



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

[ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ]

« Βιοδραστικά εκχυλίσματα από φυτικές πηγές: Απομόνωση, ανάλυση και αξιολόγηση βιολογικών δράσεων. »

Δημητρίου Μαρία

Τριμελής Επιτροπή:

Χίου Αντωνία (Επιβλέπουσα-Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π)

Καραθάνος Βάιος (Καθηγητής Χ.Π)

Νομικός Τζώρτζης (Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π)

Αθήνα 2015



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Βιοδραστικά εκχυλίσματα από φυτικές πηγές: Απομόνωση, ανάλυση και
αξιολόγηση βιολογικών δράσεων.»*

Δημητρίου Μαρία

Τριμελής Επιτροπή:

Χίου Αντωνία (Επιβλέπουσα-Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π)

Καραθάνος Βάιος (Καθηγητής Χ.Π)

Νομικός Τζώρτζης (Επίκουρος Καθηγητής Χ.Π)

ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΜΟΥ

Για την αγάπη, τη στήριξη & την κατανόηση

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου στο πλαίσιο του ΠΜΣ κλινικής διατροφής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην επιβλέπουσα Κ. Χίου Αντωνία που μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα, με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης και με βοήθησε παρέχοντάς μου πολύτιμες συμβουλές.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα ακόμη να εκφράσω στον Καθηγητή Κ. Καραθάνο Βάιο και στον Επίκουρο Καθηγητή Κ. Νομικό Τζώρτζη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, για τις γνώσεις, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφεραν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου που μου παρείχαν με χαρά τις συμβουλές τους και τη βοήθειά τους δημιουργώντας ένα όμορφο ζεστό περιβάλλον στο οποίο εργάστηκα καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στους δικούς μου ανθρώπους, στους φίλους που με στήριξαν, στους γονείς μου, Μενέλαο και Ροδοθέα που ήταν πάντα δίπλα μου με αγάπη, υπομονή και υπερηφάνεια, στον αδερφό μου Κωνσταντίνο καθώς και στον Χαράλαμπο Μπαμπίλη για την αγάπη και τη συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φρούτα συνιστούν τμήμα μιας ισορροπημένης διατροφής διότι πέραν των υπολοίπων διατροφικών τους χαρακτηριστικών, αποτελούν πλούσια πηγή φυτοχημικών συστατικών με ευεργετικές δράσεις για την υγεία.

Σκοπός της διατριβής ήταν η απομόνωση εκχυλισμάτων φρούτων καθώς και η ανάλυση και αξιολόγηση αυτών ως προς τα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά και κυρίως τις ανθοκυανίνες. Δεδομένου ότι τα συστατικά αυτά είναι εν δυνάμει ευπαθή σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η ενθυλάκωση των παραληφθέντων εκχυλισμάτων σε μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος τα οποία περαιτέρω αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού, τη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και τις αντιοξειδωτικές δράσεις που εμφανίζουν.

Το βύσσινο επιλέχθηκε, μεταξύ άλλων, ως το καταλληλότερο φρούτο προς αξιολόγηση και εκχυλίστηκε με 3 συστήματα οξινισμένων διαλυτών, ήτοι μεθανόλη, μίγμα αιθανόλης/νερού και νερό. Ως καταλληλότερο μέσο εκχύλισης επιλέχθηκε το σύστημα αιθανόλη/νερό/κιτρικό οξύ (34,9:65:0,1) καθώς αφενός είναι φιλικό προς το περιβάλλον και αφετέρου οδήγησε σε καλύτερη απόδοση κατά την εκχύλιση ανθοκυανινών. Το παραληφθέν εκχύλισμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με μίγμα μεθανόλης/HCl (0,3%) σε ρητίνη XAD7, διαδικασία η οποία μείωσε το περιεχόμενο των υδατανθράκων του αρχικού (ακατέργαστου) εκχυλίσματος κατά 30-33% και οδήγησε σε $90 \pm 2\%$ ανάκτηση ανθοκυανινών.

Το εκχύλισμα του φρούτου, πριν και μετά το μερικό καθαρισμό του, ενθυλακώθηκε σε μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος με 2 τεχνικές: (1) με έγχυση: το δείγμα ενσωματώθηκε στα μικροσφαιρίδια κατά το στάδιο της ζελατινοποίησης, (2) με εμβάπτιση: το δείγμα ενσωματώθηκε σε προσχηματισμένα μικροσφαιρίδια. Η πρώτη διαδικασία εγκλεισμού φάνηκε να πλεονεκτεί έναντι της δεύτερης όσον αφορά στην απόδοση ενθυλάκωσης με τιμές $52,6 \pm 2,0\%$ έναντι $39,8 \pm 3,1\%$ για το ακατέργαστο εκχύλισμα και $60,2 \pm 0,5\%$ έναντι $40,5 \pm 3,7\%$ για το μερικώς καθαρισμένο δείγμα, αντίστοιχα. Η δεύτερη διαδικασία εγκλεισμού έδειξε καλύτερα αποτελέσματα στην απελευθέρωση πυρηνικού υλικού επιτυγχάνοντας απελευθέρωση του 85% και 80% περίπου των ενθυλακωμένων ανθοκυανινών και ολικών φαινολών, αντίστοιχα.

Η θερμική σταθερότητα των ενθυλακωμένων ολικών ανθοκυανινών και φαινολών αξιολογήθηκε σε δύο θερμοκρασίες, 90°C και 120°C . Η σταθερότητα των ανθοκυανινών

αυξήθηκε και στις δύο θερμοκρασίες στα ενθυλακωμένα προϊόντα και των 2 τεχνικών έναντι των μη εγκλεισμένων εκχυλισμάτων. Στο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα φάνηκε να ανακτώνται ανθοκυανίνες σε πολύ υψηλότερο ποσοστό συγκριτικά με το ακατέργαστο. Κατά την ανάλυση των επιμέρους ανθοκυανινών με HPLC, ανιχνεύθηκαν 2 κύριες κορυφές, πιθανότατα παράγωγα κυανιδίνης δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητας του βύσσινου σε 3-(2^Z-γλυκοζυλο-ρουτινοζίτη) της κυανιδίνης και 3-Ο-ρουτινοζίτη της κυανιδίνης. Σε μικρότερη αναλογία ανιχνεύθηκαν 2 ακόμα συστατικά. Όσον αφορά στα ολικά φαινολικά συστατικά, τα ενθυλακωμένα προϊόντα επέδειξαν σταθερότητα των συστατικών τόσο μετά από εγκλεισμό του ακατέργαστου όσο και του μερικώς καθαρισμένου δείγματος. Η σταθερότητα αυτή παρατηρήθηκε και στο ακατέργαστο εκχύλισμα προ εγκλεισμού, ενώ στο μερικώς καθαρισμένο διαπιστώθηκε σημαντική απώλεια ολικών φαινολών. Στην περίπτωση του ακατέργαστου εκχυλίσματος παρατηρήθηκαν αυξήσεις προ και μετά εγκλεισμού.

Τέλος, το ενθυλακωμένο πυρηνικό υλικό ανεξάρτητα από την τεχνική εγκλεισμού εκδήλωσε αντιοξειδωτικές ιδιότητες κατά τη δοκιμή δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH.

Συνοψίζοντας, μέσω της ενθυλάκωσης των εκχυλισμάτων του βύσσινου με 2 διαφορετικές τεχνικές επετεύχθη αύξηση της σταθερότητας του πυρηνικού υλικού και εκδηλώθηκαν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τα συστήματα αυτά θα μπορούσαν πιθανά να αξιοποιηθούν μελλοντικά, για παράδειγμα, από τη βιομηχανία καλλυντικών σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας.

ABSTRACT

Fruits hold a significant place in a balanced diet, given that apart from other nutritional characteristics, they are a rich source of phytochemicals with potential beneficial health effects.

The aim of this thesis was the isolation and analysis of fruit extracts rich in phytochemicals, especially anthocyanins. Since these bioactive components may be susceptible to decomposition due to external environmental factors, encapsulation of the extracts prepared in alginate microspheres was applied. Encapsulated products were evaluated for their ability to release core materials, stability at high temperature and antioxidant activities.

Sour cherry was selected among other fruits for this study. Several solvent systems were evaluated for the extraction, i.e. acidified methanol, acidified ethanol/water and acidified water. A mixture of ethanol/water/citric acid (34.9:65:0.1) was selected for fruit extract preparation since it is both environmentally friendly and proved most efficient in extracting anthocyanins from the matrix. The extract obtained was partially purified by column chromatography with methanol/HCl (0.3%) as elution solvent on a XAD7 resin. This procedure resulted in a 30-33% reduction of carbohydrate content and $90\pm 2\%$ recovery of anthocyanins, as compared with crude sour cherry extract.

Fruit extracts, before and after partial purification, were encapsulated in alginate microspheres by applying two techniques: (1) injection: sample was incorporated into the microspheres during the gelation stage, (2) dripping: sample was incorporated into preformed microspheres. The first encapsulation process appeared to be more advantageous than the second one in terms of encapsulation efficiency, with values $52.6\pm 2.0\%$ versus $39.8\pm 3.1\%$ for the crude extract and $60.2\pm 0.5\%$ versus $40.5\pm 3.7\%$ for the partially purified sample, respectively. The second encapsulation process proved more efficient for the release of nuclear material, reaching 85% and approximately 80% release of encapsulated anthocyanin and total phenols, respectively.

Thermal stability of encapsulants in terms of total anthocyanins and total phenols was evaluated at two temperatures, i.e. 90°C and 120°C. Anthocyanin stability increased at both temperatures regardless the encapsulation technique applied. Anthocyanin recovery was much higher for the partially purified extract than that of crude extract. HPLC analysis of individual anthocyanins revealed the presence of two major peaks in the matrix, probably cyanidin derivatives given the high content of sour cherry in cyanidin 3- (2^Z -glycosyl-rutinoside) and

cyanidin 3-*O*-rutinoside. Two more ingredients were also detected, at low content. With respect to total phenolic compounds, stability of these components was exhibited after encapsulation of both the crude and the partially purified sample. Crude extract prior to encapsulation was also proven stable under heating, while in the partially purified extract a significant loss of total phenols was observed.

The encapsulated core material was also proven able to scavenge free radicals as indicated by the DPPH radical scavenging assay.

It is therefore concluded that encapsulation of sour cherry extracts in alginate beads is feasible and succeeds in providing stability to the nuclear material under heating while at the same time these microspheres are able to exert antioxidant activities. Such systems might find applications in the future, for example, in the cosmetic industry for personal care products preparation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΒΥΣΣΙΝΟ: ΤΟ ΔΕΝΔΡΟ ΚΑΙ Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΟΥ

1.1.	Βοτανικά χαρακτηριστικά	14
1.2.	Πεδοκλιματικές συνθήκες και Καλλιεργητικές τεχνικές	15
1.3.	Παραγωγή Βύσσινου σε Παγκόσμιο Επίπεδο	17
1.4.	Ιστορικά στοιχεία - καταγωγή & εξάπλωση	18
1.5.	Χρήσεις του Βύσσινου στη μαγειρική	19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΒΥΣΣΙΝΟ

2.1.	Διαδικασία της οξείδωσης και αντιοξειδωτικά	20
2.2.	Οι φαινολικές ενώσεις	21
2.3.	Πηγές φαινολικών ενώσεων	22
2.4.	Χημική σύσταση & αντιοξειδωτικά βύσσινου	22
2.4.1.	Περιεχόμενο βύσσινου σε φαινολικά και επιμέρους συστατικά	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΟΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΥΣΣΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

3.1.	Ευεργετικές δράσεις των ανθοκυανινών στην υγεία	26
3.2.	Ευεργετικές δράσεις των φαινολικών συστατικών στην υγεία	28
3.3.	Ευεργετικές ιδιότητες του βύσσινου στην υγεία	32
3.3.1.	Αντιοξειδωτικές δράσεις	32
3.3.2.	Αντιφλεγμονώδεις δράσεις	33
3.3.2.1.	Δράσεις κατά του πόνου	34
3.3.2.2.	Δράσεις κατά του μυϊκού πόνου	35
3.3.3.	Αντικαρκινικές δράσεις	36
3.3.4.	Δράσεις κατά του μεταβολικού συνδρόμου	37
3.3.4.1.	Δράσεις στην αρτηριακή σκληρότητα	38
3.3.5.	Ευεργετικές δράσεις στον ύπνο	39
3.3.6.	Άλλες δράσεις	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο ΜΙΚΡΟΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

4.1. Γενικά για την ενθυλάκωση	41
4.2. Μέθοδοι παρασκευής μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος	44
4.3. Εφαρμογές της ενθυλάκωσης	46
4.4. Εφαρμογές μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος	48

B' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1. Εκχύλιση βύσσινου & παραλλαγή κλάσματος πλούσιο σε ανθοκυανίνες	51
5.1.1. Λυοφιλίωση των υδατικών φάσεων του εκχυλίσματος βύσσινου	52
5.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού φαινολικού (PP) περιεχομένου με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu	53
5.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών με τη μέθοδο διαφορικού pH	55
5.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων	56
5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	57
5.5. Μερικός καθαρισμός εκχυλίσματος με χρήση ρητινών και παραλλαγή κλάσματος ανθοκυανινών	58
5.6. Μικροενθυλάκωση με άλας αλγινικού οξέος	61
5.6.1. Α' Τεχνική: μικροενθυλάκωση με εμφύσηση στο δείγμα	62
5.6.2. Β' τεχνική: μικροενθυλάκωση με έγχυση του δείγματος	64
5.7. Απόδοση ενθυλάκωσης	66
5.8. Ελεγχόμενη απελευθέρωση ενθυλακωμένου δείγματος	67
5.9. Μελέτη σταθερότητας σε υψηλές θερμοκρασίες	68
5.10. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Επιλογή συστήματος εκχύλισης ανθοκυανινών από βύσσινο	73
6.2. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο βύσσινου	75
6.3. Επιλογή συστήματος διαχωρισμού κλάσματος ανθοκυανινών	75
6.4. Σύσταση μερικώς καθαρισμένου κλάσματος ανθοκυανινών	78
6.5. Απόδοση διαφορετικών μεθόδων ενθυλάκωσης	80
6.6. Απελευθέρωση πυρηνικού υλικού	83
6.7. Σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες	90
6.8. Αντιοξειδωτική ικανότητα ενθυλακωμένων δειγμάτων	99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΣΚΟΠΟΣ

Τα φρούτα είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά προσφέροντας αρκετά ευεργετικά οφέλη στην υγεία και αποτελώντας αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής. Σκοπό της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής, λοιπόν, αποτέλεσε η αναζήτηση κατάλληλων εκχυλισμάτων φρούτων και η αξιολόγησή τους ως προς το περιεχόμενο σε φυτοχημικά συστατικά και κατάλληλου συστήματος εκχύλισης το οποίο θα ήταν φιλικό προς το περιβάλλον και θα παραλάμβανε το μέγιστο δυνατό ποσοστό των βιοδραστικών συστατικών. Με δεδομένο ότι τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται με μίγματα διαλυτών εκτός των φυτοχημικών περιέχουν και άλλα συστατικά των τροφίμων, στην εν λόγω εργασία σχεδιάστηκε παράλληλα η μελέτη μερικής ή/και ιδανικά ολικής απομόνωσης των φυτοχημικών με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων διαχωρισμού. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν τεχνικές ενθυλάκωσης καθώς, ως γνωστόν, ο εγκλεισμός βιοδραστικών μορίων ή μιγμάτων μπορεί να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά στην προστασία του πυρηνικού υλικού από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το φως. Η επιλογή των μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος ως μέσου ενθυλάκωσης βασίστηκε στα χαρακτηριστικά που αυτό εμφανίζει. Συγκεκριμένα, στόχος μας ήταν να πραγματοποιήσουμε εφαρμογές με φορέα που είναι βιοδιασπώμενος, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη βιβλιογραφία για την παρασκευή προϊόντων ευρέως φάσματος, είναι σχετικά χαμηλού κόστους και εμφανίζει κάποια πρωτοτυπία. Τελικός στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αξιολόγηση των μικροσφαιριδίων που παρασκευάστηκαν ως προς τη σταθερότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες, την ικανότητα απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού συναρτήσει του χρόνου και τις αντιοξειδωτικές δράσεις που επιδεικνύουν.

Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΒΥΣΣΙΝΟ: ΤΟ ΔΕΝΔΡΟ ΚΑΙ Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΟΥ

1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά



Το βύσσινο (*Prunus cerasus* L.) ανήκει στην οικογένεια *Rosaceae*, στο είδος *Prunus* και στο υπογένος *Cerasus*. Η οικογένεια *Rosaceae* απαριθμεί εκατοντάδες είδη, μεταξύ των οποίων το κεράσι (*P. avium* L.)^[1]. Το *Prunus cerasus* L. θεωρείται ότι αποτέλεσε προϊόν διασταύρωσης των ειδών *P. avium* και *P. Fruticosa*^[2] στο οροπέδιο του Ιράν ή στην Ανατολική Ευρώπη όπου τα 2 είδη συνυπάρχουν. Τα υβριδικά προϊόντα που προέκυψαν σταθεροποιήθηκαν και διασταυρώθηκαν μεταξύ τους ώστε τελικά να προκύψει ένα νέο ξεχωριστό είδος, το *Prunus cerasus* L.^[3].

Οι ποικιλίες της βυσσινιάς είναι σχετικά λίγες, όλες τετραπλοειδείς ($4x=32$) και συνήθως αυτογόνιμες. Οι πιο γνωστές ελληνικές ποικιλίες είναι η Μεγαλόκαρπη της Φλώρινας και η Μεγαλόκαρπη της Τριπόλεως. Από τις πιο γνωστές, ακόμη, είναι το Πολίτικο (Κωνσταντινουπόλεως), η ποικιλία morello που μάλλον κατάγεται από Ολλανδία ή Γερμανία και η διάσημη ποικιλία Montmorency, η οποία είναι ιδανική για μεταποίηση και αποτελεί τον χαρακτηριστικό τύπο των κόκκινων ποικιλιών. Σε πολλές χώρες μάλιστα οι κόκκινες ποικιλίες ονομάζονται τύπου Montmorency με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολο να διαπιστωθεί η γνήσια ποικιλία^[4].

Η βυσσινιά είναι δένδρο φυλλοβόλο με πλούσιο ριζικό σύστημα. Είναι μικρότερο από την κερασιά και θεωρείται συνήθως μέτριας ανάπτυξης καθώς φτάνει τα πέντε έως οκτώ μέτρα. Ο κορμός της είναι ευθύς, τα κλαδιά της είναι γενικά λεπτότερα σε σύγκριση με αυτά της κερασιάς και η βλάστησή της είναι πλαγιόκλαδη. Τα φύλλα της βυσσινιάς είναι απλά ή ελλειψοειδή, διπλά οδοντωτά και αδενοφόρα. Είναι περισσότερο πράσινα και μικρότερα από της κερασιάς. Οι οφθαλμοί είναι ξυλοφόροι και ανθοφόροι όμως η διάκρισή τους είναι αρκετά δύσκολη. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί βρίσκονται σε όλο το μήκος του βλαστού, αναπτύσσονται νωρίτερα από τους ξυλοφόρους και ο καθένας παράγει ένα έως πέντε άνθη. Ο καρπός της βυσσινιάς είναι δρύπη και έχει συνήθως σχήμα σφαιρικό. Ο φλοιός του φρούτου έχει χρώμα ανοικτό κόκκινο έως βαθυκόκκινο, ενώ η σάρκα είναι λευκή έως βαθυκόκκινη, απαλή με γεύση υπόξινη^[5].



Η βυσσινιά ζει περίπου 70 χρόνια. Η καρποφορία της ξεκινά σε μικρή ηλικία (περί τον 3^ο με 4^ο χρόνο ζωής) και η παραγωγή της είναι πλήρης γύρω στον 10^ο ή 15^ο χρόνο. Η αναπαραγωγική της ζωή υπολογίζεται στα 30-40 χρόνια. Η καρποφορία του δένδρου πραγματοποιείται σε βλαστούς του προηγούμενου έτους^[6]. Η αύξηση του καρπού πραγματοποιείται σε 3 στάδια. Το πρώτο στάδιο ίδιας διάρκειας για κάθε ποικιλία, περιλαμβάνει την ταχεία αύξηση του καρπού σε όγκο ο οποίος φτάνει μέχρι το 60% του τελικού μεγέθους. Το δεύτερο στάδιο που ποικίλλει σε διάρκεια ανάλογα με την ποικιλία, περιλαμβάνει σκλήρυνση του ενδοκάρπιου, αύξηση του εμβρύου και πολύ βραδεία αύξηση του καρπού. Τέλος, το τρίτο στάδιο, το οποίο έχει ίση διάρκεια με το πρώτο, χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση του περικαρπίου λόγω διόγκωσης των κυττάρων^[7]. Ο πολλαπλασιασμός γίνεται συνήθως με σπόρο ή εμβολιασμό και σπανιότερα με καταβολάδες και μοσχεύματα ριζών. Η βυσσινιά ανθοφορεί το Μάιο και οι καρποί της ωριμάζουν περί τα τέλη Ιουνίου μέχρι τον Ιούλιο^[6].

1.2. Πεδοκλιματικές συνθήκες και Καλλιεργητικές τεχνικές

Πεδοκλιματικές συνθήκες

Η βυσσινιά ευδοκimeί και αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμα, μέτριας σύστασης, βαθειά, δροσερά εδάφη που διατηρούν την υγρασία τους και κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Το έδαφος, στο οποίο καλλιεργείται το δένδρο αυτό, θα πρέπει να αποστραγγίζεται καλά και να αδρεύεται. Το βέλτιστο pH του εδάφους για την ανάπτυξη της βυσσινιάς κυμαίνεται μεταξύ 6 και 7,5^[7].

Όσον αφορά στις κλιματικές συνθήκες, η βυσσινιά είναι δένδρο που ευδοκimeί σε εύκρατα ψυχρά κλίματα. Έχει υψηλότερη αντοχή σε χαμηλές (μέχρι -25°C) και υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με την κερασιά. Ευδοκimeί και δίνει καλύτερης ποιότητας καρπούς σε δροσερές περιοχές απαλλαγμένες από τους δυνατούς ανέμους και τις πολύ υψηλές θερμοκρασίες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Επιπλέον, οι οφθαλμοί της για να διακόψουν το

λήθαργό τους απαιτούν 600-1400 ώρες ψύχους κάτω από 7°C. Πολλά άνθη και καρποί του δένδρου καταστρέφονται κατά τους ανοιξιάτικους παγετούς^[7].

Καλλιεργητικές τεχνικές

Ο φυτευτικός σύνδεσμος της βυσσινιάς είναι 8-10x8-10 μέτρα. Η κερασιά είναι επικονιαστής της βυσσινιάς το αντίθετο όμως δεν ισχύει πάντα διότι η γύρη της έχει μικρή βλαστική ικανότητα. Συνίσταται σε κτήματα που εμφανίζουν ακαρπία να γίνεται είτε φύτευση δένδρων που θα βοηθήσουν στην επικονίαση σε κενούς χώρους είτε εμβολιασμός των κλαδιών με ποικιλία επικονιαστών^[6].

Η βυσσινιά εάν αφεθεί να αναπτυχθεί ελεύθερα παίρνει αυθορμητα σφαιρικό σχήμα με αποτέλεσμα ως προς τον σκελετό της να μην χρειάζεται ιδιαίτερη φροντίδα κατά το κλάδεμα^[6]. Σημαντικό για το δένδρο αυτό είναι το κλάδεμα καρποφορίας. Όπως προαναφέρθηκε, τα βύσσина αναπτύσσονται πάνω σε βλαστούς της προηγούμενης χρονιάς. Για το λόγο αυτό, κατά το κλάδεμα αφαιρείται περίπου το 20% των κλαδιών ώστε να δημιουργούνται ζωηροί ετήσιοι βλαστοί που φέρουν τόσο ανθοφόρους όσο και ξυλοφόρους οφθαλμούς οι οποίοι σχηματίζουν τις παραγωγικές αιχμές^[5]. Το κλάδεμα δε θα πρέπει να διεξάγεται κατά τους αδρανείς χειμερινούς μήνες.

