οξέος
6. Ο προσδιορισμός για κάθε τριπλό δείγμα έγινε επί δύο

3.2.5 Προσδιορισμός ο-διφαινόλων

Για το προσδιορισμό των ο-διφαινόλων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθήκη 1 ml δείγματος και 1 ml sodium molybdate dehydrate διαλύματος σε φιάλη των 10 ml
2. Μετά από ανάδευση, η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη/ water (1:1)
3. Μέτρηση απορρόφησης στα 370 nm
4. Προετοιμασία blank δείγματος, 1 ml αποσταγμένου νερού και sodium molybdate dehydrate διαλύματος και συμπλήρωση φιάλης με EtOH/ water (1:1)
5. Δημιουργία καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέως
6. Ο προσδιορισμός για κάθε τριπλό δείγμα έγινε επί δύο

3.2.6 Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων δειγμάτων

Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Η πορεία της μεθόδου που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αραιώσεις δειγμάτων σε φιάλη των 10 ml
2. Τοποθέτηση 100 μl δείγματος με 1,5 ml aqueous methanolic solution (82%) of DPPH radical σε πλαστικές κυψελίδες (2 ml)
3. Τοποθέτηση στο σκοτάδι για 1 h και μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm
4. Χρήση ως control (Acontrol) την απορρόφηση της DPPH ρίζας χωρίς το δείγμα.
5. Το ποσοστό της δέσμευσης της DPPH ρίζας υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\%scavenging = 100* (A_{control} - A_{sample})/A_{control}$$

6. Μηδενισμός φασματοφωτόμετρου με μεθανόλη
7. Ο προσδιορισμός για κάθε τριπλό δείγμα έγινε επί δύο

3.2.7 Έκφραση αποτελεσμάτων

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο κάθε εκφράζεται ως mg γαλλικού οξέως/ g ξηρού δείγματος. Η αντιοξειδωτική δράση του αντιοξειδωτικού (φαινόλες) (Antiradical Efficincy, AE) υπολογίζεται ως 1/ EC_{50} (mg DPPH/ g). Το ποσοστό της δέσμευσης της DPPH ρίζας (% scavenging) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας. Επομένως, η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, που προκαλεί μείωση στην αρχική συγκέντρωση του DPPH κατά 50%, ορίζεται EC_{50}. (Huang et al, 2005). Επίσης, οι ο-διφαινόλες εκφράζονται ως mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού δείγματος, τα υδροξυκινναμικά οξέα ως mg καφεϊκού οξέος/ g ξηρού δείγματος και τα φλαβονοειδή ως mg quercetin / g ξηρού δείγματος.

Οι «στατιστικές διαφορές» ανάμεσα στις τιμές των αποτελεσμάτων, για κάθε παράγοντα εκχύλισης που εξετάσθηκε, ορίσθηκαν για $P \leq 0,05$.

3.3 Εφαρμογή μοντέλου Unifac

Με μοντέλο Unifac συγκρίθηκε η ικανότητα διάφορων διαλυτών να διαλύουν διάφορες φαινολικές ουσίες και αν η αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στην εκχύλιση, αποτελεί «καλός» διαλύτης. Συγκεκριμένα, η αιθανόλη συγκρίθηκε με τους εξής διαλύτες:

1. νερό
2. μεθανόλη
3. ακετόνη
4. διχλωρομεθάνιο

5. αιθυλ-ακετόνη
6. διαιθυλ-αιθέρας

Οι φαινόλες, οι οποίες αποτέλεσαν τις διαλυθέντες ουσίες, είναι αυτές οι οποίες βρίσκονται στα φυτά που μελετά η συγκεκριμένη μελέτη, δηλαδή φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς, δίκταμο και φασκόμηλο και αναφέρονται στη βιβλιογραφία (*Atou et al, 2004, Floch et al, 1997, Swatsing et al, 2000, Μπαλαμώτη, 2004*).

Συγκεκριμένα, οι φαινόλες οι οποίες εξετάσθηκαν και εισαχθήκανε στο μοντέλο είναι:

1. ο- κουμαρικό
2. p-κουμαρικό
3. καφεϊκό οξύ
4. βαννιλικό οξύ
5. φερουλικό οξύ
6. κινναμικό
7. π-ΟΗ- φαινυλοξικό οξύ
8. π-ΟΗ- βενζοϊκό οξύ
9. τυροσόλη
10. πρωτοκατεχικό
11. ΟΗ- τυροσόλη
12. σιναπικό οξύ
13. συρινγκικό οξύ
14. ροσμαρινικό οξύ
15. ελαιοευρωπεΐνη

Επομένως, με τη βοήθεια του μοντέλου, εξετάστηκε κάθε φαινόλη χωριστά και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, σε ποιο διαλύτη «προτιμά» να μεταφερθεί. Το Unifac, όπως έχει προαναφερθεί, υπολογίζει τους συντελεστές ενεργότητας διαλυτών για κάθε φαινόλη. Όσο μικρότερος είναι ο συντελεστής ενεργότητας τόσο καλύτερος διαλύτης είναι για τη συγκεκριμένη ουσία.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι για την εισαγωγή της ελαιοευρωπαΐνης στο μοντέλο Unifac, προστέθηκαν σε αυτό τα R_k και Q_k της μαλτόζης (10,7985 και

8,752 αντίστοιχα) από τη βιβλιογραφία (*Cooke et al, 2001*). Μέρος του μορίου της ολευρωπαΐνης προσεγγίστηκε με το μόριο της μαλτόζης (Εικόνα 3.3α).

Name:	sinapic acid				r:	7,3191	q:	5,78	l:	1,3764
	Sub group:	ACH	ACOH	AC	CH3O	ACCH2	COOH			
	No of subgr:	2	1	2	2	1	1			
		10	18	11	25	13	43	-1	-1	-1
Name:	dichloromethane				r:	2,2564	q:	1,988	l:	0,0856
	Sub group:	CH2Cl2								
	No of subgr:	1								
		48	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	ethyl-acetate				r:	3,4786	q:	3,116	l:	-0,6656
	Sub group:	CH3COO	CH2	CH3						
	No of subgr:	1	1	1						
		22	2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	hexane				r:	4,4998	q:	3,856	l:	-0,2808
	Sub group:	CH3	CH2							
	No of subgr:	2	4							
		1	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	diethyl- ether				r:	3,3949	q:	3,016	l:	-0,5004
	Sub group:	CH3	CH2O	CH2						
	No of subgr:	2	1	1						
		1	26	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:	oleuropein				r:	17,5864	q:	13,932	l:	1,6856
	Sub group:	ACH	ACOH	ACCH2	CH2O	CH2CO	Mlt			
	No of subgr:	3	2	1	1	1	1			
		10	18	13	26	20	92	-1	-1	-1
Name:	rosmarinic acid				r:	11,6892	q:	8,744	l:	4,0368
	Sub group:	ACH	ACOH	ACCH	ACCH2	CH	HCOO	COO		
	No of subgr:	6	4	1	1	1	1	1		
		10	18	14	13	3	24	77	-1	-1
Name:					r:	0	q:	0	l:	1
	Sub group:									
	No of subgr:									
		-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Name:					r:	0	q:	0	l:	1
	Sub group:									
	No of subgr:									

xlUNIFAC / Introduction / Calculation \ **Define Component** / Table Rk, Qk / Table Interaction / Calc Combinatorial Part / Calc Residual Part

Εικόνα3.3α: Εισαγωγή ελαιοευρωπεΐνης στο μοντέλο Unifac

Πίνακας 3.3: Κυριότερες φαινόλες φασκόμηλου, δίκταμου, φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς που εισαχθήκανε στο Unifac

Φυτό / Φαινόλες	**Φασκόμηλο**	**Δίκταμος**	**Φύλλα ελιάς**	**Φύλλα πορτοκαλιάς**
ο- κουμαρικό	✓	✓		
p-κουμαρικό	✓	✓		✓
βαννιλικό οξύ	✓		✓	
φερουλικό οξύ	✓	✓		✓
κινναμικό	✓	✓	✓	
τυροσόλη	✓		✓	
π-OH-βενζοϊκό οξύ	✓	✓	✓	
π-OH- φαινυλοξικό οξύ	✓			
πρωτοκατεχικό	✓		✓	
OH- τυροσόλη			✓	
καφεϊκό οξύ	✓	✓	✓	✓
γαλλικό οξύ		✓		
σιναπικό οξύ				✓
συρινγκικό οξύ			✓	
ροσμαρινικό οξύ	✓			
ελαιοευρωπεΐνης			✓	
Αναφορά	*Atou et al, 2004*	*Μπαλαμώτη, 2004*	*Floch et al, 1997*	*Swatsing et al, 2000*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{ο}

4.1 Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου Unifac

4.1.1 Υπολογισμός συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για κάθε φαινόλη

Η εφαρμογή του μοντέλου Unifac δίνει τη δυνατότητα του υπολογισμού των συντελεστών ενεργότητας των διαλυτών για διάφορες φαινόλες. Στη συγκεκριμένη εργασία, ο υπολογισμός αυτός βοηθάει στη σύγκριση μεταξύ αιθανόλης και άλλων διαλυτών σχετικά με την ικανότητα τους να διαλύουν συγκεκριμένες φαινόλες στις θερμοκρασίες εκχύλισης 25 ^{o}C, 40 ^{o}C και 60 ^{o}C, δηλαδή οι τρεις θερμοκρασίες που εξετάσθηκαν κατά το πειραματικό μέρος (Πίνακας 4.2.1α, 4.2.1β, 4.2.1γ).

Συγκεκριμένα, συμπεραίνεται ότι σε θερμοκρασία 25 ^{o}C οι φαινόλες, καφεϊκό οξύ, OH- τυροσόλη, p-OH- φαινιλακετονικό οξύ, p-OH-βενζοϊκό οξύ, τυροσόλη, πρωτοκατεχικό οξύ, ελαιοευρωπαΐνη και ροσμαρινικό οξύ, προτιμούν να «μετακινηθούν» στην αιθανόλη (μικρότερος συντελεστής ενεργότητας),οι φαινόλες, βαννιλικό οξύ, φελουρικό οξύ, σιναπικό οξύ και συρινγκικό οξύ στη μεθανόλη ενώ το γαλλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το κινναμικό οξύ στο νερό, την ακετόνη και διχλωρομεθανόλη αντίστοιχα (Πίνακας 4.2.1α).