Γενικά, τα βύσσина απειλούνται από λιγότερα έντομα και ασθένειες σε σύγκριση με τα κεράσια. Μέγαλο μέρος των καρπών καταστρέφεται, παρ' όλα αυτά, από τον παγετό, όπως προαναφέρθηκε, και από τις επιθέσεις των πουλιών, γι' αυτό συνίσταται η χρήση διχτυού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Κατά την συγκομιδή, τέλος, είναι προτιμότερο τα φρούτα να κόβονται πάνω από το δένδρο παρά να συλλέγονται τραβώντας τα κοτσάνια διότι σ' αυτήν την περίπτωση ελλοχεύει ο κίνδυνος να τραυματιστούν οι καρποί.

1.3. Παραγωγή Βύσσινου σε Παγκόσμιο Επίπεδο

Πίνακας 1.1. Οι 10 χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή Βύσσινου ανά τον κόσμο για το 2012 και το 2013^[8]

Εσοδεία 2012		Εσοδεία 2013	
<i>ΧΩΡΑ</i>	<i>ΠΑΡΑΓΩΓΗ (σε τόνους)</i>	<i>ΧΩΡΑ</i>	<i>ΠΑΡΑΓΩΓΗ (σε τόνους)</i>
Τουρκία	187.941	Ουκρανία	200.800
Ρωσία	183.300	Ρωσία	200.000
Πολωνία	175.391	Πολωνία	188.224
Ουκρανία	172.800	Τουρκία	179.752
Ιράν	105.000	ΗΠΑ	133.272
Σερβία	74.656	Ιράν	106.972
Ουγγαρία	53.425	Σερβία	98.271
ΗΠΑ	38.601	Ουγγαρία	53.300
Ουζμπεκιστάν	34.000	Ουζμπεκιστάν	40.000
Αζερμπαϊτζάν	23.085	Αζερμπαϊτζάν	24.674
Σε όλο τον κόσμο	1.152.447	Σε όλο τον κόσμο	1.348.627

Το 2012, η παραγωγή βύσσινου στην Ελλάδα ανήλθε στους 700 τόνους. Μετά την Ελλάδα, στις χώρες με μικρότερη παραγωγή συγκαταλέχθησαν η Σλοβακία, το Καζακστάν, η Σλοβενία και η Βολιβία. Γενικότερα, αξίζει να σημειωθεί ότι για το 2012, η Ευρώπη κατείχε περίπου το 65% (753.970 τόνους) της παγκόσμιας παραγωγής και συγκεκριμένα το 80% της παραγωγής αυτής αφορούσε στην Ανατολική Ευρώπη. Την Ευρώπη ακολούθησε η Ασία με το μεγαλύτερο κομμάτι της παραγωγής να αποδίδεται στην Δυτική Ασία.

Το 2013 όπως και το 2012, οι ίδιες χώρες κατείχαν τις πρώτες 10 θέσεις στην παγκόσμια παραγωγή βύσσινου, όμως υπήρξαν κάποιες ανακατατάξεις στη σειρά αυτών των θέσεων. Το 2013 αυξήθηκε η συνολική παγκόσμια παραγωγή βύσσινου καθώς όλες οι χώρες αύξησαν κατά κάποιο ποσοστό την παραγωγή τους, αξιοσημείωτη όμως ήταν η αύξηση, κατά περίπου 100.000 τόνους, που σημειώθηκε στις ΗΠΑ. Η Ελλάδα και το 2013 παράγαγε 700 τόνους με την Σλοβενία, την Σλοβακία, τη Βολιβία και το Καζακστάν να την ακολουθούν. Το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής περίπου το 63% το κατείχε και πάλι η Ευρώπη με το 79% της παραγωγής αυτής να ανήκει στην Ανατολική Ευρώπη. Την Ευρώπη ακολούθησε η Ασία με την παραγωγή να κατανέμεται κατά το μεγαλύτερο κομμάτι της στην Δυτική και Νότια Ασία.

1.4. Ιστορικά στοιχεία - καταγωγή & εξάπλωση

Η πρώτη περιγραφή του βύσσινου προήλθε από τον Ρωμαίο Πλίνιο τον Πρεσβύτερο το 79μ.Χ., ο οποίος κατέγραψε την παρουσία του φρούτου στην Ιταλία. Όπως προαναφέρθηκε, το βύσσινο θεωρείται προϊόν διασταύρωσης 2 ειδών *Prunus* στις περιοχές της Νοτιοδυτικής Ασίας και της Ανατολικής Ευρώπης, δηλαδή στη ζώνη μεταξύ Κασπίας και Μαύρης Θάλασσας, όπου τα 2 είδη συνυπάρχουν. Η καταγωγή της βυσσινιάς, παρ' όλα αυτά, παραμένει άγνωστη. Πιστεύεται όμως ότι προέρχεται από τα Καυκάσια όρη ή την Ανατολή ή την Ανατολική Ευρώπη^[1]. Στις μέρες μας, το βύσσινο παραμένει ιδιαίτερα δημοφιλές στις περιοχές της Νοτιοδυτικής Ασίας και της Ανατολικής Ευρώπης, οι οποίες κατέχουν τις πρώτες θέσεις στην παραγωγή του φρούτου παγκοσμίως (Παράγραφος 1.3.). Στην Ελλάδα, τα βύσσινα ήταν γνωστά και καλλιεργούνταν από το 300π.Χ.

Τα βύσσινα ήταν ιδιαίτερα δημοφιλή ανάμεσα στους Πέρσες και τους Ρωμαίους, οι οποίοι βοήθησαν στην εξάπλωσή τους στην Βρετανία πολύ πριν τον 1^ο αιώνα μ.Χ. Στην Βρετανία, η καλλιέργειά τους εντάθηκε ιδιαίτερα κατά τον 16^ο αιώνα στην εποχή του Ενρίκου VIII. Μέχρι το 1640, είχαν καταγραφεί πάνω από 20 γνωστές ποικιλίες. Πριν από τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, στην Αγγλία υπήρχαν περισσότερες από 50 ποικιλίες βύσσινου, με πιο γνωστή την ποικιλία Morello. Σήμερα, όμως λίγες μόνο καλλιεργούνται για εμπορικούς λόγους. Στην Αμερική, το πρώτο δένδρο η «Kendish Red» φυτεύτηκε από τους αποίκους της Μασαχουσέτης.

Στο πλαίσιο της ιστορίας του βύσσινου, τέλος, κρίνεται σκόπιμο να γίνει αναφορά σε ένα λαογραφικό στοιχείο. Το βύσσινο διανθίζεται με τις δικές του παροιμίες: «να λείπει το βύσσινο» ή «να μένει το βύσσινο»

Η λαϊκή αυτή έκφραση πιστεύεται ότι γεννήθηκε κάπου μεταξύ 1900 και 1905 και σήμερα δηλώνει άρνηση (εναλλακτικά «να (μου) λείπει το βύσσινο» ή «να μου λείπει»), προέρχεται από ένα περιστατικό που συνέβη σ' ένα καφενείο μεταξύ ενός βουλευτή κι ενός ψηφοφόρου του. *Ο ψηφοφόρος παρήγγειλε στον σερβιτόρο του καφενείου όπου συναντήθηκαν ένα γλυκό βύσσινο, για να κεράσει τον βουλευτή κι έτσι να πετύχει το -τι άλλο;- το ρουσφετάκι του. Ο βουλευτής, όμως, σκληρό καρύδι, δε φαινόταν διατεθειμένος να τον βοηθήσει. Αγανακτισμένος τότε ο ψηφοφόρος, που έβλεπε πως δε θα γινόταν τίποτα, φώναξε δυνατά στον σερβιτόρο: «Να μένει το βύσσινο!»*

1.5. Χρήσεις του Βύσσινου στη μαγειρική

Το βύσσινο είναι ένα φρούτο πλούσιο σε αντιοξειδωτικά, που προσφέρει αρκετά οφέλη για την υγεία των καταναλωτών όπως αναφέρεται στο επόμενο κεφάλαιο. Το βύσσινο διαθέτει πλούσια διατροφική αξία και κατέχει θέση στη Μεσογειακή Διατροφή, η οποία έχει συσχετιστεί με καλύτερη κατάσταση υγείας και υψηλότερη ποιότητα ζωής^[9].

Το βύσσινο ή το σιρόπι του φρούτου χρησιμοποιούνται εκτενώς για την Παρασκευή ηδύποτων. Στο Βέλγιο, συγκεκριμένα, το βύσσινο χρησιμοποιείται στην παραγωγή μιας φυσικώς ζυμωμένης μπίρας, της *kriek lambic*. Στην Ελλάδα, στην Κύπρο και στην Τουρκία είναι πολύ διαδεδομένο το γλυκό του κουταλιού που παρασκευάζεται κατά τον αργό βρασμό των βύσσινων (χωρίς κουκούτσι) μαζί με τη ζάχαρη. Το σιρόπι που παράγεται καταναλώνεται στην συνέχεια ως *vyssináda*, ένα ρόφημα που προκύπτει κατά την αραιώση του σιροπιού με παγωμένο νερό. Ιδιαίτερα αγαπητός είναι βέβαια και ο χυμός τους βύσσινου. Τέλος, η κομπόστα βύσσινου ή το γλυκό του κουταλιού ή σπανιότερα τα αποξηραμένα βύσσιννα προστίθενται σε τάρτες, πίτες, κέικ ίσως και σε πιάτα με χοιρινό και βόειο κρέας.

Στην Ελλάδα το βύσσινο καταναλώνεται ως γλυκό του κουταλιού, λικέρ, κομπόστα ή και χυμός. Οι επιλογές αυτές, όμως, περιέχουν αρκετή ζάχαρη. Η απευθείας κατανάλωση του βύσσινου ως φρούτου εν γένει δεν προτιμάται, ενώ το ίδιο ισχύει και για την προσθήκη του σε edésματα λόγω της όξινης γεύσης του. Για το λόγο αυτό και για να αποφεύγονται οι περιττές θερμίδες που προσθέτει η ζάχαρη, οι καταναλωτές θα μπορούσαν να προσλάβουν βιοδραστικά συστατικά του φρούτου ή/και να επωφεληθούν από τις ευεργετικές ιδιότητες που αυτό προσφέρει με εναλλακτικούς τρόπους. Για παράδειγμα, η προσθήκη εκχυλισμάτων βύσσινου σε φυσικά καλλυντικά προϊόντα μπορεί να προσφέρει στους καταναλωτές αρκετά οφέλη χωρίς να χρειάζεται να το καταναλώσουν.

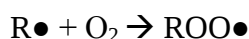
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΒΥΣΣΙΝΟ

2.1. Διαδικασία της οξειδωσης και αντιοξειδωτικά

Χημικά, κάθε συστατικό που μπορεί να προσλάβει ηλεκτρόνια, συμπεριλαμβανομένου του οξυγόνου, ονομάζεται οξειδωτικό ή οξειδωτικό μέσο. Αντίθετα, κάθε συστατικό που προσφέρει ηλεκτρόνια ονομάζεται αναγωγικό ή αναγωγικό μέσο. Ο όρος οξείδωση αναφέρεται στη χημική αντίδραση κατά την οποία λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα αναγωγικό σ' ένα οξειδωτικό μέσο^[10]. Κατά την οξειδωτική διαδικασία μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι δραστικά μόρια, που αναζητούν και δεσμεύουν ηλεκτρόνια^[11].

Η διαδικασία παραγωγής ελεύθερων ριζών ακολουθεί την παρακάτω διαδικασία:

- 1) Έναρξη: Παραγωγή ελεύθερης ρίζας R●. Εκλυτικοί παράγοντες είναι η υψηλή θερμοκρασία, η υπεριώδης ακτινοβολία καθώς και χημικοί παράγοντες
- 2) Διάδοση. Οι ελεύθερες ρίζες που έχουν παραχθεί αντιδρούν με το οξυγόνο δημιουργώντας νέες ελεύθερες ρίζες. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις δημιουργούν συνεχώς νέες ελεύθερες ρίζες.



- 3) Τερματισμός. Η αλυσιδωτή αντίδραση σταματά όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς αδρανή προϊόντα, προϊόντα τα οποία δεν παράγουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες^[12].

Για την προστασία των κυττάρων και των οργανικών συστημάτων από τις ελεύθερες ρίζες, το ανθρώπινο σώμα έχει αναπτύξει ένα σύνθετο αντιοξειδωτικό σύστημα. Αντιοξειδωτικά είναι τα μόρια τα οποία είναι ικανά να σταθεροποιούν ή να απενεργοποιούν ελεύθερες ρίζες πριν επιτεθούν στα κύτταρα^[11].

Τα αντιοξειδωτικά ταξινομούνται με διάφορους τρόπους. Ένας τρόπος κατάταξης αφορά στην ταξινόμησή τους σε φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά. Παραδείγματα φυσικών αντιοξειδωτικών είναι:

- ο Βιταμίνες: Βιταμίνη C, Βιταμίνη E
- ο Φυτοχημικά: φαινολικά συστατικά, καροτενοειδή

Στα συνθετικά αντιοξειδωτικά ανήκουν:

- ο Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA)

- Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) κ.α.

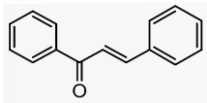
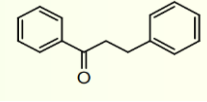
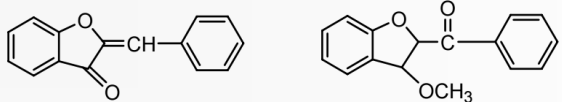
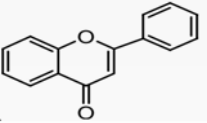
Στα τρόφιμα οι κύριες πηγές αντιοξειδωτικών είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, οι σπόροι, τα όσπρια, οι ξηροί καρποί, αλλά και κάποια κρέατα, πουλερικά και ψάρια^[13].

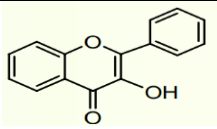
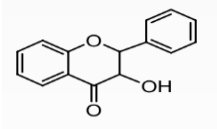
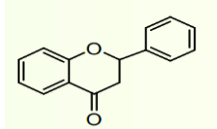
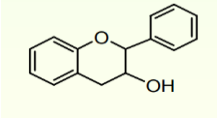
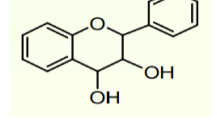
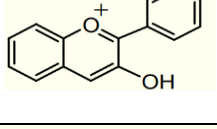
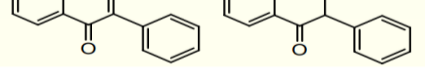
2.2. Οι φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες, όπως παλαιότερα επικρατούσε να ονομάζονται, συνιστούν μία από τις πιο πολυάριθμες ομάδες φυτικών συστατικών, που ταξινομούνται βάσει της πηγής προέλευσης, της χημικής δομής και των βιολογικών δράσεων^[14]. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και φέρουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς και συχνά ετεροκυκλικούς δακτυλίου^[15]. Οι πολυφαινόλες απαντώνται στα τρόφιμα συχνά συζευγμένες με σάκχαρα ή/και οργανικά οξέα.

Κατά Harborne, οι φαινολικές ενώσεις ταξινομούνται ανάλογα με τη βασική χημική τους δομή στις εξής κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, κινναμωμικά οξέα, κουμαρίνες και ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες και λιγνίνες. Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα των πολυφαινόλων, η οποία περιλαμβάνει 13 υποκατηγορίες με περισσότερα από 5000 μέλη^[16]. Οι σημαντικότερες κατηγορίες φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2.1. Κατάταξη φλαβονοειδών^[16]

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΣ	ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ
Χαλκόνες	
Διϋδροχαλκόνες	
Χρυσόνες	
Φλαβόνες	

Φλαβονόλες	
Διϋδροφλαβονόλες	
Φλαβανόνες	
Φλαβανόλες	
Φλαβανοδιόλες	
Ανθοκυανιδίνες	
Ισοφλαβονοειδή	

2.3. Πηγές φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτικά τρόφιμα. Πλούσιες πηγές αυτών συνιστούν τα φρούτα, τα λαχανικά, τα προϊόντα ολικής άλεσης, τα δημητριακά, τα όσπρια και οι ξηροί καρποί. Περιέχονται ακόμη σε ποτά και ροφήματα, όπως το κόκκινο κρασί, το τσάι, ο καφές, το κακάο και στο ελαιόλαδο^[17]. Η περιεκτικότητα των τροφίμων σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται από την ποικιλία, τις πεδοκλιματικές συνθήκες (φως, θερμοκρασία κ.α.), την επεξεργασία και την αποθήκευση. Η ημερησία πρόσληψη, επίσης, ποικίλλει ανάλογα με το είδος και την ποσότητα των τροφίμων που καταναλώνονται^[18].

2.4. Χημική σύσταση & αντιοξειδωτικά βύσσινου

Το νερό συνιστά το μεγαλύτερο ποσοστό του βάρους του φρέσκου βύσσινου, όπως συμβαίνει σε όλα τα φρέσκα φρούτα. Ως προς τα μικροσυστατικά του περιέχει περίπου 1g πρωτεΐνης, 0,3g λίπους, 12,2g υδατανθράκων και 1,6g φυτικών ινών ανά 100g^[19]. Η υπόξινη

γεύση αυτού οφείλεται στην παρουσία του μηλικού οξέος^[18], σε ποσοστό 1,15-1,78% όπως μετρήθηκε σε 11 διαφορετικές ποικιλίες βύσσινου στην Ουγγαρία^[20]. Η αποδοχή των καταναλωτών για το βύσσινο φαίνεται να βασίζεται στο λόγο μεταξύ της περιεκτικότητας σακχάρων και οξέων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα βύσσινα περιέχουν περίπου 8-12g υδατανθράκων ανά 100g, ενώ τα κεράσια έχουν υψηλότερο περιεχόμενο γεγονός που τα καθιστά πιο γλυκά^[18]. Οι 11 ποικιλίες στην Ουγγαρία, συγκεκριμένα, αναλύθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε επιμέρους σάκχαρα και βρέθηκαν να περιέχουν 6,1-9,1g γλυκόζης και 3,5-4,9g φρουκτόζης/ 100g^[20]. Το βύσσινο περιέχει το πτητικό συστατικό βενζαλδεϋδη, στο οποίο οφείλεται το χαρακτηριστικό του άρωμα^[21]. Αναφορικά με την ανάλυση των μικροσυστατικών του βύσσινου, με εξαίρεση τα φαινολικά συστατικά, οι μελέτες που διαθέτουμε είναι ελάχιστες. Σύμφωνα με τους *Ferretti et al., 2010*, το βύσσινο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης Α και β-καροτενίου, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2.2. Περιεκτικότητα βύσσινου σε φυτοχημικά^[18, 22]

	Βύσσινο (/100g)
Βιταμίνη C	10 mg
Νιασίνη	0,4 mg
Παντοθενικό οξύ	0,1 mg
Βιταμίνη Α	1283 IU
Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)	0,1 mg
Βιταμίνη Κ	2,1 µg
Β-καροτένιο	770 µg
Λουτεΐνη & Ζεαξανθίνη	85 µg

Για το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), που έχει μελετηθεί περισσότερο, η περιεκτικότητα μπορεί να φτάσει τα 22,2mg. /100g φρέσκου βύσσινου^[23]. Τα βύσσινα περιέχουν ακόμη μελατονίνη. Συγκεκριμένα, οι *Burkhardt et al. 2001*, βρήκαν περίπου 2,1ng μελατονίνης/g και 13,5ng μελατονίνης/g βύσσινου ποικιλίας Balaton και Montmorency αντίστοιχα^[24].

Τα βύσσινα είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά^[25]. Αυτά βρίσκονται κυρίως στο φλοιό του φρούτου και επηρεάζουν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά^[18]. Τα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα οι φλαβαν-3-όλες αποτελούν την κύρια τάξη φαινολικών συστατικών που περιέχεται στο βύσσινο αντιπροσωπεύοντας περίπου το 40% των συνολικών φαινολικών ενώσεων. Οι ανθοκυανίνες και τα υδροξυκινναμωμικά οξέα ανέρχονται περίπου στο 25%^[23]. Το βύσσινο περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες ολικών φαινολικών συστατικών από το κεράσι λόγω

της υψηλότερης περιεκτικότητάς του σε ανθοκυανίνες και υδροξυκιναμμωμικά οξέα^[26], αν και φαίνεται πως υπάρχουν κάποιες ανακολουθίες σε επίπεδο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας με αποτέλεσμα οι συγκρίσεις να είναι ακόμη ασαφείς^[19]. Η κυανιδίνη είναι η κύρια ανθοκυανίνη που περιέχεται στο βύσσινο. Στο φρούτο έχουν ανιχνευτεί διάφορες ανθοκυανίνες όπως ο 3-(^{2Z}-γλυκοζυλο-ρουτινοζίτης) της κυανιδίνης, ο 3-*O*-ρουτινοζίτης της πεονιδίνης, ο 3-(^{2Z}-ξυλοζυλο-ρουτινοζίτης) της κυανιδίνης, ο 3-*O*-σοφοροζίτης της κυανιδίνης, ο 3-*O*-γλυκοζίτης της κυανιδίνης και ο 3-*O*-ρουτινοζίτης της κυανιδίνης^[27]. Η κυρίαρχη ανθοκυανίνη στο βύσσινο είναι ο 3-(^{2Z}-γλυκοζυλο-ρουτινοζίτης) της κυανιδίνης¹, η οποία ακολουθείται από τον 3-*O*-ρουτινοζίτη της κυανιδίνης², τον 3-*O*-σοφοροζίτη της κυανιδίνης³ και τέλος από τον 3-*O*-γλυκοζίτη της κυανιδίνης^{4[28]}. Αυτές οι αναλογίες διαφοροποιούνται ανάλογα με την ποικιλία του βύσσινου^[29].

2.4.1. Περιεχόμενο βύσσινου σε φαινολικά και επιμέρους συστατικά

Το περιεχόμενο των βύσσινων σε φαινολικές ενώσεις ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την ποικιλία, αλλά και μέσα στην ίδια ποικιλία ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, επεξεργασίας και αποθήκευσης (Παράγραφος 2.4.). Οι ελληνικές ποικιλίες δεν έχουν μελετηθεί ως προς τη χημική τους σύσταση.

Γενικά, η βιβλιογραφία δίνει μεγάλο εύρος τιμών στο φαινολικό περιεχόμενο, στο περιεχόμενο ολικών αλλά και επιμέρους ανθοκυανινών των διαφόρων ποικιλιών βύσσινων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3. Περιεχόμενο βύσσινων σε φαινολικά συστατικά και ανθοκυανίνες

Μελέτες	# ποικιλιών (& περιοχή)	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	Ολικές ανθοκυανίνες	Επιμέρους ανθοκυανίνες & βιβλιογραφία
<i>Wojdylo et al. 2014</i>	33	1539,4-2982,5/100g ξηρού βάρους		[23]
<i>Mitic et al. 2012</i>	3 (Σερβία-2008)	72,1-140,8mg GA/100g	39-55,8mg C3GE/100g	[30]
	3 (Σερβία-2009)	87,8-159mg GA/100g	48,2-64,4mg C3GE/100g	--

	3 (Σερβία-2010)	79-146,1mg GA/100g	45,2-81,6mg C3GE/100g	--
<i>Khoo et al. 2011</i>	34	74±2,5 - 754±13,4mg GA/100g	21±0,5 - 272±4,1mg C3GE/100g	[25]
<i>Papp N., et al. 2010</i>	11 (Ουγγαρία)	Έως 49mg GA/ mL	11,3-93,5mg/100g	[20]
<i>Ferretti et al. 2010 (Serrano et al. 2009 & Kim DO et al. 2005)</i>	4	162±1 - 132±8mg GA/100g	45±2,3 - 109±6mg C3GE/100g	[18, 26, 31]
<i>Blando et al. 2004</i>	3		27,8-80,4mg/100g	[28] 62,23-67,58% ¹ 26,84-33,32% ² 2,91-3,87% ³ 1,31-1,87% ⁴

Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του βύσσινου κυμαίνεται μεταξύ 72,1mg και 754mg GA/100g νωπού φρούτου ανάλογα με την ποικιλία. Παράλληλα, το περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες ποικίλλει από 21mg μέχρι 272mg C3GE/100g.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΟΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΥΣΣΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

3.1. Ευεργετικές δράσεις των φαινολικών συστατικών στην υγεία

Οι φαινολικές ενώσεις, όπως προαναφέρθηκε, είναι αντιοξειδωτικά που παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Τα τελευταία 20 χρόνια, έχει συλλεχθεί ένας σημαντικός όγκος δεδομένων σε σχέση με τα πιθανά ευεργετικά οφέλη των φαινολικών ενώσεων στην υγεία. Συγκεκριμένα, η συχνή κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές^[32], η οστεοπόρωση και ο σακχαρώδης διαβήτης^[33]. Παρ' όλα αυτά, η βιβλιογραφία στο σύνολό της καταλήγει ότι ακόμη τα στοιχεία είναι ανεπαρκή για να μπορέσουν να υποστηριχθούν σαφείς και αδιαμφισβήτητες θετικές επιδράσεις στην υγεία^[32, 34]. Προς την κατεύθυνση αυτή απαιτούνται περισσότερες μακροχρόνιες, διπλά τυφλές, τυχαιοποιημένες και ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες πίστευαν ότι οι φαινολικές ενώσεις ασκούν άμεσα την αντιοξειδωτική τους δράση και προστατεύουν τα κύτταρα δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες. Η δράση τους όμως φαίνεται να είναι πιο περίπλοκη καθώς οι ενώσεις αυτές φαίνεται να εμπλέκονται στο κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα ανταποκρίνονται στα φαινολικά συστατικά κυρίως μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς και ένζυμα, μια διαδικασία η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου επάγοντας μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων^[33].

Όσον αφορά στις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινολών, που έχουν μελετηθεί εκτενώς^[35], πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωσή τους μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου^[36-38]. Σε προοπτικές μελέτες, για παράδειγμα, έχει φανεί ότι η πρόσληψη φλαβονολών, φλαβονών και φλαβανολών συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, ενώ η πρόσληψη ανθοκυανινών με μειωμένη θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων^[39,40]. Οι πολυφαινόλες ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση μέσω αντιοξειδωτικών (αναστολή της οξείδωσης της LDL) και αντιφλεγμονωδών μηχανισμών, μέσω αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αλλά και βελτιώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία^[41].

Όσον αφορά στις ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών ενάντια στον καρκίνο, τα αποτελέσματα των μελετών ποικίλλουν. Πολλές επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διερευνήσει τη σχέση ανάμεσα στη συχνή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και την εμφάνιση καρκίνου

επιβεβαιώνουν τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών^[42-44]. Αντίθετα, άλλες μελέτες, έχουν καταλήξει ότι η κατανάλωση φαινολικών συστατικών δεν επιδρά στην συχνότητα εμφάνισης καρκίνων στο στομάχι, το πάγκρεας και την ουροδόχο κύστη^[45-47]. Από πειράματα *in vitro* σε κυτταρικές σειρές φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες συνήθως δρουν ενάντια της καρκινογένεσης και της αύξησης των όγκων^[48]. Οι κλινικές μελέτες, όμως, που έχουν διερευνήσει τη σχέση των πολυφαινολών με την πρόληψη και εμφάνιση του καρκίνου είναι περιορισμένες. Είναι πιθανόν, τελικά, η κατανάλωση συγκεκριμένων φρούτων και λαχανικών ή συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων να ασκεί ευεργετικές δράσεις ενάντια στην ανάπτυξη καρκίνου, ιδιαίτερα στο γαστρεντερικό σωλήνα, όπου οι συγκεντρώσεις τους είναι αυξημένες. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει προστατευτική δράση ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου^[49, 50], αλλά και ενάντια στον καρκίνο της στοματικής κοιλότητας^[51]. Οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται να ασκούν αντικαρκινικές δράσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η αναστολή της αύξησης του όγκου, η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, η αποτοξίνωση πρόδρομων καρκινικών ουσιών και η αναστολή της οξειδωσης του DNA^[34].

Το οξειδωτικό στρες και η καταστροφή μακρομορίων του εγκεφάλου αποτελούν βασικές διαδικασίες στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, όπως η νόσος Parkinson και η νόσος Alzheimer συνιστούν μεγάλο πρόβλημα στις σύγχρονες κοινωνίες με τον ολοένα αυξανόμενο γηραιό πληθυσμό^[32]. Μέσα από μελέτες έχει φανεί ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις, τουλάχιστον 3 φορές την εβδομάδα μπορεί να συμβάλει στην καθυστέρηση έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer^[52]. Συγκεκριμένα, η συχνή κατανάλωση τροφίμων ή ροφημάτων πλούσιων σε φλαβονοειδή έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου εμφάνισης άνοιας κατά 50% και διατήρηση της γνωσιακής λειτουργίας κατά τη γήρανση^[32]. Από την άλλη, η μελέτη των *Aguilano et al. 2008*, κατέληξε ότι η χορήγηση πολυφαινολών προσφέρει προστασία ενάντια της νόσου Parkinson^[53]. Η δράση αυτή έχει αποδοθεί και στα τρόφιμα που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή^[32]. Παράλληλα, σημαντικά είναι τα ευρήματα, μέσω μελετών σε ζωικά πρότυπα και ανθρώπους, που έχουν αποδώσει ευεργετικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων στην μνήμη, τη μάθηση και τη γενικότερη γνωσιακή ικανότητα^[32]. Οι ενώσεις αυτές ασκούν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητές τους με πληθώρα μηχανισμών, όπως μέσω αλληλεπίδρασης με την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω νευρώνων και γλοιακών κυττάρων, μέσω επίδρασης στην περιφερική και εγκεφαλική ροή του αίματος καθώς και μέσω περιορισμού της νευρολογικής βλάβης ή/και των απωλειών που προκαλούν οι νευροτοξίνες κατά το οξειδωτικό στρες^[34].

Τέλος, στις φαινολικές ενώσεις έχουν αποδοθεί κι άλλες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, όπως αντιδιαβητικές, αντιγηραντικές, αντιμικροβιακές, κατά της οστεοπόρωσης, του άσθματος και της καταστροφής του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία. Οι αντιδιαβητικές δράσεις έχουν μελετηθεί πολύ και οι περισσότερες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ωφέλιμες ιδιότητες των πολυφαινολών στην πρόληψη και διαχείριση του σακχαρώδους διαβήτη. Παρ' όλα αυτά, απαιτούνται περισσότερες κλινικές δοκιμές με σκοπό να καθοριστεί η βέλτιστη δόση και διάρκεια χορήγησης φαινολικών συστατικών σε διαβητικούς ασθενείς^[54]. Οι υπόλοιπες δράσεις έχουν μελετηθεί λιγότερο ή περισσότερο και η βιβλιογραφία έχει αρχίσει να τις επιβεβαιώνει. Χαρακτηριστικά θα γίνει αναφορά στην προστασία του δέρματος. Μελέτη σε ζωικά πρότυπα έδειξε ότι οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο τσάι, είτε σε τοπική είτε σε από του στόματος χορήγηση, βελτίωσαν την καταστροφή του δέρματος, το ερύθημα και τη λιπιδική υπεροξειδωση που είχε προκληθεί μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία^[55]. Επίσης, από μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχει φανεί ότι οι φαινολικές ενώσεις καθώς και οι ανθοκυανίνες που περιέχονται σ' αυτές, ασκούν αντικαρκινογόνο δράση κατά την επίδραση της ακτινοβολίας. Γενικά, προτείνεται ότι η χρήση πολυφαινολών σε συνδυασμό με αντηλιακά και κρέμες για το δέρμα αποτελεί μια καλή στρατηγική για την πρόληψη ασθενειών του δέρματος λόγω υπερβολικής έκθεσης στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία^[56].

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ύπαρξη μια λεπτής ισορροπίας ανάμεσα στο κατά πόσο οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή θα δράσουν ως αντιοξειδωτικά ή ως προ-οξειδωτικά επάγοντας οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις σε διάφορα βιολογικά συστήματα. Ο μηχανισμός οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, πιστεύεται όμως ότι σ' αυτόν εμπλέκονται μεταλλικά ιόντα όπως ο σίδηρος. Συνιστάται, λοιπόν να αποφεύγεται η κατανάλωση φαινολικών ενώσεων σε εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες μέσω συμπληρωμάτων και αυτές να προσλαμβάνονται με μέτρο μέσω μιας ισορροπημένης διατροφής^[57].

3.2. Ευεργετικές δράσεις των ανθοκυανινών στην υγεία

Οι ανθοκυανίνες είναι αντιοξειδωτικά που ανήκουν στην τάξη των πολυφαινολών και συγκεκριμένα στην κατηγορία των φλαβονοειδών, όπως προαναφέρθηκε. Σ' αυτές οφείλεται το φωτεινό πορτοκαλί, κόκκινο, μωβ ή μπλε χρώμα κάποιων φρούτων, λαχανικών ή/και δημητριακών καρπών^[58]. Οι ανθοκυανίνες απαντώνται φυσικά στα φυτά συζευγμένες με σάκχαρα. Οι ελεύθερες ανθοκυανίνες – τα άγλυκα ανάλογα- ονομάζονται ανθοκυανιδίνες^[59]. Η κατανάλωσή τους υπολογίζεται ότι είναι 9 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την κατανάλωση των υπόλοιπων φλαβονοειδών^[60].

Στις ανθοκυανίνες, μέσω επιδημιολογικών, *in vitro* μελετών και κλινικών μελετών, έχουν αποδοθεί πολλά πιθανά ευεργετικά οφέλη για την υγεία. Συγκεκριμένα, η συχνή κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου, σακχαρώδους διαβήτη, παχυσαρκίας, βελτίωση της όρασης και της εγκεφαλικής λειτουργίας. Τα ευεργετικά αυτά οφέλη έχουν αποδοθεί εν μέρει στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των πολυφαινολών^[60-63]. Αρκετές φορές οι δράσεις αυτές αποδίδονται σε μεταβολίτες των συστατικών αυτών.

Όσον αφορά στις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των ανθοκυανινών, οι *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι τα αντιοξειδωτικά αυτά βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και προστατεύουν από αγγειακές παθήσεις^[63]. Από μελέτες σε ζωικά πρότυπα έχει φανεί ότι οι ανθοκυανίνες επηρεάζουν την αγγειακή αντιδραστικότητα, δηλαδή την ικανότητα των λείων μυών των αγγείων να συστέλλονται^[60]. Συγκεκριμένα, σε μελέτη με αρουραίους υπό συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, η χορήγηση ανθοκυανινών σε χαμηλές δόσεις φάνηκε να ασκεί αντιοξειδωτικές δράσεις και να περιορίζει τη βλάβη λόγω ισχαιμίας, να αυξάνει τη ροή του αίματος και να μειώνει τη διάρκεια των αρρυθμιών^[64]. Οι επιδημιολογικές μελέτες σχεδόν στο σύνολό τους επιβεβαιώνουν την αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση ανθοκυανινών και στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σε κλινικές μελέτες έχει φανεί ότι η κατανάλωση ανθοκυανινών οδηγεί σε μείωση της LDL χοληστερόλης και της οξειδωμένης LDL και σε αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος σε ασθενείς^[59, 63], αλλά και σε υγιείς εθελοντές. Παρ' όλα αυτά απαιτούνται μεγαλύτερες, μακροχρόνιες, τυχαιοποιημένες και ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές με σκοπό να επιβεβαιωθεί πλήρως η ποσότητα ανθοκυανινών που απαιτείται για τη βέλτιστη καρδιαγγειακή υγεία^[60]. Οι ανθοκυανίνες φαίνεται να δρουν μέσω πολλών μηχανισμών, όπως αντιαιμοπεταλιακών καθώς και αντιφλεγμονωδών μειώνοντας τα επίπεδα της CRP στον ορό και του TNF-α στο ενδοθήλιο. Παράλληλα, φαίνεται να περιορίζουν τη βλάβη στο μυοκάρδιο λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και να αναστέλουν τη διαδικασία της αθηρογένεσης παρεμβαίνοντας στη διαδικασία της φλεγμονής^[58].

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των ανθοκυανινών έχουν μελετηθεί εκτενώς από διάφορους ερευνητές, παρ' όλα αυτά τα στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπους είναι ελλιπή^[63]. Οι ιδιότητες αυτές έχουν επιβεβαιωθεί πλήρως από μελέτες σε κυτταρικές σειρές και αποδίδονται σε διάφορους μηχανισμούς: σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου μπλοκάροντας τις φάσεις G1/G0 και G2/M, σε επαγωγή της απόπτωσης και της αντιαγγειογένεσης, σε αναστολή της οξείδωσης του DNA, σε επαγωγή των ενζύμων της φάσης II για αποτοξίνωση, σε αναστολή των καρκινογόνων ουσιών (αντιμεταλλαξιγόνο αποτέλεσμα) και σε αναστολή των ενζύμων COX-

2^[61]. Επιπλέον, έχει φανεί ότι οι ανθοκυανίνες αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκίνου σε ζωικά πρότυπα στα οποία είτε έχει προκληθεί καρκίνος είτε έχουν κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Οι κύριες αντικαρκινικές ιδιότητες εκδηλώνονται στον γαστρεντερικό σωλήνα όπου οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανινών είναι οι υψηλότερες, ενώ μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ευεργετικά οφέλη και σε καρκίνο του δέρματος σε ποντίκια^[61, 63]. Οι επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους δεν παρέχουν πειστικές αποδείξεις για τις αντικαρκινικές δράσεις των ανθοκυανινών, φαίνεται, όμως, ότι περιορίζουν κάποιες παραμέτρους που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες^[61].

Μια διατροφή χαμηλή σε λίπος και πλούσια σε αντιοξειδωτικά σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη και παχυσαρκίας^[65-67]. Αν και υπάρχουν ελάχιστα κλινικά δεδομένα από ανθρώπους για τις αντιδιαβητικές ιδιότητες των ανθοκυανινών, παρ' όλα αυτά, μέσω *in vitro* μελετών και μελετών σε ζωικά πρότυπα έχουν αρχίσει να επιβεβαιώνονται πιθανές ευεργετικές δράσεις κατά του διαβήτη. Σε μελέτη με β-κύτταρα παγκρέατος τρωκτικών, οι ανθοκυανίνες και οι ανθοκυανιδίνες φάνηκαν να αυξάνουν την έκκριση ινσουλίνης, ενώ σε μια άλλη μελέτη, οι ανθοκυανίνες φάνηκαν να προστατεύουν τα β-κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί η γλυκόζη^[63]. Σημαντικό εύρημα είναι ακόμη ότι η κυανιδίνη και ο 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης βρέθηκαν να επάγουν γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων σε ανθρώπινα λιποκύτταρα^[68]. Επιπλέον, η πρόσληψη ανθοκυανινών έχει φανεί να μειώνει την μεταγευματική υπεργλυκαιμία και να αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε ζωικά πρότυπα με διαβήτη τύπου II^[69, 70]. Από την άλλη, όσον αφορά στις δράσεις των ανθοκυανινών κατά της παχυσαρκίας, αυτές αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 2003^[71]. Από τότε πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες σε ζωικά πρότυπα, κυρίως ποντίκια, οι οποίες επιβεβαιώνουν ότι οι ανθοκυανίνες εμποδίζουν σε κάποιο βαθμό την αύξηση βάρους και τη συσσώρευση λίπους μετά την κατανάλωση ενός λιπαρού γεύματος^[59]. Οι ευεργετικές ιδιότητες των ανθοκυανινών κατά της παχυσαρκίας αποτελούν ένα δυναμικό πεδίο έρευνας στο οποίο θα πρέπει να διευκρινιστούν οι δράσεις των επιμέρους ανθοκυανινών, να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά και να διεξαχθούν τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές με σκοπό να επικυρωθούν οι μέχρι τώρα παρατηρήσεις^[59, 63].

Τα ευεργετικά οφέλη των ανθοκυανινών για την όραση ήταν από τα πρώτα που παρατηρήθηκαν, ήδη από τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο όταν οι αεροπόροι της Βρετανικής βασιλικής πολεμικής αεροπορίας έτρωγαν μαρμελάδα βατόμουρου για να βελτιώσουν την νυχτερινή τους όραση. Μετά από ανέκδοτες εκθέσεις που κυκλοφορούσαν για 60 χρόνια, ήρθαν πολλές μελέτες για να επιβεβαιώσουν τις σημαντικές επιδράσεις των ανθοκυανινών στην

βελτίωση της όρασης^[62]. Κατ' αρχάς, η επιστήμη της οφθαλμολογίας έχει αναδείξει τις αντιοξειδωτικές δράσεις των ανθοκυανινών πάνω στο επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς. Σε ζωικά πρότυπα, στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκαν οι ευεργετικές επιδράσεις των ανθοκυανινών του βατόμουρου στην όραση, ενώ οι ανθοκυανίνες των σταφυλιών φάνηκαν να επάγουν την αγγειοχάλαση σε κύτταρα λείου μυός^[63]. Σε μια άλλη μελέτη με ζωικά μοντέλα φάνηκε ότι οι ανθοκυανίνες του φραγκοστάφυλου, οι οποίες διανέμονται στον οφθαλμικό ιστό^[72], συνέβαλαν στην αναστολή της παροδικής μυωπίας, στην βελτίωση της νυχτερινής όρασης, στη μείωση της κόπωσης του οφθαλμού και στην αύξηση της ροής αίματος στον αμφιβληστροειδή χιτώνα μετά από γλαύκωμα^[63]. Όσον αφορά στις μελέτες σε ανθρώπους, οι παλαιότερες μελέτες επιβεβαίωναν θετικά αποτελέσματα, ενώ οι νεότερες εξάγουν αντικρουόμενα συμπεράσματα ίσως διότι διεξάγονται υπό πιο αυστηρές πειραματικές συνθήκες^[62]. Άλλες μελέτες, για παράδειγμα, κατέληξαν ότι δεν υπήρξε καμιά βελτίωση στη όραση και την προσαρμογή στο σκοτάδι^[62], ενώ σε μια τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή τα αποτελέσματα ήταν θετικά^[59]. Ακόμη, σε μια μελέτη με 30 ασθενείς με γλαύκωμα, η πρόσληψη ανθοκυανινών φάνηκε να αυξάνει την ροή αίματος στον αμφιβληστροειδή^[73]. Τέλος, έχει φανεί ότι τα φλαβονοειδή προλαμβάνουν ή καθυστερούν την εμφάνιση καταρράκτη που προκαλείται λόγω σακχαρώδους διαβήτη, ενώ σε 5 μονομερή ανθοκυανινών σταφυλιού έχουν αποδοθεί ιδιότητες αναστολής της θολερότητας του φακού^[62].

Τέλος, στις ανθοκυανίνες έχουν αποδοθεί πολλές ακόμη ευεργετικές ιδιότητες. Αυτές αφορούν αντιμικροβιακές δράσεις, δράσεις βελτίωσης της εγκεφαλικής λειτουργίας, πρόληψης νευρολογικών διαταραχών, προστασίας του δέρματος, στο πλαίσιο της δράσης των πολυφαινόλων γενικότερα, και άλλες. Σε μελέτες με ζωικά πρότυπα έχει φανεί ότι η πρόσληψη ανθοκυανινών καθυστερεί την έναρξη έκπτωσης της νευρικής λειτουργίας, καθώς επίσης βελτιώνει τη γνωστική και κινητική ικανότητα. Οι δράσεις αυτές αποδίδονται στην αναστολή της φλεγμονής των νεύρων που προκαλείται με την πάροδο της ηλικίας^[59]. Ακόμη, σε μια κλινική μελέτη με άτομα ηλικίας $76,2 \pm 5,2$ ετών, η κατανάλωση χυμού βατόμουρου για 12 εβδομάδες οδήγησε σε ενίσχυση της μνήμης^[74]. Οι ανθοκυανίνες, τέλος, φαίνεται να ασκούν αντιμικροβιακές δράσεις μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως προκαλώντας μορφολογικές βλάβες στα βακτηριακά κύτταρα ή καταστρέφοντας την ακεραιότητα των κυττάρων, αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων μέσω αντιδράσεων με σουλφυδρυλικές ομάδες ή αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες οδηγώντας τα βακτηριακά κύτταρα σε απώλεια της λειτουργικότητάς τους και στερώντας τα υποστρώματα που είναι απαραίτητα για τη μικροβιακή ανάπτυξη^[63]. Οι ανθοκυανίνες δεν επιφέρουν αρνητικές συνέπειες στην υγεία και ο κίνδυνος

τοξικότητας είναι χαμηλός λόγω της χαμηλής τους απορρόφησης. Παρ' όλα αυτά, δεν θα πρέπει να γίνεται υπέρμετρη κατανάλωσή τους μέσω συμπληρωμάτων^[75].

3.3. Ευεργετικές ιδιότητες του βύσσινου στην υγεία

Οι έρευνες που υπάρχουν, μέχρι στιγμής, στη βιβλιογραφία έχουν εξάγει κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα αναφορικά με τα οφέλη είτε του βύσσινου (ως ολόκληρο φρούτο) είτε του χυμού βύσσινου στην υγεία. Οι ευεργετικές αυτές ιδιότητες συνοψίζονται



στις παρακάτω δράσεις: αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, κατά του μεταβολικού συνδρόμου και του διαβήτη, κατά του πόνου και κατά των προβλημάτων του ύπνου.

3.3.1. Αντιοξειδωτικές δράσεις

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των βύσσινων ξεκίνησαν να μελετώνται πριν από περίπου 2 δεκαετίες, μια εποχή κατά την οποία υπήρχε έντονο ενδιαφέρον για το αν τα φυτοχημικά συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες^[76]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι από την εποχή εκείνη γινόταν προσθήκη βύσσινου σε βόειο κρέας κατά το τηγάνισμα που συνέβαλλε στην προστασία του κρέατος ενάντια στην τάγγιση και μείωνε την παραγωγή ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών.

Σε μελέτη των Wang et al. 1999, διερευνήθηκαν οι *in vitro* αντιοξειδωτικές ιδιότητες των ανθοκυανινών και της ελεύθερης κυανιδίνης που απομονώθηκαν από βύσσινα. Στην έρευνα αυτή, 2mM ελεύθερης κυανιδίνης και γλυκοζυλιωμένων παραγώγων αυτής μόνο-, δι- και τρι-σακχαριτών φάνηκαν να αναστέλουν κατά 57%, 30%, 70%, και 75%, αντίστοιχα, την υπεροξειδωση των λιπιδίων σε λιποσώματα, στα οποία είχε προστεθεί σίδηρος ως προ-οξειδωτικό. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν συγκρίσιμα με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των BHT και BHA που είναι εμπορικά αντιοξειδωτικά και καλύτερα σε σχέση με τα αποτελέσματα της βιταμίνης E. Τέλος, η ελεύθερη κυανιδίνη φάνηκε να είναι περισσότερο αποτελεσματική από τους γλυκοζίτες των ανθοκυανινών, γεγονός που αποδεικνύει ότι πιθανά το άγλυκο των ανθοκυανινών είναι υπεύθυνο για την αντιοξειδωτική δράση που αυτές εκδηλώνουν^[76]. Σε μια άλλη *in vitro* μελέτη με βύσσινα ποικιλιών 'Balaton' και 'Montmorency' επιβεβαιώθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των ανθοκυανινών καθώς τα εκχυλίσματα των φρούτων φάνηκαν να αναστέλουν την λιπιδική υπεροξειδωση κατά 38% και 58%, αντίστοιχα^[24].