Επιπλέον, σε θερμοκρασία 40 ^{o}C, η μοναδική διαφορά, στη προτίμηση των φαινολών στους συγκεκριμένους διαλύτες παρατηρείται στο γαλλικό οξύ, το οποίο σε αυτή τη θερμοκρασία προτιμά την αιθανόλη (Πίνακας 4.2.1β). Το ίδιο συμβαίνει και στους 60° C, με τη διαφορά ότι το γαλλικό οξύ προτιμά τη μεθανόλη (Πίνακας 4.2.1γ).

Πίνακας4.1.1α:Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών για φαινόλες που βρίσκονται σε φυτά σε θερμοκρασία 25° C

Φαινόλες	**Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών**						
	Νερό	Αιθανόλη	Μεθανόλη	Ακετόνη	διχλωρομεθάνιο	ethylacetate	diethyl ester
ο- κουμαρικό οξύ	1,71E+01	1,38E-01	1,50E-01	**1,29E-01***	4,90E-01	2,39E-01	3,62E+00
p- κουμαρικό οξύ	1,71E+01	1,38E-01	1,50E-01	**1,29E-01***	4,90E-01	2,39E-01	3,62E+00
βαννιλικό οξύ	2,79E+00	2,76E-01	**1,88E-01***	3,22E-01	9,73E-01	6,42E-01	1,52E+01
καφεϊκό οξύ	1,90E-01	**8,44E-03***	2,90E-02	2,56E-02	4,55E-01	5,46E-02	9,45E+00
φελουρικό οξύ	1,27E+00	2,65E-01	**1,40E-01***	1,81E-01	4,27E-01	3,49E-01	8,20E+00
OH- τυροσόλη	9,12E-01	**2,73E-02***	2,03E-01	2,33E-01	4,77E+00	3,72E-01	8,03E+01
σιναπικό οξύ	4,29E+00	3,17E-01	**1,04E-01***	2,54E-01	4,19E-01	5,09E-01	1,85E+01
κινναμικό οξύ	2,02E+03	2,87E+00	1,11E+00	8,26E-01	**6,68E-01***	1,33E+00	1,76E+00
p-OH- φαινιλακετονικό οξύ	8,84E+00	**9,77E-02***	1,54E-01	1,48E-01	6,34E-01	2,74E-01	4,15E+00
p-OH-βενζοϊκό οξύ	3,52E+00	**1,35E-01***	2,01E-01	2,16E-01	1,05E+00	4,14E-01	6,34E+00
τυροσόλη	5,01E+00	**2,69E-01***	6,73E-01	7,11E-01	3,22E+00	9,89E-01	1,88E+01
πρωτοκατεχικό οξύ	4,74E+00	**1,01E-02***	4,48E-02	5,22E-02	1,19E+00	1,15E-01	2,01E+00
συρινγκικό οξύ	1,90E+00	4,87E-01	**1,51E-01***	4,13E-01	7,74E-01	8,57E-01	3,15E+01
γαλλικό οξύ	**7,48E-04***	8,67E-04	1,13E-02	1,43E-02	1,52E+00	3,64E-02	7,23E+01
ροσμαρινικό οξύ	3,86E-02	**8,36E-04***	1,60E-02	1,52E-03	3,58E-02	3,39E-03	1,42E+02
ελαιοευρωπεΐνη	1,03E+00	**3,25E-05***	7,36E-04	3,55E-04	6,48E-03	1,46E-03	5,14E-01

* Οι μικρότερες τιμές των συντελεστών ενεργότητας του διαλύτη κάθε φαινόλης

Πίνακας 4.1.1β:Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών για φαινόλες που βρίσκονται σε φυτά σε θερμοκρασία 40°

Φαινόλες	**Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών**						
	Νερό	Αιθανόλη	Μεθανόλη	Ακετόνη	διχλωρομεθάνιο	ethylacetate	diethyl ester
ο- κουμαρικό οξύ	2,30E+01	1,72E-01	1,85E-01	**1,29E-01***	4,82E-01	2,85E+00	3,65E+00
p- κουμαρικό οξύ	2,30E+01	1,72E-01	1,85E-01	**1,29E-01***	4,82E-01	2,85E+00	3,65E+00
βαννιλικό οξύ	4,23E+00	3,28E-01	**2,12E-01***	3,67E-01	9,32E-01	7,48E-01	1,45E+01
καφεϊκό οξύ	4,01E-01	**1,35E-02***	3,67E-02	3,46E-02	4,43E-01	7,71E-02	9,45E+00
φελουρικό οξύ	1,81E+01	3,13E-01	**1,60E-01***	2,07E-01	4,15E-01	4,12E-01	7,89E+00
OH- τυροσόλη	1,75E+00	**3,95E-02***	2,14E-01	2,61E-01	4,03E+00	4,59E-01	6,73E+01
σιναπικό οξύ	6,75E+00	3,63E-01	**1,16E-01***	2,85E-01	4,04E-01	6,10E-01	1,71E+01
κινναμικό οξύ	1,72E+03	2,79E+00	1,19E+00	8,46E-01	**6,63E-01***	1,33E+00	1,79E+00
p-OH- φαινιλακετονικό οξύ	1,24E+01	**1,25E-01***	1,78E-01	1,75E-01	6,22E-01	3,32E-01	4,18E+00
p-OH- φαινιλακετονικό οξύ	1,24E+01	**1,25E-01***	1,78E-01	1,75E-01	6,22E-01	3,32E-01	4,18E+00
p-OH-βενζοϊκό οξύ	5,05E+00	**1,70E-01***	2,36E-01	2,54E-01	1,02E+00	4,88E-01	6,32E+00
τυροσόλη	6,28E+01	**3,11E-01***	6,70E-01	7,09E-01	2,79E+00	1,05E+00	1,62E+01
πρωτοκατεχικό οξύ	1,06E-01	**1,62E-02***	5,58E-02	7,02E-02	1,14E+00	1,60E-01	1,98E+01
συρινγκικό οξύ	3,06E+00	5,49E-01	**1,67E-01***	4,59E-01	7,37E-01	9,92E-01	2,87E+01
γαλλικό οξύ	2,61E-03	**1,78E-03***	1,52E-02	2,21E-02	1,44E+00	5,98E-02	7,02E+01
ροσμαρινικό οξύ	1,61E-01	**1,75E-04***	1,83E-02	2,30E-02	3,54E-02	6,66E-03	1,25E+02
ελαιοευρωπεΐνη	2,25E+00	**5,29E-05***	8,26E-04	4,79E-04	7,02E-03	2,33E-03	5,28E-01

*Οι μικρότερες τιμές των συντελεστών ενεργότητας του διαλύτη κάθε φαινόλης

Πίνακας 4.1.1γ:Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών για φαινόλες που βρίσκονται σε φυτά σε θερμοκρασία 60°

Φαινόλες	**Συντελεστές ενεργότητας διαλυτών**						
	Νερό	Αιθανόλη	Μεθανόλη	Ακετόνη	διχλωρομεθάνιο	ethylacetate	diethyl ester
ο- κουμαρικό οξύ	3,09E+01	2,19E-01	2,21E-01	**1,82E-01***	4,72E-01	3,43E-01	3,64E+00
p- κουμαρικό οξύ	3,09E+01	2,19E-01	2,21E-01	**1,82E-01***	4,72E-01	3,43E-01	3,64E+00
βαννιλικό οξύ	6,52E+00	3,95E-01	**2,44E-01***	4,23E-01	8,87E-01	8,76E-01	1,35E+01
καφεϊκό οξύ	8,73E-01	**2,28E-02***	4,80E-02	4,84E-02	4,30E-01	1,12E-01	9,29E+00
φελουρικό οξύ	2,57E+01	3,73E-01	**1,86E-01***	2,40E-01	4,02E-01	4,90E-01	7,46E+00
OH- τυροσόλη	3,43E+00	**5,94E-02***	2,25E-01	2,94E-01	3,30E+00	5,69E-01	5,43E+01
σιναπικό οξύ	1,09E+01	4,18E-01	**1,32E-01***	3,23E-01	3,88E-01	7,39E-01	1,54E+01
κινναμικό οξύ	1,41E+03	2,69E+00	1,29E+00	8,57E-01	**6,56E-01***	1,33E+00	1,81E+00
p-OH- φαινιλακετονικό οξύ	1,77E+01	**1,63E-01***	2,12E-01	2,11E-01	6,08E-01	4,10E-01	4,16E+00
p-OH-βενζοϊκό οξύ	7,36E+00	**2,19E-01***	2,75E-01	3,04E-01	9,87E-01	5,80E-01	6,22E+00
τυροσόλη	7,79E+01	**3,64E-01***	6,62E-01	7,02E-01	2,36E+00	1,11E+00	1,37E+01
πρωτοκατεχικό οξύ	2,50E-01	**2,74E-02***	7,18E-02	9,72E-02	1,08E+00	2,28E-01	1,91E+01
συρινγκικό οξύ	5,03E+00	6,21E-01	**1,89E-01***	5,14E-01	6,96E-01	1,15E+00	2,54E+01
γαλλικό οξύ	9,85E-03	3,94E-03	**2,14E-03***	3,55E-02	1,35E+00	1,02E-01	6,66E+01
ροσμαρινικό οξύ	7,13E-01	**3,90E-03***	2,12E-02	3,64E-03	3,42E-02	1,38E-02	1,07E+02
ελαιοευρωπεΐνη	5,11E+00	**9,20E-05***	9,39E-04	6,76E-04	7,60E-03	3,91E-03	5,41E-01

*Οι μικρότερες τιμές των συντελεστών ενεργότητας του διαλύτη κάθε φαινόλης

4.1.2 Σύγκριση συντελεστών ενεργότητας διαλυτών για κάθε εξεταζόμενο φυτό

Στη προηγούμενη παράγραφο, εξετάσθηκε το σύνολο των φαινολών που κυριαρχούν στα 4 φυτικά υποστρώματα, φύλλα ελιάς, φύλλα πορτοκαλιάς, φασκόμηλο και δίκταμο. Όμως, σε κάθε φυτό κυριαρχούν μερικές από τις παραπάνω φαινόλες. Επομένως, στα Διαγράμματα 4.1.2α, 4.1.2β 4.1.2γ παρουσιάζονται οι συντελεστές ενεργότητας των κυριότερων διαλυτών (αιθανόλη, μεθανόλη, νερό) για τις φαινόλες κάθε φυτού, με σκοπό το προσδιορισμό του «καλύτερου» διαλύτη για κάθε φυτικό υπόστρωμα. Συγκεκριμένα, τα διαγράμματα εκφράζονται ως ο αρνητικός λογάριθμος των συντελεστών ενεργότητας κάθε διαλύτη ανά φαινόλη, έτσι ώστε να είναι περισσότερο κατανοητά.