Η διερεύνηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του βύσσινου συνεχίστηκε σε ζωικά πρότυπα και συγκεκριμένα – ποντίκια- που ελάμβαναν καθημερινά 5g τροφής στα οποία περιέχονταν 4mL χυμού βύσσινου (10 ή 50% αραίωση του αρχικού χυμού). Στη μελέτη αυτή αναδείχθηκαν αντιοξειδωτικές δράσεις καθώς φάνηκε ότι ο χυμός βύσσινου αύξησε την δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της δισμουτάσης (SOD) στο ήπαρ και στο αίμα και την δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο ήπαρ. Επιπλέον, η μελέτη έδειξε ότι η χαμηλότερη δόση ανθοκυανινών (10% χυμός βύσσινου) μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων στο ήπαρ, αποτέλεσμα που δεν παρατηρήθηκε με τη μεγαλύτερη δόση (50% χυμός βύσσινου)^[29].

Παράλληλα, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του βύσσινου μελετήθηκαν και μέσω κλινικών δοκιμών. Σε μια μελέτη των *Traustadottir et al. 2009*, σε υγιείς άνδρες και γυναίκες ηλικίας 61-75 ετών φάνηκε ότι ο χυμός βύσσινου προσφέρει αντιοξειδωτική προστασία σε καταστάσεις οξείας νόσου ή στρες. Σ' αυτήν την διπλά τυφλή, διασταυρούμενη κλινική δοκιμή συμμετείχαν 12 εθελοντές για 14 ημέρες, στους οποίους προκλήθηκε ήπια ισχαιμία-επαναιμάτωση με άσκηση πίεσης στο αντιβραχιόνιο στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης. Η μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση 240mL χυμού βύσσινου (59,5mg ανθοκυανινών και 550mg πολυφαινόλων) δύο φορές την ημέρα συνέβαλλε στη μείωση των F₂ ισοπροστανίων στο αίμα και των οξειδωμένων νουκλεϊκών οξέων στα ούρα^[77]. Τέλος, σε μια τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή των *Seymour et al. 2014*, μελετήθηκε για 12 ώρες, η φαρμακοκινητική και η δυναμική της αντιοξειδωτικής ικανότητας ανθοκυανινών ολόκληρου βύσσινου στο πλάσμα υγιών εθελοντών. Οι εθελοντές κλήθηκαν να καταναλώσουν 45g (1,5 φλιτζάνι) ή 90g (3 φλιτζάνια) βύσσινων μετά από 8ωρη νηστεία μέσα σε 15min και η λήψη αίματος γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για 12 ώρες. Η μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν δοσο-εξαρτώμενες μεταβολές στην αντιοξειδωτική ικανότητα μέσα στο 12ωρο. Η κατανάλωση 45g βύσσινων επέφερε μια διφασική αντιοξειδωτική απόκριση (1 ώρα και στις 8-12 ώρες), ενώ η κατανάλωση 90g βύσσινων προκάλεσε μια παρατεταμένη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος κατά τη διάρκεια των 12 ωρών. Αυτή η καθυστερημένη αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρατηρήθηκε γύρω στις 8-12 ώρες πιθανά οφείλεται στην παραγωγή μεταβολιτών από την εντερική μικροχλωρίδα, οι οποίοι επαναπορροφώνται στην συστηματική κυκλοφορία^[78].

3.3.2. Αντιφλεγμονώδεις δράσεις

Όσον αφορά στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του βύσσινου, αυτές σε πολλές μελέτες διερευνώνται παράλληλα με τις αντιοξειδωτικές δράσεις. Για παράδειγμα, στη έρευνα των *Wang*

et al. 1999, η οποία προαναφέρθηκε, μελετήθηκαν *in vitro* εκτός από τις αντιοξειδωτικές και οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα κυανιδίνης μόνο-, δι- και τρι-σακχαρίτες φάνηκαν να εμφανίζουν λίγη ή καθόλου δράση ενάντια στα ισοένζυμα 1 και 2 της συνθάσης του ενδοϋπεροξειδίου της προσταγλανδίνης (PGHS-1 & 2). Παράλληλα, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, οι μόνο- και δι-σακχαρίτες αύξησαν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Αντίθετα, η ελεύθερη κυανιδίνη φάνηκε να αναστέλει τη δραστηριότητα των ενζύμων PGHS-1 και PGHS-2 με τιμές IC₅₀ 90mM και 60mM, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ελεύθερης κυανιδίνης ήταν καλύτερα από τα αντίστοιχα της ασπιρίνης που χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά^[76].

Επιπλέον, στη μελέτη των *Mulabagal et al.* 2009, φάνηκε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα βύσσινων ποικιλίας 'Balaton' και 'Montmorency' (συγκέντρωση 250μg/mL) συνέβαλαν στην αναστολή του ενζύμου COX-1 κατά 84% και 77% και στην αναστολή του ενζύμου COX-2 κατά 91% και 87%, αντίστοιχα^[24]. Οι κυκλοοξυγενάσες (COX) είναι τα ένζυμα που παράγουν τις προσταγλανδίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για διάφορα συμπτώματα της φλεγμονής.

Τέλος, σε περιτοναϊκά μακροφάγα ποντικών, στη μελέτη των *Saric et al.* 2009, η οποία προαναφέρθηκε, και ο χυμός βύσσινου φάνηκε να μειώνει τη δραστηριότητα του ενζύμου COX-2. Μάλιστα, ο χυμός σε συγκέντρωση 10% συνέβαλε σε μείωση της δραστηριότητας κατά 33%, ενώ ο χυμός σε συγκέντρωση 50% προκάλεσε μείωση κατά 41%, πιθανόν λόγω υψηλότερης περιεκτικότητας σε ανθοκυανίνες^[29].

3.3.2.1. Δράσεις κατά του πόνου

Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του βύσσινου έχουν επιβεβαιωθεί ως ένα βαθμό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις ανέκδοτες αναφορές, που κυκλοφορούσαν από το 1975, σχετικά με το γεγονός ότι το βύσσινο ανακουφίζει από τον πόνο της ουρικής αρθρίτιδας και της αρθρίτιδας, οδήγησαν τους *Tall et al.* 2004, να διερευνήσουν τις επιδράσεις του φρούτου στον πόνο που προκαλείται λόγω φλεγμονής. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους τύπου *Sprague-Dawley* και συνίσταται σε 2 πειραματικές διαδικασίες. Στην πρώτη ομάδα πειραμάτων, δόθηκαν στους αρουραίους, στους οποίους είχε προκληθεί φλεγμονή με 1% καραγεννάνη, 400mg/kg καθαρισμένων ανθοκυανινών βύσσινου με σκοπό να εκτιμηθούν οι επιδράσεις στον αλγαισθητικό πόνο και στο οίδημα. Στη δεύτερη ομάδα πειραμάτων, διερευνήθηκε η δόσο-εξαρτώμενη επίδραση των ανθοκυανινών στη φλεγμονή. Για το σκοπό αυτό, δόθηκαν στους αρουραίους, στους οποίους είχε προκληθεί φλεγμονή με 25%

ανοσοενισχυτικού Freund, 15, 85 και 400mg/kg καθαρισμένων ανθοκυανινών. Η ινδομεθακίνη χορηγήθηκε σε δόση 5mg/kg ως θετικό δείγμα ελέγχου. Από τη μελέτη φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα των ανθοκυανινών μείωσαν συμπτώματα φλεγμονής, όπως τη θερμική και μηχανική υπεραλγεία καθώς και το οίδημα του πέλματος. Η καταστολή μάλιστα της θερμικής υπεραλγείας ήταν δοσο-εξαρτώμενη, με τη μέγιστη δόση των ανθοκυανινών (400mg/kg) να εμφανίζει συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με την ινδομεθακίνη. Οι ερευνητές πρότειναν την διεξαγωγή περισσότερων κλινικών μελετών με σκοπό να γίνει καλύτερα αντιληπτός ο ρόλος των φυτοχημικών, ιδιαίτερα των ανθοκυανινών, του βύσσινου στον πόνο και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια θεραπευτική εναλλακτική σε ασθενείς με σύνδρομο χρόνιου πόνου^[79].

3.3.2.2. Δράσεις κατά του μυϊκού πόνου

Κατά το τρέξιμο μεγάλων αποστάσεων και κατά την οξεία έντονη άσκηση, προκαλείται οξειδωτικό στρες που οδηγεί σε μυϊκό πόνο και οξεία βλάβη των μυών. Έτσι, προκαλείται οξεία φλεγμονή, η οποία συντηρεί έναν φαύλο κύκλο παραγωγής ελεύθερων ριζών και πόνου των μυών^[80-82]. Το βύσσινο, και ιδιαίτερα ο χυμός αυτού που έχει μελετηθεί περισσότερο κατά την άσκηση, χάρη στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του, φαίνεται ότι μπορεί να δρα προστατευτικά ενάντια στην καταστροφή του μυϊκού ιστού συμβάλλοντας στην καλύτερη αποκατάσταση μετά το πέρας της άσκησης.

Σε μελέτη των *Ducharme et al. 2009*, διερευνήθηκε η επίδραση της κατανάλωσης χυμού βύσσινου (juice blend-ιδιόκτητο) στην βλάβη των σκελετικών και καρδιακών μυών κατά το τρέξιμο, σε άλογα. Τα ζώα αυτά συμμετέχουν συχνά σε ιπποδρομίες και αγώνες αντοχής. Η μελέτη ήταν διασταυρούμενη και πραγματοποιήθηκε με 6 άλογα στα οποία γινόταν χορήγηση είτε του χυμού (1,42L) είτε του εικονικού σκευάσματος 2 φορές την ημέρα για 2 εβδομάδες πριν την έναρξη της άσκησης. Η άσκηση που εκτέλεσαν τα άλογα ήταν βραχυπρόθεσμη και έντονη (τυπικό πρωτόκολλο δοκιμασίας κόπωσης). Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο χυμός βύσσινου οδήγησε σε μικρότερη αύξηση της δραστηριότητας της αμινοτρανσφεράσης της ασπαρτάμης (AST) που είναι δείκτης σκελετικής μυϊκής βλάβης^[83].

Πριν τη μελέτη αυτή, είχε προηγηθεί μια κλινική δοκιμή σε άρρενες φοιτητές με σκοπό να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα του ίδιου χυμού βύσσινου στο να προλαμβάνει τα συμπτώματα της μυϊκής βλάβης. Στη μελέτη συμμετείχαν 14 φοιτητές οι οποίοι κατανάλωσαν 1,5 φλιτζάνια χυμού βύσσινου ή εικονικού σκευάσματος εναλλάξ, σε διασταυρούμενο σχεδιασμό, για 8 μέρες. Στις 4 ημέρες χορήγησης, οι εθελοντές πραγματοποίησαν μια συνεδρία

άσκησης που περιελάμβανε έκκεντρες συστολές των καμπτήρων του αγκώνα. Η πρόσληψη του χυμού βύσσινου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της απώλειας της δύναμης και του πόνου σε σύγκριση με το εικονικό ρόφημα. Η μελέτη κατέληξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση χυμού βύσσινου προσφέρει κάποια προστασία, δε μπορεί όμως να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι προλαμβάνει τη μυϊκή βλάβη διότι οι 2 άλλοι δείκτες μυϊκής βλάβης (ελεύθερη γωνία του αγκώνα, μυϊκή ευαισθησία) από τους 4 που είχαν ληφθεί υπόψη δεν επηρεάστηκαν^[84].

Όσον αφορά στο τρέξιμο μεγάλων αποστάσεων, υπάρχουν 2 κλινικές δοκιμές που έχουν διερευνήσει τα ευεργετικά οφέλη του χυμού βύσσινου στην μείωση της μυϊκής βλάβης και στην αποκατάσταση. Στη μελέτη των *Howatson et al. 2009*, συμμετείχαν 12 αθλητές μααραθωνίου στους οποίους χορηγούνταν 2 φιάλες χυμού βύσσινου ή εικονικού ροφήματος ημερησίως για 5 μέρες πριν το μααραθώνιο, την ημέρα του αγώνα και 48 ώρες μετά. Στην ομάδα που ελάμβανε χυμό βύσσινου, η ισομετρική δύναμη αποκαταστάθηκε σε συντομότερο χρονικό διάστημα, μειώθηκαν κάποιοι δείκτες φλεγμονής (CRP, IL-6, ουρικό οξύ), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκε και τα TBARs στον ορό μειώθηκαν^[85]. Τέλος, η μελέτη των *Kuehl et al. 2010*, συμπεριέλαβε 44 υγιείς δρομείς που έτρεξαν περίπου 26km σε διάστημα 24 ωρών. Στους εθελοντές χορηγούνταν 355mL χυμού βύσσινου ή εικονικού ροφήματος για 7 μέρες πριν τον αγώνα και κατά τη διάρκεια αυτού. Μετά το πέρας της άσκησης, οι εθελοντές που ελάμβαναν το χυμό βύσσινου ανέφεραν μικρότερη αύξηση στον πόνο, όπως αυτή καταγράφηκε με κλίμακα VAS στην αρχή της μελέτης, πριν τον αγώνα και στο τέλος του^[86].

3.3.3. Αντικαρκινικές δράσεις

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του βύσσινου έχουν μελετηθεί *in vitro* και σε ζωικά πρότυπα, συγκεκριμένα σε ποντίκια Apc^{Min} . Δηλαδή ποντίκια τα οποία εμφανίζουν προδιάθεση για πολλαπλή εντερική νεοπλασία λόγω μιας μετάλλαξης στο ομόλογο του APC γονιδίου. Οι μεταλλάξεις του ανθρώπινου APC γονιδίου προδιαθέτουν τα άτομα στο να αναπτύξουν αδενωματώδεις πολύποδες και τελικά ορθοκολικό καρκίνο. Επίσης, αποτελούν μια συχνή και πρόωμη εκδήλωση του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου^[87].

Σε μελέτη των *Kang et al. 2003*, διερευνήθηκαν οι αντικαρκινικές δράσεις του βύσσινου και των ανθοκυανινών του σε ποντίκια Apc^{Min} και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Η διατροφική παρέμβαση των ζωικών προτύπων διήρκεσε 10 εβδομάδες, κατά τη διάρκεια των οποίων τα ποντίκια χωρίστηκαν σε 5 ομάδες: ομάδα ελέγχου, ομάδα που ελάμβανε σουλινδάκη (μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο), ομάδα που ελάμβανε

διατροφή εμπλουτισμένη με ανθοκυανίνες βύσσινου (800mg/L), ομάδα που ελάμβανε διατροφή εμπλουτισμένη με κυανιδίνη (200mg/L) και ομάδα που ελάμβανε διατροφή εμπλουτισμένη με ολόκληρο βύσσινο (200g/kg). Η μελέτη έδειξε ότι σε όλες τις ομάδες παρέμβασης μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός και το μέγεθος των όγκων στο τυφλό των ζωικών μοντέλων. Παράλληλα, οι ανθοκυανίνες και η κυανιδίνη φάνηκαν να μειώνουν την διάδοση στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HT 29 και HCT 116. Για τη σειρά HT 29, οι τιμές IC₅₀ των ανθοκυανινών και της κυανιδίνης ήταν 780μM και 63μM, ενώ για τη σειρά HCT 116 ήταν 285μM και 85μM, αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές βέβαια είναι ασταθείς σε pH 7 και αποικοδομούνται σε διάφορα παράγωγα. Επιπλέον, οι δόσεις των ανθοκυανινών και της κυανιδίνης που χορηγήθηκαν ήταν πολύ μεγάλες με συνέπεια ο άνθρωπος να μπορεί να τις φτάσει μόνο με συμπληρωματική χορήγηση^[88].

Σε μια άλλη μελέτη των *Bobe et al. 2006*, σε ποντίκια Arc^{Min}, διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα της σύγχρονης χορήγησης εκχυλίσματος βύσσινου πλούσιου σε ανθοκυανίνες και σουλινδάκης. Για 19 εβδομάδες, δόθηκαν στα ποντίκια διάφορες δόσεις εκχυλίσματος μαζί με σουλινδάκη σε μη βέλτιστη δόση ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες. Τα ζωικά πρότυπα που ελάμβαναν εκχύλισμα βύσσινου σε οποιαδήποτε δόση μαζί με το φάρμακο μείωσαν τον αριθμό και το μέγεθος των όγκων στο λεπτό έντερο. Επιπλέον, λιγότερα ζωικά πρότυπα που ελάμβαναν συνδυαστική θεραπεία, έχασαν περισσότερο από το 10% του βάρους τους, σημαντικό εύρημα για καλύτερη έκβαση. Τελικά, πιθανόν οι ανθοκυανίνες να δρουν σε διαφορετικό τμήμα του λεπτού εντέρου και γι' αυτό φαίνεται ότι η χορήγησή τους παράλληλα με την σουλινδάκη επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τη χορήγηση μόνο του φαρμάκου^[89].

3.3.4. Δράσεις κατά του μεταβολικού συνδρόμου

Η υπερλιπιδαιμία, η παχυσαρκία, η υπερινσουλιναίμία, η υπέρταση, η αυξημένη γλυκόζη νηστείας και η συστηματική φλεγμονή αποτελούν συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου, το οποίο προδιαθέτει στην εμφάνιση διαβήτη τύπου II και καρδιαγγειακών νοσημάτων^[90].

Σε διάφορες μελέτες έχουν διερευνηθεί οι ευεργετικές δράσεις του βύσσινου στην τροποποίηση των παραγόντων που συνιστούν το μεταβολικό σύνδρομο και στην πρόληψη των χρόνιων νοσημάτων. Για παράδειγμα, μια τέτοια μελέτη είναι η έρευνα των *Seymour et al. 2007-2008* που πραγματοποιήθηκε με αρουραίους *Dahl*. Αυτό το στέλεχος των αρουραίων είναι ευαίσθητο στην πρόσληψη αλατιού και εμφανίζει υπε λιπιδαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Η διατροφική παρέμβαση διήρκεσε 90 ημέρες και κατά τη διάρκεια αυτών, οι αρουραίοι

ελάμβαναν τη βασική τους τροφή εμπλουτισμένη είτε με 1% λυοφιλιωμένο ολόκληρο βύσσινο είτε με 0,9% υδατάνθρακες για ισοστάθμιση του ενεργειακού περιεχομένου. Η ομάδα που ελάμβανε τροφή εμπλουτισμένη σε βύσσινο φάνηκε να έχει μειωμένη υπερλιπιδαιμία και υπερινσουλιναιμία στο στάδιο νηστείας καθώς επίσης μειωμένα ποσοστά λιπώδους ήπατος. Επιπλέον, η πρόσληψη βύσσινου συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση των υποδοχέων PPAR-α και PPAR-γ, οι οποίοι ελέγχουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις, καθώς και με αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στον PPAR-α, βρέθηκε αυξημένο το mRNA καθώς επίσης το mRNA και η δραστικότητα της οξειδάσης του ακυλο-συνενζύμου Α που αποτελεί στόχο του PPAR-α^[91].

Σε συνέχεια των μελετών αυτών, ο Seymour και οι συνεργάτες του, το 2009, διερεύνησαν τις επιδράσεις του βύσσινου σε παχύσαρκους αρουραίους Zucker με μεταβολικό σύνδρομο. Οι 24 αρουραίοι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες και το πρωτόκολλο της διατροφικής παρέμβασης ήταν ίδιο μ' αυτό των προηγούμενων μελετών. Η πρόσληψη του βύσσινου, τελικά, συσχετίστηκε με μειωμένη υπερλιπιδαιμία, μειωμένο ποσοστό λίπους σώματος και κοιλιακού λίπους. Επιπλέον, στην ομάδα που ελάμβανε βύσσινο, η έκφραση των δεικτών φλεγμονής IL-6 και TNF-α βρέθηκε μειωμένη τόσο στο πλάσμα όσο και στο οπισθοπεριτοναϊκό λίπος. Στο οπισθοπεριτοναϊκό λίπος, συγκεκριμένα, η συμπληρωματική χορήγηση βύσσινου οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του mRNA των υποδοχέων PPAR (-α & -γ), σε μειωμένη έκφραση του mRNA των δεικτών φλεγμονής IL-6 και TNF-α καθώς και σε μειωμένη δραστικότητα του NF-κΒ^[92].

3.3.4.1. Δρασεις στην αρτηριακή σκληρότητα

Σε μελέτη των Lynn *et al.* 2014, διερευνήθηκαν οι ιδιότητες του χυμού βύσσινου κατά της αρτηριακής σκληρότητας και της φλεγμονής σε υγιείς εθελοντές. Σ' αυτήν την τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή συμμετείχαν 47 εθελοντές ηλικίας 30-50 ετών, οι οποίοι κλήθηκαν να καταναλώσουν 30ml συμπυκνωμένου χυμού βύσσινου (αραιωμένου σε 250ml νερό) ή ενός ροφήματος placebo για 6 εβδομάδες. Η μελέτη κατέληξε ότι ο χυμός βύσσινου δεν είχε καμία επίδραση στην αρτηριακή σκληρότητα και στα επίπεδα της CRP, παρ' όλα αυτά, κατάφερε να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος^[93].

3.3.5. Ευεργετικές δράσεις στον ύπνο

Τα βύσσινα και συγκεκριμένα αυτά της ποικιλίας ‘Montmorency’ που έχουν μελετηθεί, περιέχουν μελατονίνη, συστατικό που χαρακτηρίζεται από ευεργετικές ιδιότητες σχετικές με τη ρύθμιση του ύπνου. Επιπλέον, το βύσσινο πιθανά εμφανίζει ενισχυτικές επιδράσεις λόγω αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων καθώς φαίνεται ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες σχετίζονται περίπλοκα με τον ύπνο^[24, 94]. (Βιβλ: 8,9 apo effects of tart cherry juice beverage on the sleep).

Οι πιθανοί αυτοί μηχανισμοί δράσης οδήγησαν τον *Pigeon και τους συνεργάτες του, το 2010*, να μελετήσουν τις επιδράσεις του χυμού βύσσινου στον ύπνο ηλικιωμένων ατόμων που πάσχουν από μέτρια προς σοβαρή αϋπνία. Σ’ αυτήν την τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη πιλοτική μελέτη συμμετείχαν 15 εθελοντές, οι οποίοι κατανάλωναν καθημερινά 2 φιάλες χυμού βύσσινου ή εικονικού ροφήματος για 2 εβδομάδες. Ανάμεσα στις παρεμβάσεις μεσολάβησε διάστημα 2 εβδομάδων. Ο χυμός βύσσινου φάνηκε να έχει ένα μέτριο ευεργετικό αποτέλεσμα. Μέσα στην ίδια ομάδα, ο χυμός βύσσινου βελτίωσε στατιστικά σημαντικά όλες τις παραμέτρους που σχετίζονται με τη συνέχεια του ύπνου (την έναρξη του ύπνου, την αφύπνιση μετά την έναρξη, το συνολικό χρόνο ύπνου και την αποδοτικότητα του ύπνου) καθώς και τη σοβαρότητα της αϋπνίας. Σε σύγκριση με το εικονικό σκεύασμα, βελτιώθηκαν μόνο η αφύπνιση μετά την έναρξη του ύπνου και η σοβαρότητα της αϋπνίας. Το μέγεθος της επίδρασης ήταν συγκρίσιμο ή καλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο της βαλεριάνας ή της μελατονίνης που αποτελούν τα φυσικά προϊόντα κατά της αϋπνίας. Τα αποτελέσματα, όμως, ήταν σημαντικά υποδεέστερα σε σχέση μ’ αυτά της φαρμακευτικής αγωγής και της γνωσιακής συμπεριφοριστικής προσέγγισης. Οι εθελοντές δηλαδή συνέχισαν να εμφανίζουν συμπτώματα αϋπνίας. Η πιλοτική αυτή μελέτη είναι μια αρχή, απαιτείται όμως πολύ ακόμη έρευνα προκειμένου να ληφθεί η απαραίτητη γνώση γύρω από το συγκεκριμένο θέμα^[95].

Σε μια ακόμη τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, στην οποία συμμετείχαν 20 υγιείς νεαροί εθελοντές, οι *Howatson et al. 2011*, διερεύνησαν τις επιδράσεις συμπυκνωμένου χυμού βύσσινου στην ποιότητα του ύπνου. Οι εθελοντές κλήθηκαν για 7 μέρες να καταναλώσουν τον χυμό βύσσινου ή ένα εικονικό ρόφημα με μια περίοδο έκπλυσης 2 εβδομάδων. Η πρόσληψη συμπυκνωμένου χυμού βύσσινου οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση του χρόνου που περνούσαν οι εθελοντές στο κρεβάτι, του συνολικού χρόνου ύπνου και της αποδοτικότητας του ύπνου. Οι ευεργετικές αυτές δράσεις αποδόθηκαν στα αυξημένα επίπεδα μελατονίνης που μετρήθηκαν στον ορό των εθελοντών^[96].

3.3.6. Άλλες δράσεις

Τέλος, στο βύσσινο έχουν αποδοθεί επιπλέον ευεργετικές ιδιότητες οι οποίες διερευνώνται, όπως οι αντνευροεκφυλιστικές και οι δράσεις κατά της οστεοαρθρίτιδας.

Από το 2005, μελέτη σε κυτταρικές σειρές νευρωνικών κυττάρων (PC 12) επιβεβαίωσε τις ευεργετικές δράσεις του βύσσινου. Το βύσσινο φάνηκε να προστατεύει τα κύτταρα ενάντια στο οξειδωτικό στρες λόγω της περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά και ιδιαίτερα σε ανθοκυανίνες^[26]. Οι *Matchunski et al. 2013*, μελέτησαν τη δράση της σύγχρονης χορήγησης εκχυλίσματος βύσσινου και απαραίτητων λιπαρών οξέων κατά της νόσου Alzheimer. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια mu-p75-sap, ζωικό πρότυπο νόσου Alzheimer επαγόμενης με αντίσωμα κατά της σαπορίνης. Τα ζωικά μοντέλα χωρίστηκαν σε 9 ομάδες. Αρχικά γινόνταν για 2 εβδομάδες χορήγηση συνδυαστικής θεραπείας εκχυλίσματος βύσσινου και απαραίτητων λιπαρών οξέων (εμπορικό σκεύασμα) σε συγκεντρώσεις 30, 60, 90mg/kg ή όχηματος (0,5% μεθυλοκυτταρίνη και νερό). Μετά το πέρας των 2 εβδομάδων, πραγματοποιήθηκαν ενδοεγκεφαλοκοιλιακές ενέσεις της χολινεργικής τοξίνης mu-p75-sap ή του PBS (control). Έπειτα, η χορήγηση της συνδυαστικής θεραπείας συνεχίστηκε για 17 ημέρες. Στη μελέτη φάνηκε ότι η συνδυαστική θεραπεία μείωσε τα γνωστικά ελλείμματα που προκλήθηκαν από την τοξίνη, όπως αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους αναγνώρισης αντικειμένου και χώρου και τη μέθοδο λαβύρινθου στο νερό κατά Morris. Επιπλέον, στην ιστολογική εξέταση του εγκεφάλου φάνηκε ότι η σύγχρονη χορήγηση εκχυλίσματος βύσσινου και απαραίτητων λιπαρών οξέων προστάτευσε τον ιστό ενάντια στη φλεγμονή και μείωσε την απώλεια χολινεργικών νευρώνων στο διάμεσο διάφραγμα^[97].

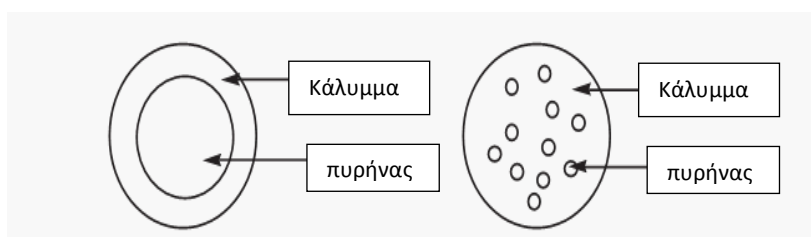
Τέλος, σε μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, διασταυρούμενη κλινική δοκιμή εξετάστηκαν οι δράσεις χυμού βύσσινου (juice blend) στη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας του γόνατου. Στη μελέτη συμμετείχαν 58 μη διαβητικοί εθελοντές με ήπια προς μέτρια οστεοαρθρίτιδα, οι οποίοι κλήθηκαν να καταναλώσουν 2 φιάλες χυμού βύσσινου ή εικονικού ροφήματος για 6 εβδομάδες με 1 εβδομάδα έκπλυσης. Τα αποτελέσματα της συμπληρωματικής χορήγησης χυμού βύσσινου δεν ήταν σημαντικά καλύτερα σε σχέση με αυτά του εικονικού σκευάσματος. Στην ομάδα όμως που κατανάλωνε το χυμό μειώθηκε στατιστικά σημαντικά η υψηλής ευαισθησίας CRP και η μείωση αυτή συσχετίστηκε με την βελτίωση του δείκτη οστεοαρθρίτιδας WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities)^[98].

4.1. Γενικά για την ενθυλάκωση

Η ενθυλάκωση εφαρμόζεται τα τελευταία 60 περίπου χρόνια. Ορίζεται ως η διαδικασία εγκλεισμού στερεών, υγρών και αέριων συστατικών σε μικροκάψουλες (αδρανές κάλυμμα), που προσφέρουν ελεγχόμενη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες^[99]. Η απελευθέρωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τροποποίηση του pH, με ωσμωτική ή μηχανική πίεση, με θερμότητα ή με ενζυμική δράση^[100-102]. Το πυρηνικό υλικό μπορεί να είναι είτε καθαρό είτε μίγμα ουσιών και αποδίδεται στη βιβλιογραφία με εναλλακτικές ονομασίες, όπως επικαλυμμένο υλικό, δραστική ουσία, συμπλήρωμα, ωφέλιμο φορτίο ή εσωτερική φάση. Από την άλλη πλευρά το αδρανές κάλυμμα αναφέρεται και ως υλικό επίστρωσης, υλικό τοιχώματος, κάψουλα, μεμβράνη, φορέας ή κέλυφος. Η μικροκάψουλα μπορεί να αποτελείται από σάκχαρα, πρωτεΐνες, κόμμεα, φυσικούς ή τροποποιημένους υδατάνθρακες, συνθετικά πολυμερή ή λιπίδια ή μίγματα αυτών^[103].

Οι μικροκάψουλες, τα προϊόντα δηλαδή της ενθυλάκωσης, είναι «μικρά οχήματα» ή σωματίδια των οποίων το μέγεθος ποικίλλει από μερικά νανόμετρα (nm) μέχρι αρκετά χιλιοστά (mm)^[104]. Τα σωματίδια με μέγεθος μικρότερο του ενός μικρόμετρου (μm) χαρακτηρίζονται ως νανοσωματίδια. Ως μικροσωματίδια ορίζονται τα σωματίδια με διάμετρο που ποικίλλει από 3 μέχρι 1000 μικρόμετρα (μm). Ενώ, τα σωματίδια που ξεπερνούν σε μέγεθος το ένα χιλιοστό (1 mm) χαρακτηρίζονται ως μακροσωματίδια^[105].

Η δομή της μικροκάψουλας ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τα υλικά που χρησιμοποιούνται και τις μεθόδους που εφαρμόζονται^[103]. Οι δύο κύριες μορφολογίες που συναντώνται συχνότερα είναι η μονοπύρηνη και η πολυπύρηνη. Στις δομές αυτές της μικροκάψουλας, ο ένας ή οι πολλαπλοί πυρήνες εγκλείονται σε ένα ή περισσότερα τοιχώματα^[106].



Εικόνα 4.1. Οι 2 κύριες και απλές δομές της μικροκάψουλας^[99]

Η τεχνική της ενθυλάκωσης εφαρμόζεται εκτενώς στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων προσφέροντας αρκετές ευεργετικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν. Συγκεκριμένα, μέσω της ενθυλάκωσης επιτυγχάνεται:

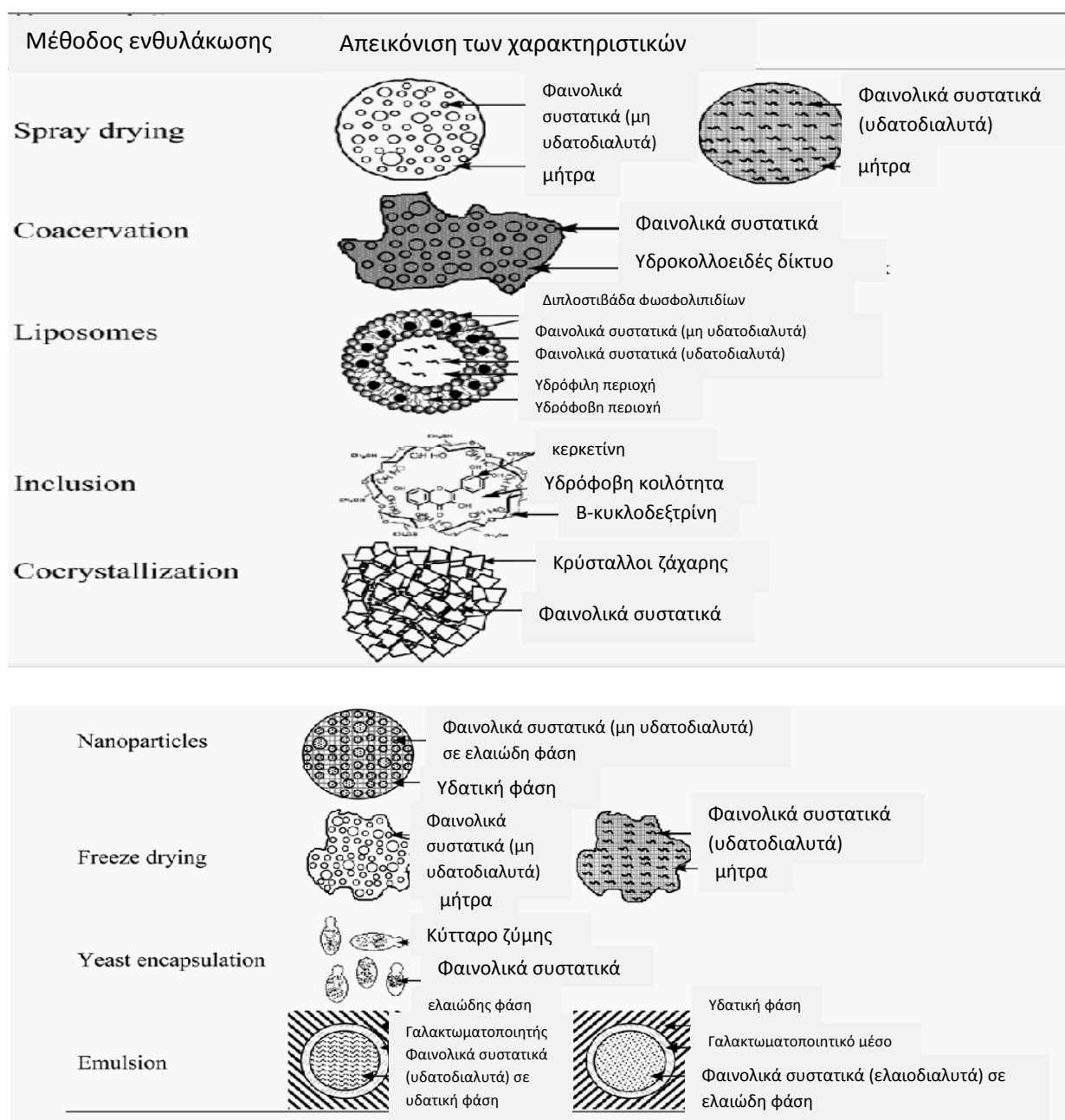
- Βελτιωμένη σταθερότητα του τελικού προϊόντος και προστασία των ευαίσθητων ουσιών από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιτυγχάνεται, δηλαδή, αναστολή της οξείδωσης και διατήρηση των πτητικών συστατικών.
- Καλύτερος χειρισμός της δραστικής ουσίας. Για παράδειγμα, δραστικές ουσίες σε υγρή μορφή μετατρέπονται σε σκόνη και μπορούν εύκολα να προστεθούν σε φόρμουλες φυσικών καλλυντικών ή σε τρόφιμα.
- Κάλυψη ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, δηλαδή γεύσεων και οσμών, του ενθυλακωμένου υλικού.
- Βελτιωμένη ασφάλεια. Για παράδειγμα, μειώνεται η αναφλεξιμότητα των πτητικών συστατικών όπως των αρωμάτων.
- Ρύθμιση των ιδιοτήτων των δραστικών συστατικών. Δηλαδή, ρύθμιση της δομής και των φυσικών ιδιοτήτων όπως η διαλυτότητα και η ρευστότητα.
- Επίτευξη ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Η ενθυλάκωση προσφέρει στοχευμένη και ελεγχόμενη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού στον επιθυμητό χρόνο^[105, 107, 108].

Συστατικά τροφίμων, όπως αρωματικοί παράγοντες, γλυκαντικά, λιπίδια, χρωστικές, βιταμίνες, μέταλλα, αντιοξειδωτικά, ένζυμα και μικροοργανισμοί ενθυλακώνονται με διάφορες μεθόδους. Τονίζεται όμως ότι σε κάθε πειραματική διαδικασία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η επεξεργασία του τελικού προϊόντος, η βέλτιστη συγκέντρωση και λειτουργικότητα της δραστικής ουσίας καθώς και ο μηχανισμός απελευθέρωσης^[101]. Σκοπός της βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας είναι ο όσον το δυνατόν μεγαλύτερος περιορισμός των αρνητικών συνεπειών της διαδικασίας ενθυλάκωσης όπως το υψηλό κόστος και η πολυπλοκότητα της παραγωγής^[108].

Στη διάρκεια των 60 περίπου χρόνων εφαρμογής της διαδικασίας ενθυλάκωσης, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες τεχνικές. Οι πιο γνωστές και συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μικροενθυλάκωσης είναι οι παρακάτω^[101, 103, 107, 109]:

- 1) Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)
- 2) Ψύξη με ψεκασμό (Spray chilling/cooling)
- 3) Εξώθηση/Εκβολή (Extrusion)
- 4) Επικάλυψη σε ρευστοποιημένη κλίνη (Fluidized bed coating)
- 5) Συσσωμάτωση (Coacervation)
- 6) Παγίδευση σε λιποσώματα (Liposome entrapment)

- 7) Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (Inclusion complexation)
- 8) Ξήρανση υπό κατάψυξη (Lyophilization)
- 9) Γαλακτωματοποίηση (Emulsion)
- 10) Συγκρυστάλλωση (Cocrystallization)
- 11) Ενθυλάκωση σε ζύμες (Yeast encapsulation)
- 12) Διαχωρισμός με ανάρτηση φυγοκέντρου (Centrifugal suspension separation) και
- 13) Προσρόφηση (Adsorption)



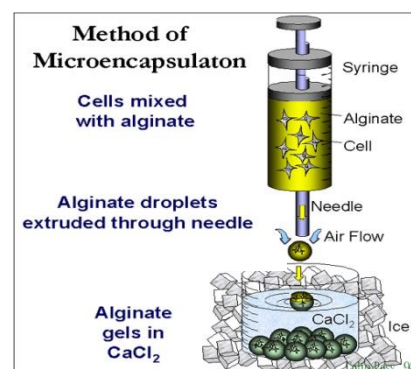
Εικόνα 4.2. Απεικόνιση χαρακτηριστικών φαινολικών συστατικών ενθυλακωμένων σε κάψουλες (διάφοροι μέθοδοι ενθυλάκωσης)

4.2. Μέθοδοι παρασκευής μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος

Το αλγινικό οξύ, η πρώτη ύλη, είναι ένα ανιονικό πολυμερές το οποίο παράγεται από καφέ φύκια (brown algae) και βακτήρια. Αποτελείται από υπολείμματα α-L-γουλουρονικού οξέος (G) και β-D-μαννουρονικού οξέος (M) συνδεδεμένα γραμμικά με 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η σύνθεση και η ακολουθία των υπολειμμάτων G και M εξαρτάται από την πηγή παραγωγής του αλγινικού οξέος και επηρεάζει τις ιδιότητες αυτού^[110].

Τα πρώτα σωματίδια αλγινικού άλατος, που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσον ενθυλάκωσης, αναπτύχθηκαν το 1980^[111]. Από τότε, έχει διεξαχθεί πολύ έρευνα γύρω από την παραγωγή και τις εφαρμογές τέτοιων σωματιδίων. Για το σχηματισμό μικροσωματιδίων αλγινικού άλατος διαφόρων μεγεθών έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές. Οι 2 κύριες τεχνικές, που εφαρμόζονται εκτενώς και θα περιγραφούν παρακάτω είναι οι εξής: η εξώθηση (Extrusion/Dripping)/εξωτερική ζελατινοποίηση, η οποία εφαρμόστηκε και στην εν λόγω μεταπτυχιακή μελέτη και η γαλακτωματοποίηση (emulsion)/εσωτερική ζελατινοποίηση^[112]. Η εξωτερική ή εσωτερική ζελατινοποίηση αναφέρεται στην ύπαρξη εξωτερικής ή εσωτερικής πηγής ασβεστίου, αντίστοιχα. Η γαλακτωματοποίηση συνδυάζεται τόσο με εσωτερική όσο και με εξωτερική ζελατινοποίηση^[113], η πρώτη μέθοδος όμως είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, γι' αυτό και θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Η μέθοδος της εξώθησης περιλαμβάνει την στάγδην προσθήκη διαλύματος αλγινικού οξέος σε λουτρό που περιέχει κατιόντα, συνήθως σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2)^[114] με χρήση σύριγγας ή ακροφυσίου. Το αλγινικό οξύ έχει την ιδιότητα να ζελατινοποιείται όταν έρχεται σε επαφή με πολυσθενή κατιόντα. Το υλικό που προορίζεται για ενθυλάκωση αναμιγνύεται, στις περισσότερες εφαρμογές, με το διάλυμα αλγινικού οξέος πριν το σχηματισμό των μικροσωματιδίων και τη διαδικασία ζελατινοποίησης^[114, 115]. Αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μάλιστα ταυτόχρονα αλγινικό οξύ και χιτοζάνη ως υλικό τοιχώματος καθώς το αλγινικό οξύ έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με κατιονικά πολυμερή, όπως η χιτοζάνη, σχηματίζοντας συμπλέγματα^[112].



Συνήθως, το διάλυμα αλγινικού οξέος εξωθείται μέσω σύριγγας και το μέγεθος των σταγονιδίων που παράγονται μέσα στο διάλυμα CaCl_2 κυμαίνεται μεταξύ 500-5000 μm ^[112]. Παρ' όλα αυτά, έχουν αναπτυχθεί περισσότερο προηγμένες τεχνικές για την παραγωγή

μικροσωματιδίων με μικρότερα μεγέθη και μικρότερες διακυμάνσεις μεγεθών. Δύο κύρια παραδείγματα είναι η χρήση ροής αέρα (AirJet) που τεμαχίζει τα σταγονίδια δίνοντάς τους τελικό μέγεθος 300-1000 μm ^[112] και τα ηλεκτροστατικά πεδία τα οποία παράγουν σωματίδια με μέγεθος 50-1000 μm ^[116]. Το πρόβλημα όλων αυτών των μεθόδων που βασίζονται στη χρήση σύριγγας ή ακροφυσίου είναι η περιορισμένη εφαρμογή τους σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Και αυτό διότι απαιτείται μεγάλος αριθμός συριγγών και ακροφυσίων ενώ επιπλέον εμφανίζονται λειτουργικά προβλήματα όπως η απόφραξη, ο καθαρισμός και η απολύμανση των εξαρτημάτων αυτών^[117]. Για παραγωγή βιομηχανικής κλίμακας, η τεχνολογία JetCutter έχει φανεί να είναι η πιο κατάλληλη. Η μέθοδος αυτή παραγωγής μικροσταγονιδίων βασίζεται στον μηχανικό τεμαχισμό του διαλύματος αλγινικού που εκτοξεύεται, με σύρματα κοπής εγκατεστημένα σε ένα εργαλείο κοπής^[118].

Η μέθοδος της γαλακτωματοποίησης/εσωτερικής ζελατινοποίησης, από την άλλη πλευρά, βασίζεται στη διασπορά ενός διαλύματος αλγινικού, που περιέχει ένα αδιάλυτο άλας ασβεστίου, σε κάποιο έλαιο^[119]. Το διάλυμα αλγινικού οξέος, συγκεκριμένα, αναμιγνύεται με το υλικό που προορίζεται για ενθυλάκωση και με ένα αδιάλυτο άλας ασβεστίου, συνήθως ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, ακολουθεί γαλακτωματοποίηση με προσθήκη του μίγματος σε κάποιο έλαιο. Στο νερό-σε-λάδι (w/o) γαλάκτωμα που σχηματίζεται μετά από περίπου 15min, προστίθεται συνήθως παγόμορφο οξικό οξύ με πάγο που διαλυτοποιεί το CaCO_3 με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα ιόντα ασβεστίου. Μετά τη διαδικασία της ζελατινοποίησης που διαρκεί περίπου 30min, τα μικροσφαιρίδια απομονώνονται και φυλάσσονται^[120, 121]. Όσον αφορά στο μέγεθος των μικροσωματιδίων που παράγονται, αυτό κυμαίνεται μεταξύ μερικών μικρόμετρων (μm) και μερικών χιλιοστών (mm) ανάλογα με τις συνθήκες υπό τις οποίες σχηματίζεται το w/o γαλάκτωμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι συχνά χρησιμοποιείται μεμβράνη κατά τη διαδικασία της γαλακτωματοποίησης. Στην τεχνική αυτή τα γαλακτοποιημένα σφαιρίδια ωθούνται μέσω των πόρων μιας μικροπορώδους μεμβράνης με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα καλύτερου ελέγχου του μεγέθους των σφαιριδίων^[112].

Τα μικροσφαιρίδια που παράγονται με τη μέθοδο της εσωτερικής ζελατινοποίησης είναι περισσότερο ομοιογενή, όμως περισσότερο διαπερατά και με μεγαλύτερους πόρους σε σύγκριση με τα μικροσφαιρίδια που παράγονται μέσω της εξωτερικής ζελατινοποίησης. Συνεπώς, τα μικροσφαιρίδια της πρώτης μεθόδου εμφανίζουν μικρότερη αποδόση ενθυλάκωσης και ταχύτερους ρυθμούς απελευθέρωσης του ενθυλακωμένου υλικού^[122].

4.3. Εφαρμογές της ενθυλάκωσης

Η ανάγκη σίτισης του συνεχώς αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού και η στροφή των καταναλωτών προς πιο φυσικά προϊόντα χωρίς συντηρητικά έδωσαν το έναυσμα για την ανάπτυξη της τεχνολογίας της ενθυλάκωσης στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων. Χάρη στην τεχνολογία αυτή, αναπτύχθηκαν προϊόντα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στο ράφι^[123].