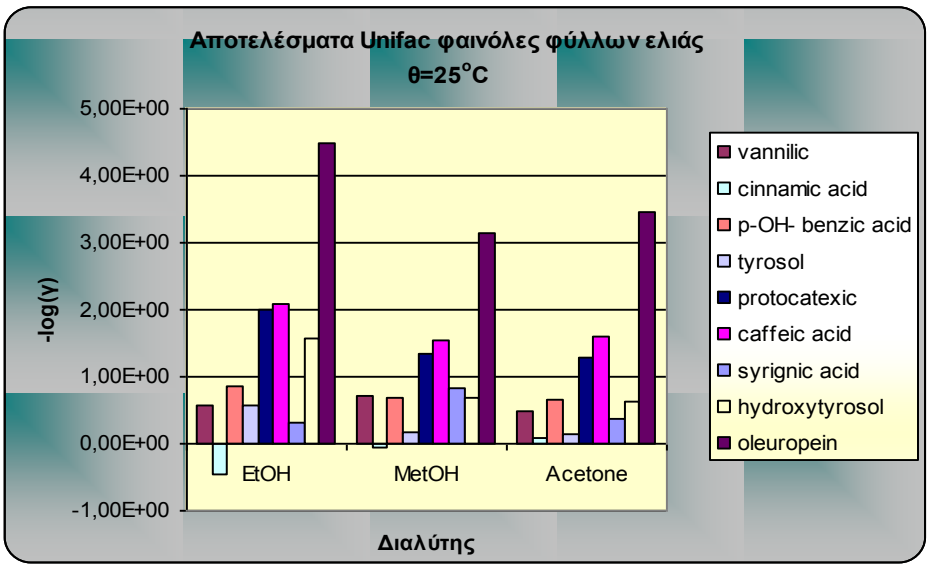
Το Διάγραμμα 4.1.2α δείχνει ότι από τις 9 φαινόλες που κυριαρχούν τα φύλλα ελιάς, το βαννιλικό και συρινγκικό οξύ προτιμούν τη μεθανόλη, το κινναμικό την ακετόνη και οι υπόλοιπες 6 φαινόλες την αιθανόλη, για θερμοκρασία 25 ^{o}C. Την ίδια ακριβώς εικόνα έχουμε και στις υπόλοιπες θερμοκρασίες αφού, όπως προαναφέρθηκε, διαφορές στο διαλύτη υπήρχαν μόνο για το γαλλικό οξύ, το οποίο δεν είναι από τις ουσίες που κυριαρχούν στα φύλλα ελιάς.

Αντίστοιχα, στα φύλλα πορτοκαλιάς, το φελουρικό και σιναπικό οξύ διαλύονται καλύτερα τη μεθανόλη, το καφεϊκό οξύ στην αιθανόλη και το κουμαρικό στην ακετόνη σε θερμοκρασία 25 ^{o}C (Διάγραμμα 4.1.2β) αλλά και στις υπόλοιπες.

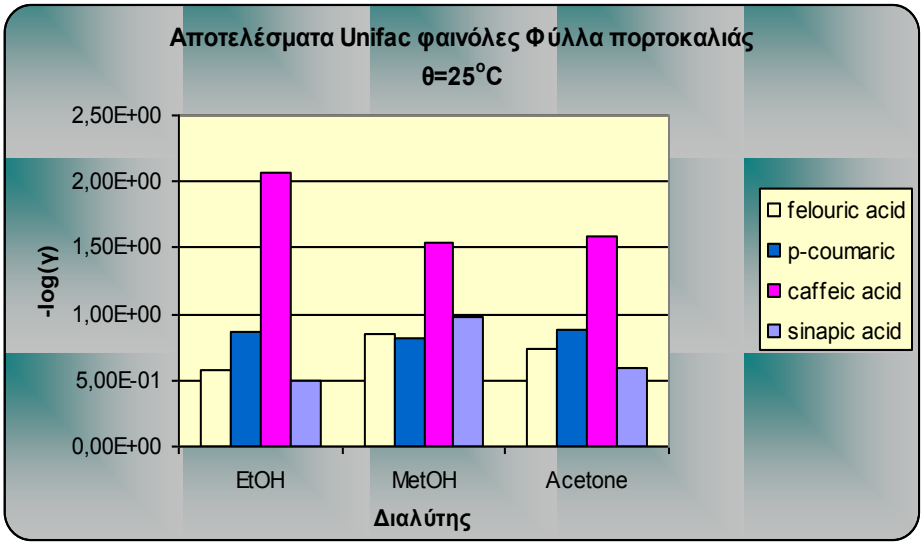
Στο Διάγραμμα 4.1.2γ παρατηρείται ότι από τις 11 κυριότερες φαινόλες που βρίσκονται στο φασκόμηλο οι δύο φαινόλες (φελουρικό οξύ και βαννιλικό οξύ) προτιμούν τη μεθανόλη, άλλες δύο την ακετόνη (ο- και p- κουμαρικό οξύ) και οι υπόλοιπες την αιθανόλη σε θερμοκρασία 25 ^{o}C. Όπως στα φύλλα ελιάς, έτσι και στο φασκόμηλο το γαλλικό οξύ δεν αποτελεί μια από τις κυριότερες του φαινόλες, επομένως δεν υπάρχουν διαφορές τους διαλύτες στις υπόλοιπες θερμοκρασίες.

Τέλος, σύμφωνα με το Διάγραμμα 4.1.2δ, στο δίκταμο, εξαιτίας της παρουσίας του γαλλικού οξέως, παρατηρούνται διαφορές ανάλογα με τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία 25 ^{o}C και 40 ^{o}C, από τις 7 κύριες φαινόλες του δίκταμου, μία φαινόλη (φελουρικό οξύ) προτιμούν τη μεθανόλη, τρεις φαινόλες (ο-και p-κουμαρικό οξύ και κινναμικό) την ακενόνη και οι υπόλοιπες τρεις την αιθανόλη. Σε θερμοκρασία 60 ^{o}C, 2

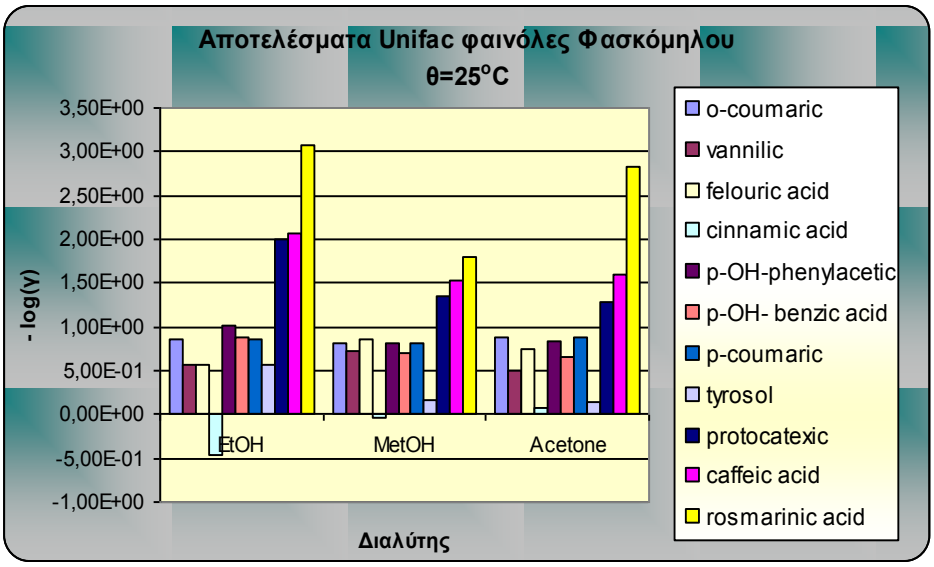
φαινόλες διαλύονται καλύτερα στη μεθανόλη (φελουρικό οξύ και γαλλικό οξύ), 3 φαινόλες στην ακετόνη και δύο στην αιθανόλη.



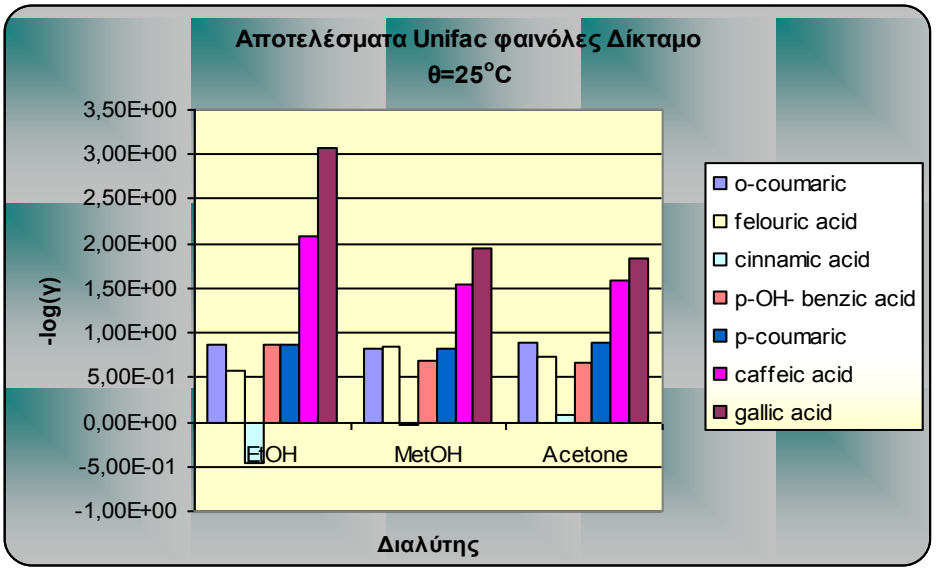
Διάγραμμα 4.1.2α:Αρνητικός λογάριθμος συντελεστή ενεργότητας διαλύτη φαινολών φύλλων ελιάς για θερμοκρασία 25 ^{o}C