Η ενθυλάκωση, τα τελευταία χρόνια, εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο για τον εγκλεισμό λειτουργικών συστατικών που ρυθμίζουν τη γεύση, την υφή, το χρώμα και τις ιδιότητες συντήρησης του τελικού προϊόντος ή αποτελούν βιοδραστικά συστατικά. Οι ουσίες αυτές προστατεύονται κατά την ενθυλάκωσή τους από περιβαλλοντικές συνθήκες, συνθήκες επεξεργασίας και ανεπιθύμητες αντιδράσεις με το προϊόν^[124, 125]. Παράλληλα, αρκετή έρευνα διεξάγεται και γύρω από την ενθυλάκωση προβιοτικών μικροοργανισμών με σκοπό την προστασία αυτών κατά την επεξεργασία του προϊόντος, κατά τη δίοδο μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και τελικά την απελευθέρωσή τους στο παχύ έντερο^[126]. Όσον αφορά στα αντιοξειδωτικά, πχ πολυφαινόλες και ανθοκυανίνες, η ενθυλάκωση τα προστατεύει από τις περιβαλλοντικές συνθήκες εμποδίζοντάς τα να δράσουν ως προ-οξειδωτικά^[127].

Παρά το γεγονός ότι πολλά τρόφιμα και ροφήματα, στις μέρες μας, περιέχουν μικροσωματίδια και νανοσωματίδια, πρόσφατα σχετικά, συγκεντρώθηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον γύρω από την παραγωγή σωματιδίων από βιοπολυμερή. Η αποδοχή των σωματιδίων αυτών στα τρόφιμα από τους καταναλωτές εξαρτάται από την αίσθηση που τους αφήνουν στο στόμα. Γενικά, σωματίδια μεγαλύτερα από 50-100μm δεν είναι ιδιαίτερα αποδεκτά λόγω της αίσθησης «λίθων» που αφήνουν κατά την κατανάλωση του εκάστοτε τροφίμου. Αναγνωρίζονται δηλαδή ως ξένα σωματίδια, γεγονός μη αρεστό από τους καταναλωτές^[128].

Όσον αφορά, στη συνέχεια, στον τομέα της φαρμακευτικής βιομηχανίας, η εφαρμογή της ενθυλάκωσης είναι μεγίστης σημασίας^[129]. Η ενθυλάκωση σε μικροσφαιρίδια, συγκεκριμένα, προσφέρει τη δυνατότητα ασφαλέστερης και αποτελεσματικότερης χορήγησης των διαφόρων φαρμάκων. Για παράδειγμα, η δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης του εκάστοτε φαρμάκου που παρέχει η μικροενθυλάκωση, συμβάλλει στην προστασία του φαρμάκου, στον έλεγχο των δόσεων και βοηθάει τους ασθενείς να χειρίζονται καλύτερα την φαρμακευτική τους αγωγή λαμβάνοντας πιο αραιά τα φάρμακά τους^[130].

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, τα περισσότερα, όμως, αφορούν βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν. Διάφορα εμπορικά σκευάσματα βασίζονται σε μικροσφαιρίδια βιοπολυμερών καθώς τα υλικά αυτά δίνουν τη δυνατότητα ενθυλάκωσης διαφόρων τύπων φαρμάκου, παρέχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα καθώς επίσης χορήγηση σταθερών δόσεων για μεγάλα χρονικά διαστήματα^[130]. Το μειονέκτημα που συναντάται συνήθως είναι ο φτωχός έλεγχος του ρυθμού χορήγησης της ενθυλακωμένης ουσίας με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται συνεχώς τεχνικές με σκοπό να καμφθεί το πρόβλημα αυτό^[130].

Τα μικροσφαιρίδια ελεγχόμενης απελευθέρωσης έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές. Για παράδειγμα, έχουν αναπτυχθεί και μελετώνται ακόμη εμβόλια για το AIDS^[131], την ηπατίτιδα B^[132] και τον άνθρακα^[133]. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που εμφανίζεται είναι ότι απαιτούνται επαναλαμβανόμενες δόσεις με σκοπό να επιτευχθεί ανοσία. Παρ' όλα αυτά, μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική είναι η ανάπτυξη εμβολίων μίας δόσης στα οποία το σύστημα ενθυλάκωσης προσφέρει τη δυνατότητα χορήγησης δόσεων σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά τη λήψη του φαρμάκου. Επιπλέον, τα μικροσφαιρίδια συμβάλλουν στην αύξηση της σταθερότητας των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς^[130]. Παράλληλα, μελετάται εκτενώς η ανάπτυξη συστημάτων ενθυλάκωσης για την ασφαλή και αποδοτική χορήγηση του DNA. Η γονιδιακή θεραπεία φαίνεται να προσφέρει απίστευτες δυνατότητες θεραπείας ασθενειών, όπως ο καρκίνος^[130, 134].

Τέλος, ο τομέας αυτός έχει επεκταθεί προς την ανάπτυξη σκευασμάτων βοτάνων και φυτικών εκχυλισμάτων. Έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται συστήματα ενθυλάκωσης βιοδραστικών συστατικών και εκχυλισμάτων φυτών με σκοπό την ενίσχυση της διαλυτότητας, της σταθερότητας, της βιοδιαθεσιμότητας, της φαρμακολογικής δράσης, την επίτευξη σταθερής χορήγησης και την προστασία από τοξικές επιδράσεις^[135].

Στο πλαίσιο αυτό, οι εφαρμογές της ενθυλάκωσης επεκτάθηκαν και στο χώρο της βιομηχανίας των καλλυντικών. Οι καταναλωτές ενδιαφέρονται ολοένα και περισσότερο για την υγεία τους και την εμφάνισή τους. Έχει αυξηθεί, λοιπόν, η ζήτηση για προϊόντα που περιέχουν φυσικά ή/και διατροφικά συστατικά^[136]. Καινοτόμα συστήματα ενθυλάκωσης έχουν αναπτυχθεί και συνεχίζουν να αναπτύσσονται καθώς φαίνεται ότι το κομμάτι αυτό της αγοράς έχει αρχίσει να ανθεί τα τελευταία χρόνια.

Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν λιποσώματα, γαλακτώματα, μικροσωματίδια, νανοσωματίδια, πολυμερή, επιθέματα κ.α.^[136]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εφαρμογές των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή μεταβολίζονται μέσω των φυσιολογικών μεταβολικών οδών, δε συσσωρεύονται στους ιστούς και γι' αυτό δεν προκαλούν ερεθισμούς με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται εκτενώς σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας. Στα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή περιλαμβάνονται: η χιτοζάνη, το υαλουρονικό οξύ, οι κυκλοδεξτρίνες, το αλγινικό οξύ, το άμυλο, οι πολυεστέρες κ.α. Πολλά άρθρα αναφέρονται σε εφαρμογές των υλικών αυτών και κυκλοφορούν εμπορικά καλλυντικά προϊόντα που περιέχουν μικροσωματίδια πολυμερών^[137]. Για παράδειγμα, αρκετή έρευνα έχει διεξαχθεί γύρω από την μικροενθυλάκωση αιθερίων ελαίων σε φορείς βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Η ενθυλάκωση των αιθερίων ελαίων στον πυρήνα των μικροσωματιδίων φαίνεται να προσφέρει προστασία ενάντια στην οξειδωτική υποβάθμιση, να καλύπτει τις δυσάρεστες οσμές και να διασφαλίζει την ελεγχόμενη απελευθέρωση των ουσιών αυτών^[138].

4.4. Εφαρμογές μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος

Τα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος χρησιμοποιούνται εκτενώς σε εφαρμογές της βιοϊατρικής. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για την μικροενθυλάκωση κυττάρων, πρωτεϊνών και βακτηρίων. Η μεταμόσχευση των εγκλεισμένων αυτών μορίων έχει προταθεί ως μια εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση σε πλήθος ασθενειών καθώς φαίνεται ότι με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ανοσοαπομόνωση και η μεταμόσχευση ολοκληρώνεται χωρίς ανεπιθύμητες αντιδράσεις από το ανοσοποιητικό σύστημα. Σε διάφορες μελέτες έχει πραγματοποιηθεί μικροενθυλάκωση διαφορετικών κυττάρων και πρωτεϊνών και έχει αποδειχθεί ότι το αλγινικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε εφαρμογές της μηχανικής κυττάρων και ιστών. Επιπλέον, διερευνάται συνεχώς ο σχεδιασμός μικροσφαιριδίων για τη μεταφορά βιοδραστικών συστατικών μέσω διαφόρων οδών, όπως πχ μέσω της στοματικής κοιλότητας^[139].

Παράλληλα, τα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος φαίνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής. Η αναγεννητική ιατρική συνδυάζει την μηχανική ιστών με τη χορήγηση φαρμάκων και βασίζεται στις αρχές της επιστήμης υλικών και της ιατρικής για να δημιουργήσει ιστούς και όργανα με καλύτερες βιολογικές δομές και λειτουργίες^[110, 140]. Στο πλαίσιο αυτό, λοιπόν, το αλγινικό άλας μπορεί ως υλικό καλύμματος να συμβάλει στην επούλωση πληγών και στην αποκατάσταση του δέρματος προσφέροντας καλή απορρόφηση νερού, προσαρμοστικότητα και ήπιες αντισηπτικές ιδιότητες. Η ενσωμάτωση,

μάλιστα, αργύρου ή ψευδαργύρου μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την αντιμικροβιακή δράση^[140]. Ο ακριβής όμως μηχανισμός δράσης στην επούλωση των πληγών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί^[141]. Το Kaltostat, για παράδειγμα, που αποτελεί εμπορικό προϊόν, φαίνεται να διεγείρει τα μονοκύτταρα να παράγουν υψηλά επίπεδα κυτοκινών, όπως η IL-6 και ο TNF-α συμβάλλοντας στην ταχύτερη επούλωση^[142]. Παράλληλα, αρκετή έρευνα έχει διεξαχθεί γύρω από τις δυνατότητες που προσφέρουν τα μικροσφαιρίδια και οι υδροπηκτές του αλγινικού άλατος στις επισκευές των χόνδρων. Μελέτες χορήγησης ενθυλακωμένου αυξητικού παράγοντα TGF-β και μεσεγχυτικών βλαστοκυττάρων έδειξαν να προωθούν την χονδρογένεση^[143]. Επιπλέον, οι υδροπηκτές και τα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος συμβάλλουν στην αναγέννηση οστών που καταστρέφονται σε τραυματισμούς ή αφαίρεση όγκων, όπως έχουν δείξει κάποιες ερευνητικές ομάδες^[144-146]. Ο τομέας αυτός αναπτύσσεται δυναμικά και απαιτείται αρκετή ακόμη έρευνα μέχρι να βελτιωθούν τα συστήματα ενθυλάκωσης και οι διάφορες τεχνικές ώστε να φτάσουμε στα επιθυμητά αποτελέσματα.

Όσον αφορά, στη συνέχεια, στον τομέα των καλλυντικών και των προϊόντων προσωπικής φροντίδας, τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, συμπεριλαμβανομένου του αλγινικού οξέος, κατέχουν εξέχουσα θέση ως υλικά ενθυλάκωσης. Και αυτό διότι, προστατεύουν τις ευαίσθητες βιοδραστικές ουσίες, αυξάνουν την απόδοση και τη βιοδιαθεσιμότητά τους και απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω φυσιολογικών μεταβολικών οδών χωρίς να προκαλούν ερεθισμούς. Η γνωστή εταιρεία καλλυντικών «L' Oreal» παρήγαγε και περιέγραψε σφαιρικές κάψουλες αλγινικού άλατος που προορίζονται για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα. Σ' αυτά τα σφαιρίδια μπορούν να ενθυλακωθούν υδατοδιαλυτά συστατικά, λιποδιαλυτά πρόσθετα, βιολογικές ενώσεις, χρωστικές ουσίες, αρώματα ή/και αντιηλιακά^[137].

B' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1. Εκχύλιση βύσσινου & παραλλαβή κλάσματος πλούσιο σε ανθοκυανίνες

Εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι των Dai et al. 2009 και Wang et al. 2014 με τροποποιήσεις^[147, 148].

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Μπλέντερ και μαχαίρι οικιακής χρήσης
- ✓ Ζυγός ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (OHAUS)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας 99,8% (Acros Organics)
- ✓ Απιονισμένο H₂O
- ✓ Κιτρικό οξύ σε σκόνη pro analysis (p.a) (Merck)
- ✓ Κωνικές φιάλες με εσφυρισμένο πώμα χωρητικότητας 1000mL
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 250mL
- ✓ Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνητάκι
- ✓ Γυάλινα σιφώνια χωρητικότητας 10mL και πουάρ
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur και πουάρ
- ✓ Φυγόκεντρος (Hermle Z320)
- ✓ Γυάλινα δοχεία φυγοκέντρου χωρίς πώμα χωρητικότητας 80ml
- ✓ Δοχεία κρασιού χωρητικότητας 750mL ως περιέκτες
- ✓ Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Büchi rotavapor R-114)
- ✓ Σφαιρικές φιάλες χωρητικότητας 500mL για την εξάτμιση
- ✓ Συσκευή λυοφιλίωσης (Heto Holten Lyolab 3000)

Αναλυτική πορεία

Τα βύσσινα, μετά την απομάκρυνση των κοτσανιών, πλύθηκαν και τεμαχίστηκαν με μαχαίρι ώστε να αφαιρεθούν τα κουκούτσια. Τα φρούτα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε μπλέντερ και η τελική πούλπα ζύγιζε 1kg. Η ποσότητα αυτή χωρίστηκε σε 4 κωνικές φιάλες του 1L (4*250g) και εκχυλίστηκε 2 φορές με ένα μίγμα διαλυτών. Το μίγμα διαλυτών περιείχε αιθανόλη:νερό:κιτρικό σε % αναλογία 35:65:0,1. Σε κάθε κωνική φιάλη προστέθηκε ομογενοποίημα και μίγμα διαλυτών σε αναλογία 1:1. Καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης στο σκοτάδι, δηλαδή για 1h, γινόταν συνεχής ανάδευση του περιεχομένου όλων των κωνικών με τη βοήθεια μαγνητικών αναδευτήρων. Τα δείγματα, έπειτα, παρέμειναν σε ηρεμία για περίπου 15min. Το περιεχόμενο των κωνικών μεταφέρθηκε με απόχυση σε γυάλινα δοχεία των 80mL και

ακολούθησε φυγοκέντριση για 10min στις 3500rpm (θερμοκρασία δωματίου). Το υπόλειμμα που προέκυψε τοποθετήθηκε ξανά τμηματικά στις κωνικές και ακολούθησε η δεύτερη εκχύλιση με προσθήκη 250mL μίγματος διαλύτη σε κάθε δοχείο. Η δεύτερη εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση για 15min. Τα διαυγή υπερκείμενα (κλάσμα πλούσιο σε ανθοκυανίνες) που προέκυψαν από τις φυγοκεντρίσεις των 2 εκχυλίσεων συλλέχθηκαν σε νέους περιέκτες (φιάλες κρασιού). Το περιεχόμενο των φιαλών μεταφέρθηκε τμηματικά σε σφαιρικές φιάλες των 500mL οι οποίες τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού. Εκεί πραγματοποιήθηκε εξάτμιση της αιθανόλης και μέρους του νερού (αζεοτροπικό μίγμα με αιθανόλη). Στο εκχύλισμα του βύσσινου (υδατική φάση) που παρέμεινε πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση, όπως θα περιγραφεί παρακάτω (Παράγραφος 5.1.1).

5.1.1. Λυοφιλίωση των υδατικών φάσεων του εκχυλίσματος βύσσινου

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ 32 πλαστικά δοχεία αποστειρωμένα
- ✓ Υδατικές φάσεις εκχυλίσματος βύσσινου
- ✓ Συσκευή λυοφιλίωσης (Heto Holten Lyolab 3000)
- ✓ Ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων (KERN ACJ/ACS)
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό πώμα χωρητικότητας 10ml
- ✓ Σπάτουλα

Αρχή μεθόδου

Κάτω από το τριπλό σημείο (T,P), που για το νερό είναι σε θερμοκρασία $T_{TP} = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ και P_{TP} περίπου 610.5 Pa (= 4.58 mm Hg), μια ουσία μεταβαίνει απευθείας από την στερεή στην αέρια φάση (εξάχνωση). Επομένως, για να ξηρανθεί μια ουσία, αρχικά αυτή ψύχεται και τοποθετείται σε αεροστεγή θάλαμο μέσα στον οποίο μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού. Στην χαμηλή αυτή πίεση και καθώς το υλικό ψύχεται, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση.

Αναλυτική πορεία

Τα πλαστικά δοχεία αριθμήθηκαν και προζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Έγινε πλήρωση των πλαστικών δοχείων με τα υδατικά κλάσματα μέχρι το μέσον ώστε να αποφευχθεί πιθανή απώλεια δείγματος. Τα πλαστικά δοχεία καταψύχθηκαν στους -40°C για τουλάχιστον 2 ημέρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο λυοφιλιωτή και η απομάκρυνση του

νερού από τα εκχυλίσματα ολοκληρώθηκε σε 5 ημέρες. Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τα πλαστικά δοχεία ζυγίστηκαν ξανά και το αποξηραμένο εκχύλισμα του βύσσινου υπολογίστηκε περίπου στα 140g. Το εκχύλισμα ζυγίστηκε ανά 2g και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

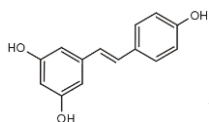
5.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του ολικού φαινολικού (PP) περιεχομένου με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher Chemical, 2,5L)
- ✓ Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich)
- ✓ Δις απεσταγμένο νερό
- ✓ Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου 20% (Na₂CO₃)
- ✓ Γαλλικό οξύ (GA) ως πρότυπη ουσία (Sigma-Aldrich)
- ✓ Eppendorfs χωρητικότητας 1,5mL
- ✓ Αυτόματες πιπέτες των 2-20μL, 50-200μL & 200-1000μL
- ✓ Tips
- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Πλάκες μικροτιτλοδότησης Elisa (Elisa plates)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA (Power Wave X52, BioTek)

Αρχή μεθόδου

Ως αντιδραστήριο folin-ciocalteu ορίζεται το μίγμα των μεταλλικών αλάτων βολφραμίου και μολυβδαινίου που αντιδρούν με έναν ενεργοποιημένο αρωματικό πυρήνα. Η ενεργοποίηση του δακτυλίου ορίζεται από την ύπαρξη συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων στο μόριο, όπως αυτές του υδροξυλίου. Ενεργοποιημένους δακτυλίους αποτελούν οι πολυφαινόλες ενώ τους συναντάμε και στα αμινοξέα που συνθέτουν τις πρωτεΐνες



Εικόνα 5.1. Ενεργοποιημένος βενζολικός δακτύλιος (πυρήνας). Ο πυρήνας αυτός συνιστά τη δομή των φαινολών και των αμινοξέων.

Αναλυτική πορεία

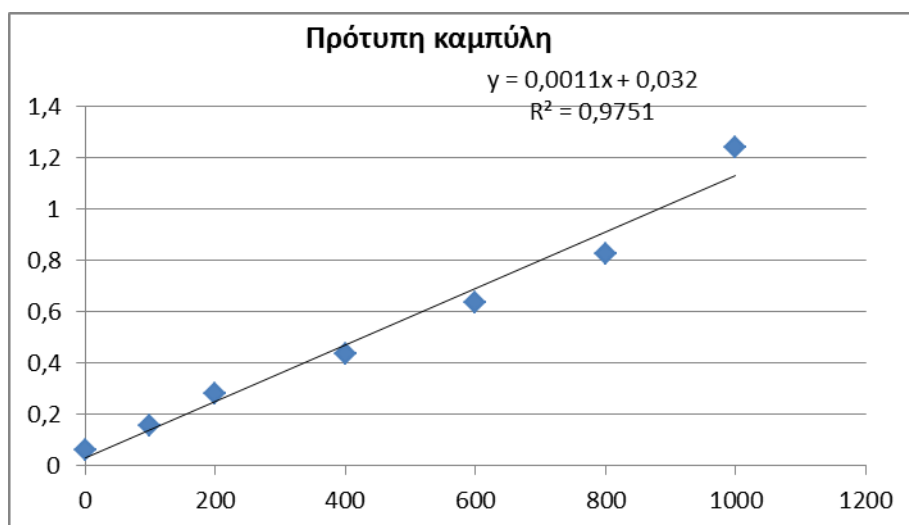
Σε σωλήνες erpendorfs προστίθενται 790μL δις απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια 10μL εκχύλισματος (δείγματος). Κατόπιν, προστίθενται 50μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα παραμένουν σε ηρεμία για 1min. Τέλος, προστίθενται 150μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Ακολουθεί παραμονή στο σκοτάδι για 2h. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm ως προς το δείγμα ελέγχου (blank). Το δείγμα ελέγχου παρασκευάζεται αναμιγνύοντας όλα τα αντιδραστήρια που προαναφέρθηκαν εκτός από το εκχύλισμα, ήτοι τα 10μL δείγματος αντικαθίστανται με 10μL μεθανόλης.

Καμπύλη αναφοράς προτύπου για τον προσδιορισμό ολικών φαινολών

Για την αξιολόγηση των απορροφήσεων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με GA και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα GA:

Από μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος παρασκευάζεται, με αραιώση, διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 1000μg/mL (1mg/mL). Για το σκοπό αυτό ζυγίζεται ποσότητα GA (mg) στην οποία προστίθεται μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (mL) σε αναλογία 1:1. Από το διάλυμα εργασίας παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 και 900μg/mL. Ακολουθεί η αναλυτική πορεία που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου.

Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 750nm χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης $y = f(x)$, όπου y η απορρόφηση (Abs) και x η συγκέντρωση του GA σε μg/mL:



5.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ολικών ανθοκυανινών με τη μέθοδο διαφορικού pH

Εφαρμόστηκε η μέθοδος των Lee et al. 2005^[149].

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου καλίου (KCl) pH 1,0
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa) pH 4,5
- ✓ Eppendorfs χωρητικότητας 1,5mL
- ✓ Αυτόματες πιπέτες των 50-200μL και 200-1000μL
- ✓ Tips
- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Πλάκες μικροτιτλοδότησης Elisa (Elisa plates)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA (Power Wave X52, BioTek)

Αρχή μεθόδου

Η χρωμοφόρα ομάδα των ανθοκυανινών αλλάζει χημική δομή ανάλογα με το pH. Συγκεκριμένα, σε pH 1,0 εμφανίζεται η δομή έγχρωμου οξωνίου, ενώ σε pH 4,5 οι ανθοκυανίνες αποχρωματίζονται. Η διαφορά στην απορρόφηση στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών μετά από αφαίρεση τυχόν παρεμποδίσεων (μέτρηση της απορρόφησης στα 700nm).

Αναλυτική πορεία

Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 σωλήνες eppendorfs. Στον ένα προστίθενται 800μL δ/τος KCl pH 1,0 και στον άλλο 800μL δ/τος CH₃COOH/CH₃COONa pH 4,5. Στη συνέχεια, προστίθενται 200μL δείγματος σε κάθε eppendorf. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση σε vortex και τα δείγματα μένουν σε ηρεμία για 1min. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 510nm και στα 700nm.

Οι ολικές ανθοκυανίνες υπολογίζονται βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Ολικές ανθοκυανίνες (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

όπου $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$, MW = το μοριακό βάρος (484,9g/mol), DF = συντελεστής αραίωσης, $\epsilon = 26.900 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας 3-Ο-γλυκοζίτη κυανιδίνης και 1000 = μετατροπή από g σε mg.

5.3.1. Παρασκευή διαλυμάτων

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Πεχάμετρο (Metrohm Q 744 pH meter)
- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Σκόνη KCl p.a (Merck) & CH₃COONa p.a (SDS)
- ✓ Διαλυμα υδροχλωρίου (HCl) συγκέντρωσης 4M
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur και πουάρ
- ✓ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250mL και 500mL
- ✓ Προχοΐδα
- ✓ Μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητάκια
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 500mL

Αναλυτική πορεία

Τίθεται σε λειτουργία το πεχάμετρο. Το ηλεκτρόδιο, που είναι αποθηκευμένο σε διαλυμα KCl, βυθίζεται σε απιονισμένο νερό και παραμένει πάντα βυθισμένο μεταξύ των μετρήσεων. Το όργανο βαθμονομείται πάντα πριν την πρώτη μέτρηση με πρότυπα διαλύματα pH 4,0 και pH 7,0.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων, σε 2 ποτήρια ζέσεως των 500mL ζυγίστηκαν ποσότητες στερεού KCl και CH₃COONa ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 0,025M και 0,4M, αντίστοιχα, σύμφωνα με τη μέθοδο διαφορικού pH. Οι ποσότητες αυτές διαλύθηκαν σε ορισμένο όγκο απιονισμένου νερού, 20% μικρότερο από τον τελικό ώστε να υπάρχει αρκετός διαθέσιμος όγκος για τη ρύθμιση. Το pH των διαλυμάτων KCl και CH₃COONa ήταν υψηλό και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα HCl 4M ώστε να ρυθμιστεί στο 1,0 και 4,5 , αντίστοιχα. Η προσθήκη του HCl γινόταν στάγδην μέχρι το pH να φτάσει στην επιθυμητή τιμή. Τα διαλύματα αναδεύονταν συνεχώς κατά τη ρύθμιση με τη βοήθεια μαγνητικών αναδευτήρων. Μετά τη ρύθμιση, έγινε απόχυση των διαλυμάτων σε ογκομετρικές φιάλες και ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε στα 500mL.

5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

1) Εφαρμογή της HPLC για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών

Αντιδραστήρια και όργανα

Σύστημα HPLC (Agilent Technologies, model 1050, Waldbronn, Germany) αποτελούμενο από:

- ✓ αντλία, αυτόματου δειγματολήπτη
- ✓ ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (HP-1050, DAD)
- ✓ ανιχνευτή φθορισμού (HP-1046A)
- ✓ στήλη χρωματογραφίας Purospher Star RP-18 endcapped (250*4,6, 5μm, Lichrocart) (Merck –Millipore, Darmstadt, Germany)
- ✓ λογισμικό ανάλυσης δεδομένων HPLC

Αναλυτική πορεία

Η ανάλυση του προφίλ των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων έγινε με χρωματογραφία αναστροφής φάσεως (RP-HPLC analysis). Για την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής DAD (280nm) και σύστημα 2 διαλυτών αποτελούμενο από 1% v/v HCOOH και μεθανόλη. Η ανάλυση έγινε με ροή 0,8 mL/min και με βαθμωτή έκλυση ως ακολούθως: αρχικές συνθήκες και ως το 1ο λεπτό το ποσοστό της μεθανόλης ήταν 18%, το ποσοστό αυξήθηκε στο 50% έως το 26^ο λεπτό, στο 90% έως το 33^ο λεπτό και στο 100% έως το 45^ο λεπτό, ενώ στο 50^ο λεπτό το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Μετά το τέλος της διαδικασίας, ακολούθησε εξισορρόπηση του συστήματος για 10 λεπτά. Ο όγκος του κάθε δείγματος που εγχύστηκε ήταν 10μL.

Η ανάλυση του προφίλ των ανθοκυανινών των δειγμάτων έγινε με χρωματογραφία αναστροφής φάσεως (RP-HPLC analysis). Για τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής DAD (280, 520nm) και σύστημα 2 διαλυτών αποτελούμενο από 10% v/v HCOOH και μεθανόλη. Η ανάλυση έγινε με ροή 0,8mL/min και βαθμωτή έκλυση ως ακολούθως: αρχικές συνθήκες και έως το 1^ο λεπτό το ποσοστό της μεθανόλης ήταν 18%, το ποσοστό αυξήθηκε στο 50% έως το 26^ο λεπτό, στο 90% έως το 33^ο λεπτό, στο 95% έως το 35^ο λεπτό και στο 100% έως το 40^ο λεπτό, ενώ έως το 43^ο λεπτό το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Μετά το τέλος της διαδικασίας, ακολούθησε εξισορρόπηση του συστήματος για 10 λεπτά. Ο όγκος του κάθε δείγματος που εγχύστηκε ήταν 20μL.

2) Εφαρμογή της HPLC για τον προσδιορισμό σακχάρων

Η ανάλυση των δομικών σακχάρων έλαβε χώρα με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (HPLC-RI). Η ανάλυση έλαβε χώρα ισοκρατικά με διαλύτη έκλουσης μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 70/30 σε στήλη purosphere star amino bonded (250x4.6, 5μm) (Merck GmbH) με ροή 1mL/min, υπό θερμοκρασία 40°C.

5.5. Μερικός καθαρισμός εκχυλίσματος με χρήση ρητινών και παραλαβή κλάσματος ανθοκυανινών

Εφαρμόστηκε η μέθοδος των *Bunea et al. 2013* με τροποποιήσεις^[150].

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher Chemical, 2,5L)
- ✓ HCl p.a 37% (Merck, 2,5L)
- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Γυάλινες μεγάλες χρωματογραφικές στήλες
- ✓ Προχοϊδες
- ✓ Ρητίνη XAD-7 (Amberlite Alfa Aesar, 500g)
- ✓ Ζυγός ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (OHAUS)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250 mL
- ✓ Γυάλινες ράβδοι ανάδευσης
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur και πουάρ
- ✓ Αυτόματη πιπέτα των 200-1000μL
- ✓ Σφαιρικές φιάλες χωρητικότητας 100mL και 500mL
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό πώμα χωρητικότητας 10mL
- ✓ Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Büchi rotavapor R-114)
- ✓ Συμπυκνωτής κενού Speed vacuum (Labconco)

Αναλυτική πορεία

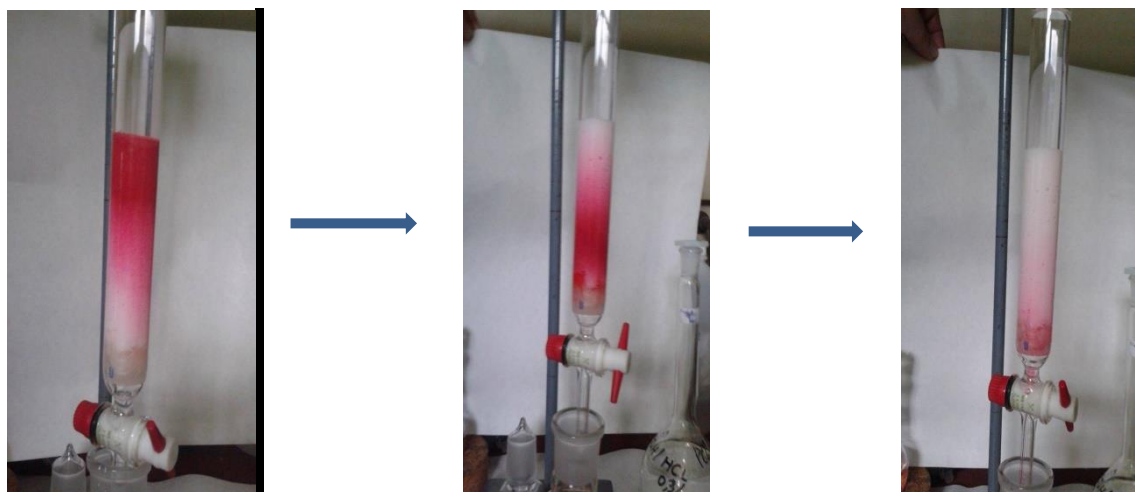
Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με αναλογία δείγματος:ρητίνης, 1:10. Η κάθε στήλη χρωματογραφίας κατέστη δυνατό να χρησιμοποιηθεί μέχρι 3 φορές. Αρχικά, ζυγίστηκαν 20g ρητίνης XAD-7 για κάθε 2g λυοφιλωμένου εκχυλίσματος βύσσινου (αποθηκευμένα όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.1.1), που επρόκειτο να καθαριστούν χρωματογραφικά. Αυτή η

ποσότητα της ρητίνης διαλύθηκε σταδιακά σε 120mL απιονισμένου νερού οξινισμένου με διάλυμα HCl 0,3% υπό συνεχή ανάδευση με χρήση γυάλινης ράβδου. Το προσροφητικό υλικό τοποθετήθηκε σε γυάλινη στήλη, στο κάτω μέρος της οποίας είχε προστεθεί υαλοβάμβακας. Τα 120mL οξινισμένου απιονισμένου νερού διαπέρασαν 3 φορές τη ρητίνη ώστε αυτή να πακεταριστεί κατάλληλα και τελικά η ρητίνη παρέμεινε ενυδατωμένη. Η περίσσεια του νερού φυλάχτηκε για τον καθαρισμό της στήλης μετά το πέρας της διαδικασίας. Μετά την προετοιμασία της χρωματογραφίας στήλης, ξεκίνησε η διαδικασία παραλαβής των κλασμάτων. Το δείγμα των 2g αναδιαλύθηκε σε τελικό όγκο 3mL απιονισμένου νερού οξινισμένου με διάλυμα HCl 0,3% και προστέθηκε προσεκτικά με γυάλινη πιπέτα Pasteur πάνω από τη στήλη της ρητίνης. Το δείγμα αφέθηκε να προσροφηθεί στη στήλη με χαμηλή ροή. Στη συνέχεια, στη στήλη προστέθηκαν 72mL οξινισμένου απιονισμένου νερού και συλλέχθηκε στάγδην (1 σταγόνα/sec) το πρώτο υδατικό κλάσμα που ήταν πλούσιο σε σάκχαρα. Η συλλογή όλων των υδατικών κλασμάτων απ' όλες τις διαδικασίες καθαρισμού έγινε σε μια μεγάλη σφαιρική φιάλη των 500mL. Έπειτα, η έκλουση του κλάσματος των ανθοκυανινών έγινε στάγδην με 72mL μεθανόλης οξινισμένης με διάλυμα HCl 0,3%. Τα πρώτα 10mL συλλέχθηκαν ως ξεχωριστό ενδιάμεσο κλάσμα, στο οποίο περιεχόταν και νερό, σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10mL. Η συλλογή των υπόλοιπων 62mL, του πλούσιου δηλαδή κλάσματος σε ανθοκυανίνες, έγινε σε σφαιρική φιάλη των 100mL. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε αρκετές φορές και τελικά καθαρίστηκαν μερικώς συνολικά 24g εκχυλίσματος βύσσινου. Όλες οι σφαιρικές που περιείχαν κλάσμα ανθοκυανινών τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού για απομάκρυνση του διαλύτη. Τα δείγματα τελικά (ανά 3), έφτασαν σε τελικό όγκο 9mL με μεθανόλη και αποθηκεύτηκαν σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες. Δύο από αυτούς τους δοκιμαστικούς τοποθετήθηκαν στο συμπυκνωτή κενού και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού. Έγινε λήψη δείγματος το οποίο αναλύθηκε με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (παράγραφος 5.2), με τη μέθοδο διαφορικού pH (παράγραφος 5.3) και ως προς τα επιμέρους συστατικά με HPLC. Επιπλέον, έγινε λήψη δείγματος από τα υδατικά και τα ενδιάμεσα κλάσματα για την ανάλυση τους σε σάκχαρα με HPLC. Οι 4 δοκιμαστικοί σωλήνες καθώς και τα δείγματα των υδατικών και των ενδιάμεσων κλασμάτων αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

Παρακάτω ακολουθούν φωτογραφίες από τις πειραματικές διαδικασίες που αναλύθηκαν στην παράγραφο 5.5:



Εικόνα 5.2. Πακεταρισμένες στήλες χρωματογραφίας



Εικόνα 5.3. Διαδικασία μερικού καθαρισμού με ρητίνη

5.6. Μικροενθυλάκωση με άλας αλγινικού οξέος

Το εκχύλισμα του βύσσινου, η παραγωγή του οποίου περιγράφηκε στην παράγραφο 6.1 καθώς επίσης το μερικώς καθαρισμένο κλάσμα ανθοκυανινών, το οποίο διαχωρίστηκε χρωματογραφικά σύμφωνα με την παράγραφο 6.5, ενθυλακώθηκαν σε μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέος με τη μέθοδο της εξωτερικής ζελατινοποίησης (εξωτερική πηγή ασβεστίου). Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε έναντι της εσωτερικής ζελατινοποίησης καθώς, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 4.2, τα μικροσφαιρίδια που παρασκευάζονται με εσωτερική πηγή ασβεστίου έχουν πιο χαλαρή δομή και μεγαλύτερο μέγεθος πόρων^[151].

Αρχή μεθόδου

Το άλας αλγινικού οξέος του αρχικού διαλύματος αντιδρά με τα άλατα του ασβεστίου με ιοντικό πολυμερισμό δημιουργώντας πηκτώματα που σε χαμηλό pH μεταβάλλονται σε αλγινικό οξύ, μια ένωση που είναι αδιάλυτη στο νερό. Τα μικροσταγονίδια που σχηματίζονται συνιστούν απομονωμένες και σταθερές δομές που μπορούν να ξηρανθούν με ψύξη και να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ενθυλάκωση πραγματοποιήθηκε με 2 τρόπους ως ακολούθως:

5.6.1. Α' Τεχνική: μικροενθυλάκωση με εμβάπτιση στο δείγμα

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Άλας αλγινικού οξέος (from brown algae/ Sigma-Aldrich)
- ✓ Διάλυμα CaCl_2 (σκόνη CaCl_2 -dihydrate Merck) 0,18M
- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250mL
- ✓ Γυάλινες ράβδοι ανάδευσης
- ✓ Ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητάκια
- ✓ Σύριγγες των 20mL και βελόνες
- ✓ Γυάλινη φιάλη διηθήσεως χωρητικότητας 500mL
- ✓ Χωνί Buchner, πορσελάνης
- ✓ Διηθητικό χαρτί
- ✓ Φούρνος αντιστάσεων (Memmert)
- ✓ Μεγάλα γυάλινα κρυσταλλωτήρια
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με δείγμα
- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Λουτρό υπερήχων (Elma, S60 Elmasonic)
- ✓ Γυάλινα δοχεία για την εμβάπτιση των μικροσφαιριδίων
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 250mL
- ✓ Πλαστικά πεπλατυσμένα δοχεία για αποθήκευση (τριβλία)
- ✓ Πάραφιλμ
- ✓ Συσκευή λυοφιλίωσης (Heto Holten Lyolab 3000)

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα άλατος αλγινικού οξέος σε νερό (πηκτή ή γέλη, gel) με τελική συγκέντρωση 1,5%. Το αλγινικό αναμίχθηκε αργά και σταδιακά με το νερό σε ποτήρι ζέσεως υπό συνεχή ανάδευση με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να προκύψει ομοιογενής γέλη.



Εικόνα 5.4. Παρασκευή διαλύματος αλγινικού οξέος 1,5%

Σε δεύτερο ποτήρι ζέσεως προστέθηκε διάλυμα CaCl_2 (20% w/v). Για κάθε 100ml αλγινικού χρησιμοποιήθηκαν 100ml CaCl_2 . Το διάλυμα αλγινικού άλατος προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα CaCl_2 υπό συνεχή ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Για τον ψεκασμό του αλγινικού μέσα στο λουτρό χρησιμοποιήθηκε σύριγγα των 20mL και βελόνα. Τα μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέος αφού αφέθηκαν να σκληρύνουν για 30min, στη συνέχεια, διηθήθηκαν υπό κενό με τη χρήση διάταξης Buchner. Πριν τοποθετηθούν στο φούρνο, ακολούθησε επιπλέον στέγνωμα με διηθητικό χαρτί προκειμένου να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν το περισσότερο από το διάλυμα CaCl_2 γύρω από τα μικροσφαιρίδια. Στη συνέχεια, αυτά τοποθετήθηκαν απλωμένα σε μεγάλο κρυσταλλωτήριο και θερμάνθηκαν σε φούρνο αντιστάσεων στους 60°C για 4h. (Σημείωση: σε κάθε κρυσταλλωτήριο, τοποθετούνταν τόσα μικροσφαιρίδια όσα παρασκευάζονταν από 100mL διαλύματος αλγινικού.)

Παράλληλα, προετοιμάστηκαν τα δείγματα ως εξής: 2g μη καθαρισμένου εκχυλίσματος βύσσινου (από τους δοκιμαστικούς σωλήνες που είχαν αποθηκευτεί σύμφωνα με την παράγραφο 5.1.1) αναδιαλύθηκαν σε 20mL απιονισμένου νερού και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο. Όσον αφορά στο καθαρισμένο κλάσμα ανθοκυανινών, το περιεχόμενο ενός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, που είχαν αποθηκευτεί σύμφωνα με την παράγραφο 6.5, αναδιαλύθηκε με 6mL απιονισμένου νερού. Για την αναδιάλυση, το μίγμα ανακινήθηκε ισχυρά σε συσκευή vortex και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10min με διακοπόμενη ροή ώστε να αποφευχθούν οι οξειδώσεις. Τα 2mL του δείγματος αυτού, που περιείχε ποσότητα ανθοκυανινών αντίστοιχη των 2g μη καθαρισμένου εκχυλίσματος, αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 20mL και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο. Μετά από παραμονή 4h στο φούρνο, τα κρυσταλλωτήρια αφέθηκαν για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μικροσφαιρίδια είχαν μικρύνει σε μέγεθος χάνοντας κάποιο ποσοστό νερού. Στη συνέχεια, με χρήση γυάλινης ράβδου, τα μικροσφαιρίδια τοποθετήθηκαν στα γυάλινα

δοχεία, όπου περιέχονταν τα δείγματα. Το περιεχόμενο των δοχείων ανακινήθηκε πολύ καλά με σκοπό η ποσότητα του δείγματος να καλύψει πλήρως τα μικροσφαιρίδια του αλγινικού οξέος. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4°C) για 2h. Μετά τις 2h, τα μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέος διηθήθηκαν υπό κενό με τη χρήση διάταξης Buchner. Επιπλέον, εκπλύθηκαν 2 φορές με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε μέτρηση του όγκου των διηθημάτων και λήψη δειγμάτων για αναλύσεις με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (παράγραφος 5.2.), με τη μέθοδο διαφορικού pH (παράγραφος 5.3.) και ως προς τα επιμέρους συστατικά με HPLC. Τέλος, τα μικροσφαιρίδια, αφού ξηράνθηκαν υπό κενό, τοποθετήθηκαν σε πεπλατυσμένα δοχεία, σφραγίστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν για τουλάχιστον μια μέρα σε κατάψυξη (-40°C). Στη συνέχεια, τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης για 48h. Τα τριβλία πριν και μετά τη διαδικασία λυοφιλίωσης ζυγίστηκαν προκειμένου να καταγραφεί το ακριβές βάρος των μικροσφαιριδίων. Στη συνέχεια τα δοχεία που περιείχαν τα αποξηραμένα μικροσταγονίδια σφραγίστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

5.6.2. Β' τεχνική: μικροενθυλάκωση με έγχυση του δείγματος

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Άλας αλγινικού οξέος (from brown algae/ Sigma-Aldrich)
- ✓ Διάλυμα CaCl_2 (σκόνη CaCl_2 -dihydrate Merck) 0,18M
- ✓ Απιονισμένο νερό
- ✓ Γυάλινα ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 250mL
- ✓ Γυάλινες ράβδοι ανάδευσης
- ✓ Ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνητάκια
- ✓ Αυτόματη πιπέτα των 200-1000μL
- ✓ Σύριγγες των 20mL και βελόνες
- ✓ Γυάλινη φιάλη διηθήσεως χωρητικότητας 500mL
- ✓ Χωνί Buchner, πορσελάνης
- ✓ Διηθητικό χαρτί
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με δείγμα
- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Λουτρό υπερήχων (Elma, S60 Elmasonic)
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος χωρητικότητας 250mL

- ✓ Πλαστικά πεπλατυσμένα δοχεία για αποθήκευση (τριβλία)
- ✓ Πάραφιλμ
- ✓ Συσκευή λυοφιλίωσης (Heto Holten Lyolab 3000)

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα άλατος αλγινικού οξέος σε νερό με τελική συγκέντρωση 1,5%. Το αλγινικό αναμίχθηκε αργά και σταδιακά με νερό σ' ένα ποτήρι ζέσεως υπό συνεχή ανάδευση με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να προκύψει ομοιογενές δείγμα. Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, παρασκευάστηκαν και διαλύματα αλγινικού 0,5% και 2,5%, τα οποία συγκρίθηκαν με το διάλυμα συγκέντρωσης 1,5%.

Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ποσότητες δείγματος όπως και στην Α' τεχνική ενθυλάκωσης. Συγκεκριμένα, 2g μη καθαρισμένου εκχυλίσματος βύσσινου (από τους δοκιμαστικούς σωλήνες που είχαν αποθηκευτεί σύμφωνα με την παράγραφο 5.1.1) αναδιαλύθηκαν με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 2mL. Όσον αφορά στο καθαρισμένο κλάσμα ανθοκυανινών, χρησιμοποιήθηκε το περιεχόμενο ενός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, που είχαν αποθηκευτεί σύμφωνα με την παράγραφο 6.5, και αναδιαλυθεί με 6mL απιονισμένου νερού, σύμφωνα με την παράγραφο 6.6.1. Το δείγμα των καθαρισμένων ανθοκυανινών ανακινήθηκε ξανά ισχυρά σε συσκευή vortex και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10min με διακοπτόμενη ροή. Τα 2mL του δείγματος αυτού, που περιείχε ποσότητα ανθοκυανινών αντίστοιχη των 2g μη καθαρισμένου εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν για ενθυλάκωση σε 100mL διαλύματος αλγινικού οξέος.