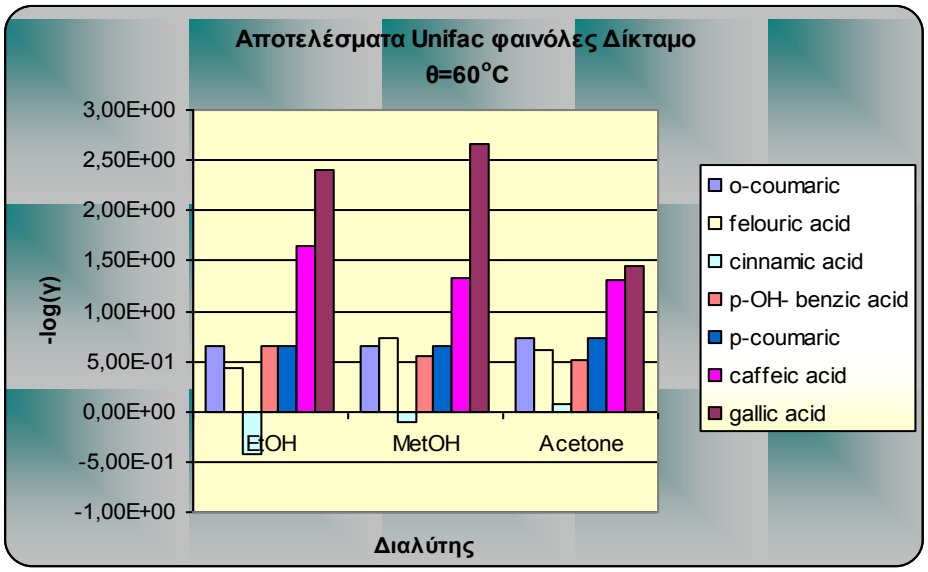
Διάγραμμα 4.1.2β:Αρνητικός λογάριθμος συντελεστή ενεργότητας διαλύτη φαινολών φύλλων πορτοκαλιάς για θερμοκρασία 25 ^{o}C



Διάγραμμα 4.1.2γ:Αρνητικός λογάριθμος συντελεστή ενεργότητας διαλύτη φαινολών του φασκόμηλου για θερμοκρασία 25 ^{o}C



Διάγραμμα 4.1.2δ:Αρνητικός λογάριθμος συντελεστή ενεργότητας διαλύτη φαινολών του δίκταμου για θερμοκρασία 25 ^{o}C



Διάγραμμα 4.1.2δ:Αρνητικός λογάριθμος συντελεστή ενεργότητας διαλύτη φαινολών του δίκταμου για θερμοκρασία 60 ^{o}C

4.2 Αποτελέσματα πειραματικού μέρους

4.2.1 Παρατηρήσεις εκχυλισμάτων των δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη, τα δείγματα- φυτικά υποστρώματα προετοιμάστηκαν και εκχυλίστηκαν με το τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.1 και 3.2.2 αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα από τα 4 διαφορετικά φυτά είχαν διαφορετικά χρώματα. Τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς και φασκομηλιάς είχαν σκούρο λαδί χρώμα (διαφορετικής έντασης ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης). Από την άλλη μεριά, τα εκχυλίσματα φύλλων πορτοκαλιάς και του δίκταμου είχαν ξανθό χρώμα (διαφορετικής έντασης ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης).

4.2.2 Αποτελέσματα μεθόδων προσδιορισμού

Όπως προαναφέρθηκε, στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίστηκαν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των επιλεγμένων φυτών σε διάφορες συνθήκες εκχύλισης. Επιπλέον, στις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός

υποκατηγοριών των φαινολών των φυτών, ο-διφαινόλες, υδροξυκινναμικά οξέα και φλαβονοειδή.

Το πρώτο συμπέρασμα, που προέκυψε από τα αποτελέσματα, είναι ότι τα εκχυλίσματα του φασκόμηλου παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης ολικών φαινολών αλλά και αντιοξειδωτικής δράσης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα φυτά. Επίσης, τα φύλλα ελιάς και το δίκταμο παρουσιάζουν ίδιες περίπου συγκεντρώσεις φαινολών και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ οι φαινόλες των εκχυλισμάτων των φύλλων πορτοκαλιάς κυμαίνονται μια τάξη μεγέθους κάτω.

Φύλλα ελιάς

Τα φύλλα ελιάς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 4.2.2α), είχαν περίπου ίδιες συγκεντρώσεις υδροξυκινναμικών οξέων και φλαβονολών, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονταν οι ο-διφαινόλες. Οι άριστες συνθήκες εκχύλισης για τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης φαινολών και τη μέγιστη αντιοξειδωτική δράση για τα φύλλα ελιάς, σύμφωνα με τον ίδιο Πίνακα, είναι η εκχύλιση να πραγματοποιηθεί στους 60 ^{o}C, περιεκτικότητα αιθανόλης/ νερού 70%, αναλογία ξηρού δείγματος/διαλύτη 20 g/l για τις ολικές φαινόλες αλλά 40 g/l για μέγιστες συγκεντρώσεις φλαβονολών, ο-διφαινολών και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση, και χρόνο εκχύλισης 4 h, έχοντας μέγιστη αντιοξειδωτική δράση.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το Πίνακα 4.2.2α, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), υδροξυκινναμικών οξέων και των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) στις διάφορες θερμοκρασίες (25 ^{o}C, 40 ^{o}C και 60 ^{o}C) κυμάνθηκαν από 20,3-39,1, 4,1-8,7 και 15,4-22,3 mg/g αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς που επεξεργάστηκαν σε θερμοκρασίες 25 ^{o}C και 40 ^{o}C, παρουσίασαν παρόμοιες συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), υδροξυκινναμικών οξέων και ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm). Τα δείγματα φύλλων ελιάς, που εκχυλίσθηκαν σε 60 ^{o}C, παρουσίασαν τιμές ολικών φαινολών και υδροξυκινναμικών οξέων στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές από τις υπόλοιπες. Οι τιμές των ο- διφαινολών και των φλαβονολών κυμάνθηκαν από 7,7 μέχρι 16,0 και 1,4 μέχρι 8,1 mg/g, αντίστοιχα και αυξάνονταν όσο μεγαλύτερη ήταν η θερμοκρασία: 25 ^{o}C < 40 ^{o}C < 60 ^{o}C. Όσο αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι τιμές τους αυξάνονταν όσο αυξάνονταν η θερμοκρασία, από 10,3-19,8 mg/g.

Επίσης, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ο-διφαινολών, ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) και των

φλαβονολών κυμάνθηκαν: 12,5-43,3, 6,1-19,6, 10,4-27,2 και 3,7-9,9 mg/g αντίστοιχα και αυξάνονταν με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης (1<2<4<8 h), με εξαίρεση τις τιμές των φλαβονολών που για χρόνους εκχύλισης 2 και 4 h οι συγκεντρώσεις ήταν παρόμοιες. Την ίδια εικόνα παρουσίασαν οι τιμές που εκφράζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς στις διάφορες θερμοκρασίες (7,9-19,3 mg/g).

Όσο αφορά το πείραμα σχετικά με την εκχύλιση των φύλλων ελιάς σε διαφορετικές αναλογίες διαλύτη /δείγματος, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των φλαβονολών και των αντιοξειδωτικών είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές και κυμάνθηκαν τα 22,3-27,3, 14,7-19,1, 5,3-7,7, 3,8-5,8 και 4,7-13,2 mg/g αντίστοιχα, με μέγιστες τιμές ολικών φαινολών και υδροξυκινναμικών σε αναλογία 40g/l και των φλαβονόλων σε αναλογία 80g/l. Οι τιμές των ο-διφαινολών ήταν παρόμοιες για όλες τίς διαφορετικές αναλογίες (10,1-12,3 mg/g).

Τέλος, οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), οι ο- διφαινόλες, οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), τα υδροξυκινναμικά οξέα και οι τιμές που εκφράζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες παρουσίασαν στατιστικές διαφορές και αυξάνονταν με την αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης 25%<50%<70%, με εξαίρεση των τιμών των δειγμάτων που εκχειλίστηκαν σε 100% αιθανόλης, οι οποίες μειώνονται κατακόρυφα (5,4-22,3, 2,6-10,1, 4,7-14,7 και 1,4-5,3 mg/g αντίστοιχα).Οι τιμές των φλαβονολών κυμάνθηκαν 2,5-5,8 mg/g και ήταν παρόμοιες για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν σε αιθανόλη 25% και 50% καθώς επίσης 50% και 100%. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε αιθανόλη 70% ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές με τις υπόλοιπες.

Φύλλα πορτοκαλιάς

Τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων φύλλων πορτοκαλιάς (Πίνακας 4.2.2β) έδειξαν ότι και οι τρεις υποκατηγορίες φαινολών (ο-διφαινόλες, υδροξυκινναμικά οξέα και φλαβονολών) κυμάνθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα. Τα φύλλα πορτοκαλιάς παρουσίασαν τη μέγιστη απόδοση στους 60 ^{o}C, σε περιεκτικότητα αιθανόλης/ νερού 70%, σε χρόνο εκχύλισης 8 h και αναλογία διαλύτη δείγματος 80 g/l.

Συγκεκριμένα, στα δείγματα φύλλων πορτοκαλιάς, που εκχυλίστηκαν σε θερμοκρασίες 25, 40 και 60 ^{o}C, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ο-διφαινολών, των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) των φλαβονολών καθώς και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές

και αυξάνονταν από τους 25 στους 60 ^{o}C (3,1-12,2, 1,8-11,7, 4,0-17,1, 1,4-7,1, 1,4-8,1 και 0,3-1,2 mg/g αντίστοιχα).

Όσο αφορά τον χρόνο εκχύλισης, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ο-διφαινολών, των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) των φλαβονολών, καθώς και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές (3,3-11,9, 3,1-13,8, 6,5-22,9, 2,7-9,9, 2,9-11,3, 0,3-1,2 mg/g αντίστοιχα) με εξαίρεση τις τιμές τους σε χρόνους εκχύλισης 2 και 4 h, οι οποίες ήταν παρόμοιες.

Στην περίπτωση των δειγμάτων των φύλλων πορτοκαλιάς σε αναλογία αιθανόλης/ ξ.δ. 20 και 80 gr/l, οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) ήταν παρόμοιες (5,6-4,5 mg/g), καθώς επίσης, σε αναλογίες 40 και 80 g/l, οι τιμές των φλαβονόλων δεν είχαν στατιστικές διαφορές (5,6-.4,8 mg/g). Ταυτόχρονα, την ίδια εικόνα παρουσίασαν οι συγκεντρώσεις των ο-διφαινόλων και των αντιοξειδωτικών (σε αναλογία αιθανόλης δείγματος 20 και 40 g/l), με μέγιστη τιμή για τις ο-διφαινόλες σε αναλογία 40 g/l και για τα αντιοξειδωτικά σε 80 g/l. Οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) και των υδροξυκινναμικών οξέων ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές, με μέγιστη τιμές σε αναλογία 40g/l.

Τέλος, για τα εκχυλίσματα φύλλων πορτοκαλιάς περιεκτικότητας αιθανόλης 25, 50, 70 και 100%, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές (3,1-7,2, 0,2- 0,8 mg/g) με μέγιστη τιμή των ολικών φαινολών σε περιεκτικότητα αιθανόλης 70% και των αντιοξειδωτικών σε 50%. Οι συγκεντρώσεις των ο-διφαινολών σε περιεκτικότητες αιθανόλης 50 και 70% καθώς και 50 και 100% (5,3-6,7 και 5,3-4,7 mg/g αντίστοιχα) ήταν παρόμοιες ενώ, οι υπόλοιπες τιμές ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές, με υψηλότερη τιμή σε περιεκτικότητα 70% (6,7 mg/g). Οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονόλων, των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν σε 25 και 50% αιθανόλη καθώς και 25 και 70%, ήταν παρόμοιες.

Φασκόμηλο

Στα εκχυλίσματα του φασκόμηλου, σύμφωνα με τους Πίνακες 4.2.2γ, κυριαρχούν φαινόλες της υποκατηγορίας των ο-διφαινολών και έπειτα των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών. Τα φύλλα της φασκομηλιάς δίνουν καλύτερα αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο των φαινολών στους 40 ^{o}C και 60 ^{o}C ενώ για τις φλαβονόλες, ο-

διφαινόλες και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση στους 60 ^{o}C. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στις τρεις αναλογίες ξηρού δείγματος/διαλύτη είναι το ίδιο, αλλά η αναλογία 80 g/l δίνει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ο καλύτερος χρόνος εκχύλισης για τη φασκομηλιά είναι 8 h και οι περιεκτικότητες αιθανόλης/ νερού 50-70% δίνουν τη μέγιστη απόδοση.

Συγκεκριμένα, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 και 280 nm) των εκχυλισμάτων κυμάνθηκαν από 41,6 μέχρι 67,6 mg/g και 34,0 μέχρι 51,2 mg/g αντίστοιχα. Οι τιμές των ολικών φαινολών αυξάνονταν με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25 στους 40 ^{o}C όμως, για θερμοκρασίες εκχύλισης 40 και 60 ^{o}C, οι τιμές αυτές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές. Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις των ο-διφαινολών, των υδροξυκινναμικών οξέων, των φλαβονόλων και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές και αυξάνονταν με την άνοδο της θερμοκρασίας: 25 < 40 < 60 ^{o}C (26,4-57,2, 18,7-27,9, 15,8 -28,6, και 13,8-24,5 mg/g αντίστοιχα).

Τα δείγματα, τα οποία εκχυλίστηκαν σε χρόνο 2 και 4 h, παρουσίασαν παρόμοιες τιμές ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκε στα 725 nm) και ο-διφαινολών ενώ, τα δείγματα για τους υπόλοιπους χρόνους παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές τιμές. Οι ολικές φαινόλες και ο-διφαινόλες αυξάνονταν με την παράταση του χρόνου εκχύλισης και κυμάνθηκαν από 49,7 μέχρι 73,3 mg/g και 27,5 μέχρι 62,1 mg/g αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των υδροξυκινναμικών οξέων, των φλαβονόλων και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές και ακολουθούσαν την τάση να αυξάνονται όσο παρατείνεται ο χρόνος εκχύλισης: 1<2<4<8 h (35,9- 70,9, 20,1-38,3, 18,4-38,0 και 18,0-30,6 mg/g αντίστοιχα).

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) παρουσίασαν παρόμοιες τιμές για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν σε αναλογία αιθανόλης/ ξ.δ. 20 και 40 g/l (65,2 και 63,3 mg/g) , ενώ οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) ήταν παρόμοιες στα δείγματα που είχαν αναλογία 40 και 80 g/l (48,0 και 48,2mg/g). Οι τιμές των ο-διφαινολών και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές (42,9-51,8 και 5,3-34,5 mg/g), με μέγιστη τιμή σε αναλογία 20 g/l για τις διφαινόλες και σε 80 g/l για τα αντιοξειδωτικά. Οι συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονόλων στα δείγματα όλων των αναλογιών ήταν παρόμοιες.

Τέλος, οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm) και των αντιοξειδωτικών αυξάνονταν όσο μεγαλύτερη ήταν η περιεκτικότητα της αιθανόλης, με εξαίρεση την 100% περιεκτικότητα σε αιθανόλη που παρατηρήθηκε πτώση των τιμών. Οι τιμές των ολικών φαινολών και αντιοξειδωτικών στα δείγματα αυτά ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές και κυμάνθηκαν: 15,8-63,3 και 1,2- 20,4 mg/g αντίστοιχα. Οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) οι ο-διφαινόλες, τα υδροξυκινναμικά οξέα οι φλαβονόλες σε περιεκτικότητες 50 και 70% αιθανόλης είχαν παρόμοιες τιμές ενώ στις υπόλοιπες ακολουθούσαν την ίδια τάση με τα παραπάνω (14,7-48,0, 9,0-43,9, 11,9-26,2, 7,0-24,1 mg/g αντίστοιχα).

Δίκταμος

Στα εκχυλίσματα του δίκταμου, σύμφωνα με τους Πίνακες 4.2.2δ, όπως και του φασκόμηλου κυριαρχούν φαινόλες της υποκατηγορίας των ο- διφαινολών και έπειτα των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών. Όσο αφορά τις άριστες συνθήκες, τα εκχυλίσματα του δίκταμου διάφεραν σημαντικά από τα υπόλοιπα τρία φυτά, αφού η περιεκτικότητα σε αιθανόλη 25-50% αποτελεί την άριστη περιεκτικότητα για τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης φαινολών αλλά και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Επιπλέον, η άριστη θερμοκρασία είναι η ίδια με τα υπόλοιπα φυτά (60 ^{o}C), ο χρόνος εκχύλισης 4 h και η αναλογία ξηρού δείγματος/διαλύτη 80 g/l εξαιτίας της υψηλότερης αντιοξειδωτικής δράσης.

Συγκεκριμένα, οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), οι ο-διφαινόλες και οι τιμές των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές για τα εκχυλίσματα όλων των θερμοκρασιών και κυμάνθηκαν από 20,2 μέχρι 43,9 mg/g, 11,7 μέχρι 32,1 mg/g και 7,5-16,1 mg/g αντίστοιχα, με την άνοδο της θερμοκρασίας. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών ήταν παρόμοιες για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν στους 25 και 40 ^{o}C. Οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών κυμάνθηκαν στα 21,8-38,5, 10,3-19,7 και 7,1-15,7 mg/g αντίστοιχα, με την άνοδο της θερμοκρασίας.

Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) και των φλαβονολών για τα εκχυλίσματα χρόνου εκχύλισης 1 και 2 h ήταν παρόμοιες, καθώς επίσης και για τα εκχυλίσματα χρόνου εκχύλισης 4 και 8h. Οι τιμές τους κυμάνθηκαν: 23,8-36,8, 19,8-

30,3 και 7,2-11,5 mg/g αντίστοιχα. Οι διφαινόλες των δειγμάτων όλων των χρόνων εκχύλισης ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές και κυμάνθηκαν από 8,7 μέχρι 22,4 mg/g. Οι τιμές των υδροξυκινναμικών οξέων και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές, με εξαίρεση τις τιμές των υδροξυκινναμικών για τα δείγματα που εκχυλίστηκαν σε χρόνο 1 και 2 h και τις τιμές των αντιοξειδωτικών σε χρόνο 4 και 8 h. Οι τιμές τους κυμάνθηκαν από 10,4-16,3 και 9-13,9 mg/g αντίστοιχα.

Όσο αφορά τα εκχυλίσματα με διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης/δείγματος, οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725nm) παρουσίασαν παρόμοιες τιμές για τις αναλογίες 20 και 40 g/l και κυμάνθηκαν από 23,1 (80g/l) έως 32 (40g/l) mg/g. Οι συγκεντρώσεις των ο-διφαινολών, των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονόλων ήταν παρόμοιες για όλες τις αναλογίες ξ.δ./διαλύτη. Οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm) και των αντιοξειδωτικών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές για όλες τις αναλογίες με μέγιστες τιμές σε αναλογία 80 g/l (20,7-23,2 και 4,3-14,4 mg/g αντίστοιχα).

Τέλος, οι ολικές φαινόλες (όπως προσδιορίσθηκαν στα 725 nm), των ο-διφαινολών και των αντιοξειδωτικών ήταν παρόμοιες για περιεκτικότητα αιθανόλης 25 και 50% και σε αυτές τις περιεκτικότητες παρουσιάστηκαν οι υψηλότερες τιμές. Οι τιμές τους κυμάνθηκαν από 4,2- 43,8, 2,2-34,3 και 0,7-16,5 mg/g αντίστοιχα. Οι τιμές των ολικών φαινολών (όπως προσδιορίσθηκαν στα 280 nm), των υδροξυκινναμικών οξέων και των φλαβονολών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές, με μέγιστες τιμές την περιεκτικότητα 50% (6,2-31,8, 2,0-21,4 και 1,9-17,2 mg/g αντίστοιχα).

Πίνακας4.2.2α: Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς κάτω από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης

Παράγοντας Εκχύλισης	**Φαινολικό περιεχόμενο***					**Αντιοξειδωτική δράση***
	Total[1] *(725nm)*	*o*-Diphenols[2] (517 nm)	Total [1] (280 nm)	Hydroxycinnamic[2] acids (320 nm)	Flavonols [3] (360 nm)	AE
Θερμοκρασία (^oC)	mg /g					mg DPPH/ g
25	20,3±1,3$^{\alpha}$	7, 7±0,8$^{\alpha}$	15,4±1,9$^{\alpha}$	4,1±1,1$^{\alpha}$	1,4±0,1$^{\alpha}$	10,3±1,2$^{\alpha}$
40	22,3±3,1$^{\alpha}$	10,1 ±1,2$^{\beta}$	14,7±1,8$^{\alpha}$	5,3±0,6$^{\alpha}$	5,8±0,4$^{\beta}$	13,2±1,9$^{\beta}$
60	39,1±1,8$^{\beta}$	16,0±1,1$^{\gamma}$	22,3±3,8$^{\beta}$	8,7±0,4$^{\beta}$	8,1±0,9$^{\gamma}$	19,8±1,6$^{\gamma}$
Χρόνος εκχύλισης (h)	mg/g					mg DPPH/ g
1	12,5±2,0$^{\alpha}$	6,1±0,9α	10,4±1,4$^{\alpha}$	3,7±0,4$^{\alpha}$	2,9±0,5$^{\alpha}$	7,9±0,7$^{\alpha}$
2	22,3±3,0$^{\beta}$	10,1±1,2β	14,7±1,7$^{\beta}$	5,3±0,6$^{\beta}$	5,8±0,4$^{\beta}$	12,9±1,7$^{\beta}$
4	36,3±0,2$^{\gamma}$	15,3±1,8γ	22,2±1,0$^{\gamma}$	7,0±0,3$^{\gamma}$	5,7 ±0,4$^{\beta}$	18,3±1,4$^{\gamma}$
8	43,3±4,4$^{\delta}$	19,6±0,8δ	27,2±0,9$^{\delta}$	9,9±0,5$^{\delta}$	11,3±1,1$^{\gamma}$	19,3±2,3$^{\delta}$
Αναλογία δείγματος/διαλύτη (g/ l)	mg/g					mg DPPH/ g
20	27, 3±1,4$^{\alpha}$	11,8±1,1$^{\alpha}$	19,1±1,4$^{\alpha}$	7,7±0,7$^{\alpha}$	3,8±0,3$^{\alpha}$	4,7±0,1$^{\alpha}$
40	22,3±3,1$^{\beta}$	10,1±1,2$^{\alpha}$	14,7±1,8$^{\beta}$	5,3±0,6$^{\beta}$	5,8±0,4$^{\beta}$	13,2±1,9$^{\beta}$
80	24,2±0,9$^{\gamma}$	12,6±1,6$^{\alpha}$	16,9±0,2$^{\gamma}$	6,2 ±0,1$^{\gamma}$	4,8±0,6$^{\gamma}$	9,7±0,2$^{\gamma}$
Περιεκτικότητα EtOH%	mg/g					mg DPPH/ g
25	6,7±0,6$^{\alpha}$	2,6±0,3$^{\alpha}$	4,7±0,1$^{\alpha}$	1,4±0,0$^{\alpha}$	2,5±0,1$^{\alpha}$	3,5±0,6$^{\alpha}$
50	11,7±0,2$^{\beta}$	5,4±0,4$^{\beta}$	7,8±0,2$^{\beta}$	2,5±0,0$^{\beta}$	3,4±1,2$^{\alpha,\gamma}$	5,3±0,3$^{\beta}$
70	22,3±3,0$^{\gamma}$	10,1±1,2$^{\gamma}$	14,7±1,8$^{\gamma}$	5,3±0,6$^{\gamma}$	5,8±0,4$^{\beta}$	13,2±1,9$^{\gamma}$
100	5,4±0,5$^{\delta}$	2,8±0,4$^{\alpha}$	6,7±0,5$^{\delta}$	2,1±0,3$^{\delta}$	3,8±0,2$^{\gamma}$	1,1±0,3$^{\delta}$

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ±, τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που έχουν το ίδιο ελληνικό γράμμα ως εκθέτη μέσα σε κάθε κουτί κάθε στήλης , δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ($P \leq 0.05$)

[1] Εκφράζονται ως mg γαλλικού οξέος /g ξηρού δείγματος

[2] Εκφράζονται ως mg καφεϊκού οξέος/g ξ.δ.

[3] Εκφράζονται ως mg quercetin/ g ξ.δ.

Πίνακας4.2.2β: Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων πορτοκαλιάς κάτω από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης

Παράγοντας Εκχύλισης	**Φαινολικό περιεχόμενο***					**Αντιοξειδωτική δράση***
	Total (725nm)	*o*-Diphenols (517 nm)	Total (280 nm)	Hydroxycinnamic acids (320 nm)	Flavonols (360 nm)	AE
Θερμοκρασία (^{o}C)	mg /g					mg DPPH/ g
25	3,1±0,1$^{\alpha}$	1,8±0,2$^{\alpha}$	4,0±0,2$^{\alpha}$	1,4±0,1$^{\alpha}$	1,4±0,1$^{\alpha}$	0,3±0,1$^{\alpha}$
40	7,2±0,3$^{\beta}$	6,7±0,3$^{\beta}$	11,9±0,8$^{\beta}$	5,1±0,3$^{\beta}$	2,2±0,2$^{\beta}$	0,6±0,1$^{\beta}$
60	12,2±0,7$^{\gamma}$	11,7±0,5$^{\gamma}$	17,1±1,5$^{\gamma}$	7,1±0,8$^{\gamma}$	8,1±0,9$^{\gamma}$	1,2±0,2$^{\gamma}$
Χρόνος εκχύλισης (h)	mg/g					mg DPPH/ g
1	3,3±0,4$^{\alpha}$	3,1±0,6$^{\alpha}$	6,5±1,1$^{\alpha}$	2,7±0,4$^{\alpha}$	2,9±0,5$^{\alpha}$	0,3±0,0$^{\alpha}$
2	7,2±0,3$^{\beta}$	6,7±0,3$^{\beta}$	11,9±0,8$^{\beta}$	5,1±0,3$^{\beta}$	5,6±0,6$^{\beta}$	0,6±0,1$^{\beta}$
4	7,3±0,9$^{\beta}$	6,7±0,0$^{\beta}$	12,1±2,2$^{\beta}$	5,3±0,5$^{\beta}$	5,3±1,0$^{\beta}$	0,7±0,1$^{\beta}$
8	11,9±0,3$^{\gamma}$	13,8±1,0$^{\gamma}$	22,9±1,9$^{\gamma}$	9,9±0,7$^{\gamma}$	11,3±1,1$^{\gamma}$	1,2±0,2$^{\gamma}$
Αναλογία δείγματος/διαλύτη (g/l)	mg/g					mg DPPH/ g
20	5,6±0,5$^{\alpha}$	7,3±0,8$^{\alpha}$	7,0±0,7$^{\alpha}$	3,3±0,1$^{\alpha}$	3,8±0,3$^{\alpha}$	0,4±0,0$^{\alpha}$
40	7,2±0,3$^{\beta}$	6,7±0,3$^{\alpha}$	11,9±0,8$^{\beta}$	5,1±0,3$^{\beta}$	5,6±0,6$^{\beta}$	0,6±0,1$^{\alpha}$
80	4,5±0,8$^{\alpha}$	5,7±0,9$^{\beta}$	8,5±1,2$^{\gamma}$	4,3±0,5$^{\gamma}$	4,8±0,6$^{\beta}$	2,3±0,3$^{\beta}$
Περιεκτικότητα EtOH %	mg/g					mg DPPH/ g
25	4,5±0,5$^{\alpha}$	2,6±0,8$^{\alpha}$	6,4±0,4$^{\alpha,\beta}$	3,3±0,2$^{\alpha}$	2,5±0,1$^{\alpha}$	0,6±0,0$^{\alpha}$
50	5,3±0,1$^{\beta}$	5,3±1,2$^{\beta,\gamma}$	7,6±1,5$^{\alpha,\gamma}$	3,6±1,1$^{\alpha,\gamma}$	3,4±1,2$^{\alpha,\gamma}$	0,8±0,0$^{\beta}$
70	7,2±0,3$^{\gamma}$	6,7±0,3$^{\beta}$	11,9±0,8$^{\beta}$	5,1±0,3$^{\beta}$	5,6±0,6$^{\beta}$	0,6±0,1$^{\gamma}$
100	3,1±0,9$^{\delta}$	4,7±0,2$^{\gamma}$	7,0±0,4$^{\gamma}$	3,0±0,1$^{\gamma}$	3,8±0,2$^{\gamma}$	0,2±0,0$^{\delta}$

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ±, τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που έχουν το ίδιο ελληνικό γράμμα ως εκθέτη μέσα σε κάθε κουτί κάθε στήλης , δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ($P \leq 0.05$)

Πίνακας4.2.2γ: Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων *Salvia fruticosa* κάτω από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης

Παράγοντας Εκχύλισης	**Φαινολικό περιεχόμενο***					**Αντιοξειδωτική δράση***
	Total (725nm)	*o*-Diphenols (517 nm)	Total (280 nm)	Hydroxycinnamic acids (320 nm)	Flavonols (360 nm)	AE
Θερμοκρασία (^{o} C)	mg /g					mg DPPH/ g
25	41,6±2,1$^{\alpha}$	26,4±9,6$^{\alpha}$	34,0±2,5$^{\alpha}$	18,7±2,3$^{\alpha}$	15,8±1,7$^{\alpha}$	13,8±1,4$^{\alpha}$
40	63,3±3,6$^{\beta}$	42,9±4,8$^{\beta}$	48,0±3,1$^{\beta}$	26,2±1,0$^{\beta}$	24,1±1,8$^{\beta}$	20,4±0,5$^{\beta}$
60	67,6±3,9$^{\beta}$	57,2±3,6$^{\gamma}$	51,2±2,9$^{\beta}$	27,9±0,8$^{\gamma}$	28,6±1,3$^{\gamma}$	24,5±1,4$^{\gamma}$
Χρόνος εκχύλισης (h)	mg/g					mg DPPH/ g
1	49,7±3,8$^{\alpha}$	27,5±2,6$^{\alpha}$	35,9±0,9$^{\alpha}$	20,1±0,2$^{\alpha}$	18,4±0,4$^{\alpha}$	18,0±0,6$^{\alpha}$
2	63,3±3,6$^{\beta}$	42,9±4,8$^{\beta}$	48,0±3,1$^{\beta}$	26,2±1,0$^{\beta}$	24,1±1,8$^{\beta}$	20,4±0,5$^{\beta}$
4	65,3±0,8$^{\beta}$	51,6±6,6$^{\beta}$	54,0±3,0$^{\gamma}$	28,4±1,5$^{\gamma}$	27,1±1,5$^{\gamma}$	24,8±1,3$^{\gamma}$
8	73,3±3,4$^{\gamma}$	62,1±7,6$^{\gamma}$	70,9±4,4$^{\delta}$	38,8±3,3$^{\delta}$	38,0±3,1$^{\delta}$	30,6±3,3$^{\delta}$
Αναλογία δείγματος/διαλύτη (g/l)	mg/g					mg DPPH/ g
20	65,2±9,8$^{\alpha}$	51,8±4,3$^{\alpha}$	57,7±6,3$^{\alpha}$	29,9±4,1$^{\alpha}$	28,2±4,0$^{\alpha}$	5,3±0,3$^{\alpha}$
40	63,3±3,6$^{\alpha}$	42,9±4,8$^{\beta}$	48,0±3,1$^{\beta}$	26,2±1,0$^{\alpha}$	24,1±1,8$^{\alpha}$	20,4±0,5$^{\beta}$
80	47,1±2,2$^{\beta}$	46,3±2,5$^{\gamma}$	48,2±3,8$^{\beta}$	26,5±1,9$^{\alpha}$	25,6±2,0$^{\alpha}$	34,5±0,1$^{\gamma}$
Περιεκτικότητα EtOH %	mg/g					mg DPPH/ g
25	34,9±3,5$^{\alpha}$	30,7±3,6$^{\alpha}$	26,8±2,7$^{\alpha}$	14,3±1,5$^{\alpha}$	13,4±1,4$^{\alpha}$	11,3±1,3$^{\alpha}$
50	53,0±2,4$^{\beta}$	43,9±3,0$^{\beta}$	44,9±1,7$^{\beta}$	25,2±1,3$^{\beta}$	24,0±0,8$^{\beta}$	17,0±2,1$^{\beta}$
70	63,3±3,6$^{\gamma}$	42,9±4,8$^{\beta}$	48,0±3,1$^{\beta}$	26,2±0,9$^{\beta}$	24,1±1,8$^{\beta}$	20,4±0,5$^{\gamma}$
100	15,8±1,2$^{\delta}$	9,0±0,8$^{\gamma}$	14,7±0,3$^{\gamma}$	11,9±1,1$^{\gamma}$	7,0±0,2$^{\gamma}$	1,2±0,3$^{\delta}$

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ±, τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που έχουν το ίδιο ελληνικό γράμμα ως εκθέτη μέσα σε κάθε κουτί κάθε στήλης , δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ($P \leq 0.05$)

Πίνακας4.2.2δ: Φαινολικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων *Origanum dictamnus* κάτω από διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης

Παράγοντας Εκχύλισης	**Φαινολικό περιεχόμενο***					**Αντιοξειδωτική δράση***
	Total (725nm)	*o*-Diphenols (517 nm)	Total (280 nm)	Hydroxycinnamic acids (320 nm)	Flavonols (360 nm)	AE
Θερμοκρασία (^{o}C)	mg /g					mg DPPH/ g
25	20,2±2,2$^{\alpha}$	11,7±0,7$^{\alpha}$	21,8±2,3$^{\alpha}$	10,3±1,3$^{\alpha}$	7,1±0,5$^{\alpha}$	7,6±0,4$^{\alpha}$
40	32,0±1,6$^{\beta}$	21,9±5,0$^{\beta}$	20,7±1,0$^{\alpha}$	10,8±0,6$^{\alpha}$	7,5±1,2$^{\alpha}$	10,4±0,3$^{\beta}$
60	43,9±0,9$^{\gamma}$	32,1±0,9$^{\gamma}$	38,5±1,6$^{\beta}$	19,7±0,7$^{\beta}$	15,7±0,6$^{\beta}$	16,1±1,2$^{\gamma}$
Χρόνος εκχύλισης (h)	mg/g					mg DPPH/ g
1	23,8±1,4$^{\alpha}$	8,7±2,0$^{\alpha}$	19,8±0,6$^{\alpha}$	10,4±0,2$^{\alpha}$	7,2±0,3$^{\alpha}$	9,0±0,6$^{\alpha}$
2	32,0±1,6$^{\alpha}$	16,2±0,6$^{\beta}$	20,7±1,0$^{\alpha}$	10,8±0,6$^{\alpha}$	7,5±1,2$^{\alpha}$	10,4±0,3$^{\beta}$
4	35,3±2,4$^{\beta}$	22,8±0,8$^{\gamma}$	28,7±3,5$^{\beta}$	14,2±0,7$^{\beta}$	10,9±1,5$^{\beta}$	13,6±1,6$^{\gamma}$
8	36,8 ±1,7$^{\beta}$	22,4±3,1$^{\delta}$	30,3±1,0$^{\beta}$	16,3±0,4$^{\gamma}$	11,5±0,2$^{\beta}$	13,9±1,0$^{\gamma}$
Αναλογία δείγματος/διαλύτη (g/l)	mg/g					mg DPPH/ g
20	28,8±4,1$^{\alpha}$	15,0±1,3$^{\alpha}$	21,5±3,7$^{\alpha}$	11,2±2,1$^{\alpha}$	7,5±1,6$^{\alpha}$	4,3±0,6$^{\alpha}$
40	32,0±1,6$^{\alpha}$	21,9±5,0$^{\beta}$	20,7±1,0$^{\beta}$	10,8±0,6$^{\alpha}$	7,5±1,2$^{\alpha}$	10,4±0,3$^{\beta}$
80	23,1±1,1$^{\beta}$	16,5±0,6$^{\alpha,\beta}$	23,2±1,8$^{\gamma}$	11,8±0,9$^{\alpha}$	8,6±0,7$^{\alpha}$	14,4±0,7γ
Περιεκτικότητα EtOH %	mg/g					mg DPPH/ g
25	41,7±2,8$^{\alpha}$	34,3±1,2$^{\alpha}$	31,8±1,0$^{\alpha}$	18,7±0,6$^{\alpha}$	15,8±0,5$^{\alpha}$	15,5±1,3$^{\alpha}$
50	43,8±0,7$^{\alpha}$	33,9±1,8$^{\alpha}$	37,8±1,6$^{\beta}$	21,4±0,8$^{\beta}$	17,2±0,5$^{\beta}$	16,5±0,3$^{\alpha}$
70	32,0±1,6$^{\beta}$	21,9±5,0$^{\beta}$	20,7±1,0$^{\gamma}$	10,8±0,6$^{\gamma}$	7,5±1,2$^{\gamma}$	10,4±0,3$^{\beta}$
100	4,2±0,6$^{\gamma}$	2,2±0,2$^{\gamma}$	6,2±0,4$^{\delta}$	2,0±0,5$^{\delta}$	1,9±0,2$^{\delta}$	0,7±0,2$^{\gamma}$

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέση τιμή ±, τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές που έχουν το ίδιο ελληνικό γράμμα ως εκθέτη μέσα σε κάθε στήλη, δεν έχουν σημαντικές διαφορές (P≤0.05)

4. 3 Γενικά συμπεράσματα

Η ανάκτηση των φαινολών από τα αρωματικά φυτά και καρποφόρα δέντρα αποτελεί σημαντική διαδικασία, επειδή η απομόνωση αυτών των φυσικών αντιοξειδωτικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων αλλά και για τον εμπλουτισμό των τροφίμων (χαμηλών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων) με φυσικά αντιοξειδωτικά.

Από την μια μεριά, με την εφαρμογή του μοντέλου Unifac συμπεραίνεται ότι η αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος ως διαλύτης της εκχύλισης, αποτελεί έναν «καλό διαλύτη», ο οποίος προτιμάται από τις περισσότερες φαινόλες των αρωματικών φυτών και καρποφόρων δέντρων που εξετάσθηκαν. Συγκεκριμένα, από τις 9 φαινόλες που κυριαρχούν τα φύλλα ελιάς και εξετάσθηκαν στο μοντέλο, οι 6 προτιμούν την αιθανόλη και στις 25, 40 και 60 ^{o}C. Για τα φύλλα πορτοκαλιάς από τις 4 κυριότερες φαινόλες, που εξετάσθηκαν, μόνο μία προτιμά την αιθανόλη και στις 3 θερμοκρασίες, οι υπόλοιπες προτιμούν την μεθανόλη και την ακετόνη. Αντίστοιχα, από τις 11 κυριότερες φαινόλες, που εξετάσθηκαν στα εκχυλίσματα της φασκομηλιάς, οι 7 προτιμούν την αιθανόλη σε όλες τις θερμοκρασίες. Στα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων του δίκταμου παρατηρείται ότι για θερμοκρασίες 25 και 40 ^{o}C, από τις 7 κυριότερες φαινόλες, που εξετάσθηκαν στα εκχυλίσματα του δίκταμου, οι τρεις προτιμούν την αιθανόλη, ενώ οι υπόλοιπες προτιμούν τη μεθανόλη και την ακετόνη. Για θερμοκρασία 60 ^{o}C, από τις 7 εξεταζόμενες φαινόλες, οι δυο προτιμούν την αιθανόλη.

Από την άλλη μεριά, από το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης εργασίας συμπεραίνεται ότι τα φύλλα ελιάς και πορτοκαλιάς μπορούν να συγκριθούν με τα αρωματικά φυτά, φασκόμηλο και δίκταμο, ως προς τις συγκεντρώσεις των φαινολών τους και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Οι βέλτιστες συνθήκες για τα φύλλα ελιάς, τα φύλλα πορτοκαλιάς και το φασκόμηλο ήταν παρόμοιες, σε αντίθεση με το δίκταμο που παρουσίαζε σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα αιθανόλης, σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Συγκεκριμένα, Οι άριστες συνθήκες εκχύλισης για τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης φαινολών και τη μέγιστη αντιοξειδωτικη δράση για τα φύλλα ελιάς είναι η εκχύλιση να πραγματοποιηθεί στους 60 ^{o}C, περιεκτικότητα αιθανόλης/ νερού 70%, αναλογία ξηρού δείγματος/διαλύτη 20 g/l για τις ολικές φαινόλες αλλά 40 g/l για μέγιστες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, ο-διφαινολών και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση, και χρόνο εκχύλισης 4 h έχοντας μέγιστη αντιοξειδωτική δράσης.

Επίσης, τα φύλλα πορτοκαλιάς παρουσίασαν τη μέγιστη απόδοση στους 60 ^{o}C, σε περιεκτικότητα αιθανόλης/ νερού 70%, σε χρόνο εκχύλισης 8 h και αναλογία διαλύτη δείγματος 80 g/l.

Επιπλέον, τα φύλλα της φασκομηλιάς δίνουν καλύτερα αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο των φαινολών στους 40 ^{o}C και 60 ^{o}C ενώ για τα φλαβονοειδή, ο-διφαινόλες και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση στους 60 ^{o}C. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και στις τρεις αναλογίες δείγματος/διαλύτη είναι το ίδιο, αλλά η αναλογία 80 g/l δίνει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Ο καλύτερος χρόνος εκχύλισης για τη φασκομηλιά είναι 8 h και οι περιεκτικότητες αιθανόλης/ νερού 50-70% δίνουν τη μέγιστη απόδοση.

Τέλος, όσο αφορά τις άριστες συνθήκες για τα εκχυλίσματα του δίκταμου, διάφεραν σημαντικά από τα υπόλοιπα τρία φυτά, αφού η περιεκτικότητα σε αιθανόλη 25-50% αποτελεί την άριστη περιεκτικότητα για τη μέγιστη απόδοση ανάκτησης φαινολών αλλά και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Η άριστη θερμοκρασία είναι 60 ^{o}C, ο χρόνος εκχύλισης 4 h και η αναλογία ξηρού δείγματος/διαλύτη 80 g/l.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βορβίλας Ι. (2006). Προμελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων

Γιώτη Χ. (2008). Μελέτη Επεξεργασίας και διάθεσης υγρών αποβλήτων βιομηχανίας Χυμοποίησης πορτοκαλιών

Γκέκας Β. & Γκέκας Σ. (2002). Θερμοδυναμική και Περιβάλλον, προσέγγιση Καραθεοδωρή Φιλοσοφικές προεκτάσεις. *Εκδόσεις Τζιόλα*

Γκέκας Β. & Μπαλτά Κ. (2005). Βιομηχανία Τροφίμων και Περιβάλλον. Εκδόσεις Τζιόλα

Ισραηλίδης Κ. Ι (2001). Αξιοποίηση οργανικών αγροβιομηχανικών αποβλήτων. ΕΘΙΑΓΕ (kalithea.hua.gr/compost.net/Isralaidis/201.doc)

Κόλτζαλη Ε. (2006). Αξιολόγηση Μεσσηνιακού Ελαιόλαδου. *Πτυχιακή μελέτη*

Κουλαδούρας Η. & Β. Κωνσταντίνου (2004). Πρακτικά και Θεωρητικά Θέματα Γενικής Χημείας. *Σημειώσεις Γ.Π.Α*

Λάζαρη Δ. Μ. (2005). Βοτανική εξάπλωση και χρήσεις στη λαϊκή θεραπευτική, ειδών του γένους Salvia L. (φασκόμηλο). *Πρακτικά Επιστημονικής Ημερίδας: Το ελληνικό φασκόμηλο*

Μπαλαμώτη Χ. (2004). Μικροσυστατικά σε ελληνικά βότανα και αφεψήματα. *Μεταπτυχιακή Διατριβή*

Σωτηρούδης Θ. (2008). Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά και υγεία. Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, 217-218

Τερμεντζή Α., Κοκκάλου Ε. (2004). Ελεύθερες ρίζες- Αντιοξειδωτικά- Μέθοδοι ελέγχου της αντιοξειδωτικής ικανότητας. *Περιοδικό Αριστοτέλης Τεύχος 16*

Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλον Λευκωσίας (ΥΓΦΠΠ) (2002). Η ελιά.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112, 303–309

Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G. & Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A. &. Del Rio J.A (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. Leaves. *Food Chemistry*,68, 457-462

Briante R., Patumi M., Terenziani S., Bismuto E., Febbraio F. & Nucci R. (2002). *Olea europaea* L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4934-4940

Boskou D., Exarchou V., Kefalas P. (2006). *Natural antioxidant phenols. Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterisation*,157-174

Bouaziz M.& Sayadi S. (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 107, 497–504

Boudhrioua N., Bahloul N., Slimen I. & Kechaou N. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*, 29, 412–419

Cooke S.A., Jónsdóttir S.Ó. & Westh P. (2001). Phase equilibria of carbohydrates: the study of a series of glucose oligomers from glucose to maltopentaose in aqueous solution Experimental versus predicted data using various UNIQUAC/UNIFAC models. *Fluid Phase Equilibria*, 194–197, 947–956

Demo A., Petrakis C., Kefalas P. & Boskou D. (1998).Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Chemistry*,31,351-354

Durling N. E., Catchpole O. J., Grey J. B., Webby R.F.,. Mitchhell K. A, Yeap Foo L. & Perry N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (Salvia officinalis) using etanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101, 1417-1424

Eidi A.& Eidi M. (2009). Antidiabetic effects of sage (Salvia officinalis L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3, 40–44

Erbay Z. & Icier F. (2009).Optimization of Drying of Olive Leaves in a Pilot-Scale Heat Pump Dryer. *Drying Technology*, 27, 416-427

Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I. P., Troganis A & Boskou D. (2002). Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5294-5294

Exarchou V.& Gerothanassis I. (2006). NMR studies of antioxidant plant phenols: Basic parameters. *Natural antioxidant phenols. Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterisation*,125-142

Ferreira I. C.F.R., Barros L., Soares M. E., Lourdes Bastos M. & Pereira J. A. (2007). Antioxidant activity and phenolic contents of Olea europaea L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103, 188–195

Gali-Muhtasib H. (2006). Anticancer and medicinal properties of essential oil and extracts of East Mediterranean sage (*salvia triloba*). *Advances in Phytomedicine, 2,* 169-180

Harbourne N., Jacquier J. C. & O'Riordan D. (2009). Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla L.*) for incorporation into a beverage. *Food Chemistry,* 115, 15–19

Hodgson J. M., Proudfoot J. M., Croft K. D., Puddey I. B., Mori T. A. & Beilin L. J. (1999). Comparison of the effects of black and green tea onin vitro lipoprotein oxidation in human serum. *Journal of Science of Food and Agriculture,* 79**,** 561-566

Huang D., OuB & Prior R. L. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,*53, 1841-1856

Japón-Luján R.& Luque De Castro M. D. (2007). Small Branches of Olive Tree: A Source of Biophenols Complementary to Olive Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 4584-4588

Japón-Luján R., Luque-Rodríguez J. M., Luque de Castro M. D. (2006). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Anal Bioanal Chem,* 385, 753–759

Koleva I. I., Linssen J. PH, Beek T. A van, Evstatieva L. N., Kortenska V. & Handjieva N. (2003). Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria. *Journal of Science of Food and Agriculture,* 83, 809–819

Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H. & Oreopoulou V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus. Innovative Food Science and Emerging Technologies,* 8, 155–162

Le Floch F.,. Tena M.T, Rıos A. & Valcarcel M. (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta,* 46, 1123–1130

Molan A.L., Flanagan J. & Wei W., Moughan P.J. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemistry*, 114, 829–835

Mylonaki S.& Kiassos E. & Makris D. P. & Kefalas P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (Olea europaea) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem,* 392, 977–985

Oliveira E.D., Leite T.S., Silva B.A. & Conde-Garcia E.A. (2005). Inotropic effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck leaf extracts on the guinea pig atrium. Brazilian Journal of Medical and Biolgical Research, 38, 111-118

Oliveira I., Sousa A., Ferreira I. C.F.R., Bento A., Estevinho L. and Pereira J. A. (2008).Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology,* 46, 2326–2331

Paiva-Martins F. & Gordon M. H. (2001). Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49,* 4214-4219

Paiva-Martins F. & Pinto M. (2008). Isolation and Characterization of a New Hydroxytyrosol Derivative from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5582–5588

Papoti V. T. & Tsimidou M. Z. (2009). Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry,* 112, 246–252

Peleg H., Naim M., Rouse R. L. & Zehavi U. (1991). Distribution of Bound and Free Phenolic Acids in Oranges *(Citrus sinensis)* and Grapefruits *(Citrus paradisi). Journal of Science of Food and Agriculture*, 57, 417-426

Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Uberegger E.& Conte L. S. (2002).Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis and S fruticosa*) and oregano (*Origanum onites and O indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of Science of Food and Agriculture,* 82, 1645-1651.

Proestos C. & Komaitis M. (2008).Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Food Chemistry, 41,* 652-659

Randhol P. & Engelien H. K. (2000). xUnifac, a Computer Program for Calculation of Liquid Activity Coefficients Using the Unifac Model

Ryan D., Antolovich M., Herlt T.,. Prenzler P. D, Lavee S.& Robards K. (2002). Identification of Phenolic Compounds in Tissues of the Novel Olive Cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50, 6716-6724

Šamec D., Gruz J., Strnad M., Kremer D., Kosalec I., Jurišić Grubešić R., Karlović K., Lucic A. & Piljac-Žegarac J. (2009). Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology*

Singleton V. L. &. Rossi J. A (1965). Colorimetry a total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol,* 16, 144-158

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simonic M. & Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198

Swatsitang P., Tucker G., Robards K. & Jardine D. (2000). Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis. Analytica Chimica Acta*, 417, 231–240

Tildesley N. T. J., Kennedy D. O., Perry E. K., Ballard C. G., Savelev S., Wesnes K. A. & Scholey A. B. (2003). *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 669-674

Tsaknis J. & Lalas S. (2005). Extraction and identification of natural antioxidant from Sideritis euboea (mountain tea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6375-6381

Tsimidou M. Z., Nenadis N. & Zhang H. (2006). Structure-radical scavenging activitity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Natural antioxidant phenols. Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterisation*, 29-68

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

ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ

www.musioelias.gr/

www.lesvosline.gr/.../tree.htm

el. wikipedia.org/wiki/Ελιά

users.sch.gr/kassetas/zzztree56.htm

www.ert.gr/afieromata/votana/votana/votana16.html

en.wikipedia.org/wiki/luteolin

www.chem.auth.gr/content/organic_lab / CHEM/EXTRACTION.pdf

www.embaros.com

www.anthorama.gr/files/origanum_dictamnus.htm