Τα 2mL του καθαρισμένου και του μη καθαρισμένου δείγματος αναμείχθηκαν στάγδην με το διάλυμα αλγινικού άλατος τελικής συγκέντρωσης 1,5%. Η ανάμειξη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η ανάδευση σταμάτησε όταν το μίγμα ήταν πλέον ομοιογενές. Σε δεύτερο ποτήρι ζέσεως προστέθηκε διάλυμα CaCl_2 (20% w/v). Για κάθε 100mL αλγινικού χρησιμοποιήθηκαν 100mL CaCl_2 . Το διάλυμα μίγματος αλγινικού άλατος και δείγματος προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα CaCl_2 υπο συνεχή ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα. Για τον ψεκασμό του αλγινικού χρησιμοποιήθηκε σύριγγα των 20mL και βελόνα. Τα μικροσφαιρίδια αλγινικού οξέος, στα οποία είχε ενθυλακωθεί το δείγμα, αφήνονταν να σκληρύνουν στο CaCl_2 και κάθε 15min διηθούνταν υπό κενό με τη χρήση διάταξης Buchner με σκοπό να παραμείνει ενθυλακωμένο το μέγιστο δυνατό ποσοστό του δείγματος. Αφότου παρήχθη και διηθήθηκε όλος ο όγκος των μικροσφαιριδίων, αυτά

ξεπλύθηκαν υπό κενό 2 φορές με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε μέτρηση του όγκου των διηθημάτων και λήψη δειγμάτων για αναλύσεις με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (παράγραφος 5.2.), με τη μέθοδο διαφορικού pH (παράγραφος 5.3.) και ως προς τα επιμέρους συστατικά με HPLC. Τέλος, τα μικροσφαιρίδια, αφού ξηράνθηκαν υπό κενό, τοποθετήθηκαν σε πεπλατυσμένα δοχεία, σφραγίστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν για τουλάχιστον μια μέρα σε κατάψυξη (-40°C). Στη συνέχεια, τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης για 48h. Τα τριβλία πριν και μετά τη διαδικασία λυοφιλίωσης ζυγίστηκαν προκειμένου να καταγραφεί το ακριβές βάρος των μικροσφαιριδίων. Στη συνέχεια τα δοχεία που περιείχαν τα αποξηραμένα μικροσταγονίδια σφραγίστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

5.7. Απόδοση ενθυλάκωσης

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Διηθήματα δειγμάτων
- ✓ Αντιδείγματα αρχικών εκχυλισμάτων σε vials
- ✓ Αυτόματες πιπέτες των 50-200μL και 200-1000μL
- ✓ Πλάκες μικροτιτλοδότησης Elisa (Elisa plates)
- ✓ Φασματοφωτόμετρο ELISA (Power Wave X52, BioTek)

Αναλυτική πορεία

Πριν την ενθυλάκωση, σε κάθε πειραματική διαδικασία, μικρή ποσότητα των δειγμάτων (μη κατεργασμένων και ακατέργαστων εκχυλισμάτων), που επρόκειτο να ενθυλακωθούν, αποθηκευόταν προκειμένου να γίνει ανάλυση ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και τις ολικές ανθοκυανίνες (αρχική θεωρητική ποσότητα-α.θ.π), σύμφωνα με τις μεθόδους των παραγράφων 5.2 και 5.3. Παράλληλα, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 5.5, είχαν αποθηκευτεί σε κατάψυξη (-40°C) δείγματα των διηθημάτων, τα οποία αναλύθηκαν ως προς τα ολικά και τα επιμέρους φαινολικά συστατικά. Η απόδοση της ενθυλάκωσης υπολογίστηκε, βάσει των φασματοφωτομετρικών μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο ELISA, με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{mg ανθοκυανινών που προστέθηκαν/L (α.θ.π)-mg ανθοκυανινών που δεν ενθυλακώθηκαν/L}$$

$$\text{Ενθυλάκωση (\%)} = \frac{\text{mg ανθοκυανινών που προστέθηκαν/L (α.θ.π)}}{\text{mg ανθοκυανινών που προστέθηκαν/L (α.θ.π)}}$$

$$\text{Ενθυλάκωση (\%)} = \frac{\text{mg PP που προστέθηκαν/g(α.θ.π)} - \text{mg PP που δεν ενθυλακώθηκαν/g}}{\text{mg PP που προστέθηκαν/g (α.θ.π)}}$$

5.8. Ελεγχόμενη απελευθέρωση ενθυλακωμένου δείγματος

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό πώμα χωρητικότητας 20mL
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα απιονισμένου νερού pH 1,4
- ✓ Γυάλινο σιφόνιο χωρητικότητας 10mL και πουάρ
- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Αυτόματη πιπέτα των 200-1000μL
- ✓ Eppendorfs χωρητικότητας 1,5mL
- ✓ Cryobox

Αναλυτική πορεία

Μικροσφαιρίδια (300mg), κάθε πειραματικής διαδικασίας, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και τοποθετήθηκαν σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες των 20mL. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προστέθηκαν με γυάλινο σιφόνιο 15mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 1,4. (Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.1.). Στο pH αυτό, οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα και εν δυνάμει θα μπορούσαμε να επιτύχουμε σταθερότητα και στο περιβάλλον του γαστρικού υγρού.

Στη συνέχεια, τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά σε συσκευή vortex και παρέμειναν σε ηρεμία για t=5min, οπότε και πραγματοποιήθηκε η λήψη διαυγούς υπερκειμένου (500μL) σε σωλήνες eppendorfs για την 1^η χρονική στιγμή. Έπειτα, ακολούθησε λήψη δειγμάτων σε 6 ακόμη χρονικές στιγμές: t=15min, t=30min, t=1h, t=2h, t=3h και t=24h. Σε κάθε χρονική στιγμή, ισχυρές αναδεύσεις σε vortex προηγούνταν της λήψης των δειγμάτων. Όλα τα eppendorfs αποθηκεύτηκαν σε cryoboxes σε κατάψυξη (-40°C). Ακολούθησε η ανάλυσή τους με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (παράγραφος 5.2) και με τη μέθοδο διαφορικού pH (παράγραφος 5.3).

Βάσει των φασματοφωτομετρικών αυτών μεθόδων, υπολογίστηκαν τα ποσοστά απελευθέρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών και των ανθοκυανινών σε κάθε χρονική στιγμή για κάθε δείγμα, με τις παρακάτω εξίσωσεις:

$$\text{Απελευθέρωση (\%)} = \frac{\text{mg ολικών φαινολικών συστατικών που απελευθερώθηκαν}}{\text{mg ολικών φαινολικών συστατικών που ενθυλακώθηκαν}}$$

$$\text{Απελευθέρωση (\%)} = \frac{\text{mg ανθοκυανινών που απελευθερώθηκαν}}{\text{mg ανθοκυανινών που ενθυλακώθηκαν}}$$

Έπειτα, σχεδιάστηκαν καμπύλες, στις οποίες ως οριζόντιος άξονας ορίστηκε ο χρόνος απελευθέρωσης (t) των ενθυλακωμένων ουσιών και ως κάθετος άξονας το ποσοστό απελευθέρωσης.

5.9. Μελέτη σταθερότητας σε υψηλές θερμοκρασίες

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- ✓ Σπάτουλα
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό πώμα χωρητικότητας 10mL
- ✓ Φούρνος αντιστάσεων (Mettler)
- ✓ Φούρνος με αέρα (Ravens oven LTE Scientific LTD)

(α) Θερμική σταθερότητα μικροσφαιριδίων

Αναλυτική πορεία

Μικροσφαιριδίων (100mg) από κάθε τριβλίο ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και τοποθετήθηκαν σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL. Σε κάθε πειραματική διαδικασία (κάθε τριβλίο) αντιστοιχίστηκαν 7 δοκιμαστικοί σωλήνες και η θερμική σταθερότητα ελέγχθηκε στους 90°C και στους 120°C:

1. control
2. 90°C t=30min
3. 90°C t=1h

4. 90°C t=2h
5. 90°C t=6h
6. 120°C t=10min
7. 120°C t=20min

Τα δείγματα των 90°C τοποθετήθηκαν σε φούρνο αντιστάσεων και τα δείγματα των 120°C σε φούρνο με αέρα. Σε κάθε χρονική στιγμή, τα δείγματα απομακρύνονταν γρήγορα από το φούρνο και τοποθετούνταν σε λουτρό πάγου. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα σφραγίστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-40°C) για περαιτέρω αναλύσεις.

(β) Θερμική σταθερότητα αρχικού μη καθαρισμένου και καθαρισμένου δείγματος

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε, επίσης, σε αρχικό μη καθαρισμένο και καθαρισμένο δείγμα βύσσινου με σκοπό να γίνει σύγκριση της σταθερότητας των ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες.

Μη καθαρισμένο δείγμα (30mg) ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και τοποθετήθηκε σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL. Αντίστοιχα, καθαρισμένο δείγμα (6mg) ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκε σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχίστηκαν 7 δοκιμαστικοί σωλήνες και η θερμική σταθερότητα ελέγχθηκε στους 90°C και στους 120°C:

1. control
2. 90°C t=30min
3. 90°C t=1h
4. 90°C t=2h
5. 90°C t=6h
6. 120°C t=10min
7. 120°C t=20min

(γ) Παραλαβή και ανάλυση των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Δείγματα control, 90°C & 120°C
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα απιονισμένου νερού pH 1,4
- ✓ Αυτόματες πιπέτες των 50-200μL και των 200-1000μL
- ✓ Tips

- ✓ Αναδευτήρας Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Λουτρό υπερήχων (Elma, S60 Elmasonic)
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 10mL
- ✓ Φυγόκεντρος (Hermle Z320)

Αναλυτική πορεία

Όλα τα δείγματα εκχυλίστηκαν 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα απιονισμένου νερού. Συγκεκριμένα, κατά την πρώτη εκχύλιση, προστέθηκε σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 1mL διαλύτη και τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά σε συσκευή vortex. Αφού παρέμειναν σε ηρεμία για 30min, τοποθετήθηκαν για 10 min σε λουτρό υπερήχων με διακοπτόμενη ροή για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης. Στη 1h, ακολούθησε συλλογή των υπερκειμένων. Για τη δεύτερη εκχύλιση, προστέθηκε εκ νέου 1mL διαλύτη, τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά σε vortex και παρέμειναν σε ηρεμία για 30min οπότε και συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα. Η τρίτη εκχύλιση, που διήρκεσε 20min, πραγματοποιήθηκε με 0,5mL διαλύτη και ισχυρή ανάδευση σε συσκευή vortex για 30sec. Τα υπερκείμενα των τριών εκχυλίσεων συλλέχθηκαν σε νέους αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες και ο τελικός όγκος έφτασε στα 3mL. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10min στις 3000rpm με σκοπό να προκύψουν εντελώς διανυγή εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα αυτά αναλύθηκαν με τη μέθοδο διαφορικού pH (παράγραφος 5.3), με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (παράγραφος 5.2) καθώς και για τα επιμέρους συστατικά με τη μέθοδο HPLC.

Η % σταθερότητα των ενθυλακωμένων και μη ενθυλακωμένων δειγμάτων υπολογίστηκε με τις παρακάτω εξισώσεις:

Για τα αρχικά μη ενθυλακωμένα δείγματα

$$\text{Σταθερότητα (\%)} = \frac{\text{mg ανθοκυανινών/g αρχικού δείγματος (διάφοροι χρόνοι)}}{\text{mg ανθοκυανινών/g αρχικού δείγματος (ελέγχου)}}$$

$$\text{Σταθερότητα (\%)} = \frac{\text{mg ολικών φαινολών/g αρχικού δείγματος (διάφοροι χρόνοι)}}{\text{mg ολικών φαινολών/g αρχικού δείγματος (ελέγχου)}}$$

Για τα ενθυλακωμένα δείγματα

$$\text{Σταθερότητα (\%)} = \frac{\text{mg ανθοκυανινών/g μικροσφαιριδίων (διάφοροι χρόνοι)}}{\text{mg ανθοκυανινών/g μικροσφαιριδίων (ελέγχου)}}$$
$$\text{Σταθερότητα (\%)} = \frac{\text{mg ολικών φαινολών/g μικροσφαιριδίων (διάφοροι χρόνοι)}}{\text{mg ολικών φαινολών/g μικροσφαιριδίων (ελέγχου)}}$$

Έπειτα, σχεδιάστηκαν οι καμπύλες % σταθερότητας στις διάφορες θερμοκρασίες για όλα τα δείγματα. Τέλος, έγινε σύγκριση της σταθερότητας μεταξύ των ελεύθερων και ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των ενθυλακωμένων δειγμάτων.

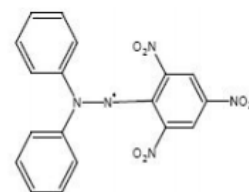
5.10. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

Αντιδραστήρια και όργανα

- ✓ Διάλυμα 2,2-διφαινύλο-1-πικρυλ-υδραζυλο ελεύθερη ρίζα (DPPH) σε μεθανόλη
- ✓ Διάλυμα Trolox μητρικό 1,6 mM σε μεθανόλη
- ✓ Δις απεσταγμένο νερό
- ✓ Αιθανόλη αναλυτικής καθαρότητας 99,8% (Acros Organics)
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες με μπλε βιδωτό πώμα χωρητικότητας 20mL
- ✓ Κυψελίδες των 3mL
- ✓ Ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων (OHAUS analytical standard)
- ✓ Αυτόματη πιπέτα των 200-1000μL και tips
- ✓ Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (SPECORD 200-analytikjena)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην δέσμευση της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH από τις αντιοξειδωτικές ουσίες του δείγματος. Η ελεύθερη ρίζα μετά την προσφορά υδρογόνου/ ηλεκτρονίου ανάγεται σε υδραζίνη με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος. Όσο



Εικόνα 5.5. Η ρίζα DPPH●

μεγαλύτερη, δηλαδή, ποσότητα ελεύθερης ρίζας δεσμεύεται, το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από μωβ σε κίτρινο.

Αναλυτική πορεία

Πριν την έναρξη της διαδικασίας, παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH σε μεθανόλη (10 μΜ). Το πυκνό διάλυμα DPPH αραιώθηκε 1:10 με μίγμα από δις απεσταγμένο νερό και αιθανόλη (5/4).

Μικροσφαιρίδια (20 ή 40mg) κάθε πειραματικής διαδικασίας ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων και τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες. Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 3mL αραιωμένου διαλύματος DPPH. Η απορρόφηση των ενθυλακωμένων δειγμάτων και των κενών μικροσφαιριδίων (δείγμα ελέγχου) στα 515nm καταγράφηκε για 2,5h. Παράλληλα αξιολογήθηκε η απορρόφηση αραιωμένου διαλύματος DPPH. Τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν στον ακόλουθο τύπο, ο οποίος δείχνει το ποσοστό μείωσης (δέσμευσης) της ρίζας DPPH:

$$\% \Delta A_{515} = ((A_{515} \text{ DPPH} - A_{515} \text{ δείγματος}) / A_{515} \text{ DPPH}) \times 100$$

και εκφράστηκαν σε ισοδύναμα mM Trolox ανά χρονική στιγμή, με χρήση κατάλληλης καμπύλης αναφοράς $\psi = f(x)$, όπου x η ποσότητα Trolox (nmol) και ψ η μεταβολή της απορρόφησης στα 515nm $(\% \Delta A) = [(A_{515}(t_0) - A_{515}(t_1)) / A_{515}(t_0)] \times 100$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Επιλογή κατάλληλου εκχυλίσματος φρούτου και συστήματος εκχύλισης ανθοκυανινών

Προκειμένου να επιλεγεί τόσο το κατάλληλο εκχύλισμα φρούτου όσο και το κατάλληλο σύστημα εκχύλισης κλάσματος πλούσιου σε ανθοκυανίνες, καταλήξαμε σε μια σειρά πιλοτικών πειραμάτων. Κατά τη διάρκεια των πιλοτικών αυτών εφαρμογών, εκχυλίστηκαν διάφορα φρούτα, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες και ελέγχθηκαν διάφορες αναλογίες διαλύτη:δείγματος, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6.1. Σύγκριση εκχυλισμάτων φρούτων και εκχυλιστικών μέσων για την παραλαβή ανθοκυανινών

Φρούτο	Εκχυλιστικό μέσο	Αναλογία διαλυτών	Μέσο εκχ. : δείγμα	Ολικές ανθοκυανίνες (mg/100g fw)
Βύσσινο	EtOH/H ₂ O/κιτρικό	34,9:65:0,1	5:1	34,1±0,5
	H ₂ O/κιτρικό	99,9:0,1	5:1	20,4±1,9 ^a
	Μεθανόλη(MeOH)/HCl	99,9:0,1	5:1	23,5±0,8 ^a
Φράουλα	EtOH/H ₂ O/κιτρικό	34,9:65:0,1	5:1	34,4±3,8
	H ₂ O/κιτρικό	99,9:0,1	5:1	33,2±2,1
	Μεθανόλη(MeOH)/HCl	99,9:0,1	5:1	30,7±1,2
Πούλπα κερασιού	EtOH/H ₂ O/κιτρικό	34,9:65:0,1	5:1	43,4±2,8
	H ₂ O/κιτρικό	99,9:0,1	5:1	10,1±0,9
	Μεθανόλη(MeOH)/HCl	99,9:0,1	5:1	49,3±0,3

^aΣτατιστικά σημαντική διαφορά με μίγμα αιθανόλης/νερού/κιτρικού για το βύσσινο

Πίνακας 6.2. Σύγκριση διάφορων αναλογιών εκχυλιστικού μέσου και δείγματος βύσσινου για την παραλαβή ανθοκυανινών κατά τη χρήση ως μέσου εκχύλισης του μίγματος αιθανόλη (EtOH) – νερό – κιτρικό οξύ (34,9:65:0,1)

Μέσο εκχ. : δείγμα	Ολικές ανθοκυανίνες (mg/100g fw)
5:1	34,1±0,5
2:1	35,6±1
1:1	34,1±0,1

Συγκρίθηκαν 3 φρούτα (Πίνακας 6.1) και 3 διαλύτες: οξινισμένη μεθανόλη, που είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης, οξινισμένο μίγμα αιθανόλης/νερού και οξινισμένο νερό. Οι δύο τελευταίοι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν διότι επιδίωξή μας ήταν η εκχύλιση να είναι όσο το δυνατόν πιο φιλική προς το περιβάλλον.

Το εκχύλισμα του βύσσινου επελέγη έναντι των υπολοίπων εκχυλισμάτων για διάφορους λόγους. Όσον αφορά στη φράουλα αντιμετωπίστηκαν πρακτικά προβλήματα κατά τη συλλογή και διαχείριση του εκχυλίσματος, όπως θέματα που αφορούσαν στη θολερότητα του παραληφθέντος εκχυλίσματος. Η πούλπα από κεράσι απορρίφθηκε διότι το συλλεχθέν εκχύλισμα κατά τη χρήση EtOH/H₂O/κιτρικό ως μέσου εκχύλισης παρουσίαζε έντονη καφέ χρώση που παρέπεμπε εν δυνάμει σε οξείδωση ή εν γένει σε αλληλεπίδραση του δείγματος με το διαλύτη.

Κατά τη σύγκριση των 3 μέσων στο εκχύλισμα του βύσσινου, το μίγμα αιθανόλη/H₂O/κιτρικό παρουσίασε καλύτερη απόδοση στην εκχύλιση των ανθοκυανινών και γι' αυτό επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο μέσο εκχύλισης. Όσον αφορά στην αναλογία διαλύτη:δείγματος, φάνηκε ότι δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, η αναλογία 1:1 για την εκχύλιση της μεγαποσότητας καθώς ήταν ευκολότερος ο χειρισμός μικρότερων όγκων.

Σε μελέτη των *Korjar et al. 2014*, που κατέληξε σε αποτελέσματα συγκρίσιμα με τα αντίστοιχα της εν λόγω μεταπτυχιακής μελέτης, φάνηκε ότι η οξινισμένη μεθανόλη είναι αποδοτικός διαλύτης για την απομόνωση ανθοκυανινών από βύσσινο, ενώ η αιθανόλη για την απομόνωση φλαβονοειδών^[152]. Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε νερό ως διαλύτης για την απομόνωση ανθοκυανινών από 34 ποικιλίες βύσσινου^[25]. Οι μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την απομόνωση πολυφαινόλων και ιδιαίτερα ανθοκυανινών από βύσσινο είναι περιορισμένες, γι' αυτό το λόγο, η επιλογή του διαλύτη προς διερεύνηση βασίστηκε και σε δύο μελέτες με άλλα φρούτα πλούσια σε ανθοκυανίνες, συγκεκριμένα μούρα. Στη μελέτη των *Dai et al. 2009*, διερευνήθηκαν διάφοροι διαλύτες και η έρευνα κατέληξε ότι το μίγμα αιθανόλης/νερού ήταν το αποδοτικότερο για την απομόνωση κλάσματος αντιοξειδωτικών πλούσιο σε ανθοκυανίνες^[147]. Στη μελέτη των *Wang et al. 2014*, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν 70% αιθανόλη για την εκχύλιση ανθοκυανινών και 35% αιθανόλη για τον καθαρισμό του κλάσματος των ανθοκυανινών^[148].

6.2. Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο βύσσινου

Μετά την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 1kg βύσσινου. Το δείγμα, μετά τη λυοφιλίωση, αναλύθηκε ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και τις ολικές ανθοκυανίνες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα παρακάτω:

Ολικό φαινολικό περιεχόμενο: $243,6 \pm 17,1$ mg GAE/ 100g φρέσκου φρούτου

Ολικές ανθοκυανίνες: $25,7 \pm 0,9$ mg CGE/ 100g φρέσκου φρούτο

Τα αποτελέσματα αυτά είναι εντός του εύρους τιμών που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.4.1. Το εκχύλισμα που απομονώθηκε περιείχε φαινολικά συστατικά εκ των οποίων οι ανθοκυανίνες συνιστούσαν περίπου το 10%. Το ποσοστό αυτό είναι σχετικά μικρό σε σύγκριση με το 20-25% περίπου που αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία. Η αποκλιση αυτή μπορεί να οφείλεται στη ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε, καθώς, όπως προαναφέρθηκε, το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο του βύσσινου διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με την ποικιλία, και επιπλέον είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε ελληνική ποικιλία με αποτέλεσμα να μην διαθέτουμε συγκριτικά στοιχεία. Επομένως, σημαντική μπορεί να είναι και η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων. Παράλληλα, η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στο διαλύτη και τον τρόπο εκχύλισης που ακολουθήθηκε. Τέλος, πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι τα φρούτα ήταν σχετικά άγουρα. Για παράδειγμα, σε μελέτη των *Mitic et al. 2012*, έχει φανεί ότι οι ανθοκυανίνες αυξάνονται, ενώ τα υδροξυκινναμωμικά οξέα μειώνονται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του φρούτου^[30].

6.3. Επιλογή συστήματος διαχωρισμού κλάσματος ανθοκυανινών

Οι μακροπορώδεις ρητίνες είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος στη βιβλιογραφία για την έκλυση μερικώς καθαρισμένου κλάσματος ανθοκυανινών. Μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση παρατηρήθηκαν ανεπαρκή ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την πραγματοποίηση καθαρισμού ανθοκυανινών, με τη χρήση ρητινών, στο βύσσινο. Σε μια πρώτη μελέτη του 1993, οι Chandra et al απομόνωσαν κλάσμα πλούσιο σε ανθοκυανίνες από βύσσινο με τη χρήση ρητίνης XAD2. Ως μέσο έκλυσης χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη^[153]. Σε 2 ακόμη μελέτες, οι ερευνητές πραγματοποίησαν καθαρισμό ανθοκυανινών με την XAD2 χρησιμοποιώντας είτε αιθανόλη είτε μεθανόλη ως μέσο έκλυσης^[154, 155]. Επιπλέον, σε μια κλινική δοκιμή αναφέρεται ο καθαρισμός ανθοκυανινών βύσσινου με τη χρήση ρητίνης XAD16^[79]. Στην περιγραφή των ρητινών επισημαίνεται ότι η XAD16 είναι περισσότερο

αποτελεσματική από την XAD2 λόγω μεγαλύτερης επιφάνειας. Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, λοιπόν, αποφασίσαμε να συγκρίνουμε την XAD16 με μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ρητίνη, την XAD7. Η XAD7 έχει χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή καθαρού κλάσματος ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο^[156], φράουλες^[157] και ποικιλίες μούρων^[150].

Για τη βελτιστοποίηση του καθαρισμού κλάσματος ανθοκυανινών, αποφασίστηκε να αξιολογηθούν διαφορετικοί διαλύτες και οι προαναφερθείσες δύο ρητίνες μέσω μιας σειράς πιλοτικών πειραμάτων. Για τα πρώτα 9 πιλοτικά πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν 300mg δείγματος. Τα κύρια κλάσματα αναλύθηκαν ως προς το συνολικό περιεχόμενο σε ανθοκυανίνες και μέσω της ανάλυσης αυτής, φάνηκε ότι το μίγμα μεθανόλη/κιτρικό ως μέσο καθαρισμού ανέκτησε μικρότερο ποσό ανθοκυανινών, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 6.3. Επιλογή συστήματος καθαρισμού εκχυλίσματος ανθοκυανινών βύσσινου.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΡΗΤΙΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΕΚΛΟΥΣΗΣ				
Πιλοτικά πειράματα	Ρητίνη	Μίγμα διαλυτών	Αναλογία δείγματος:ρητίνης	mg C3GE/100g φρέσκου φρούτου
1 ^ο	XAD-7	MeOH/κιτρικό	1:10	15,7±0,5*
2 ^ο	XAD-16	MeOH/κιτρικό	1:10	18,5±0,3
4 ^ο	XAD-7	EtOH/κιτρικό	1:10	17,6±0,3
5 ^ο	XAD-16	EtOH/κιτρικό	1:10	18,2±0,2
6 ^ο	XAD-16	MeOH/κιτρικό	1:5	19,2±0,7
7 ^ο	XAD-16	MeOH/κιτρικό	1:3	15,6±0,8*
8 ^ο	XAD-7	MeOH/HCL	1:10	18,9±1
9 ^ο	XAD-16	MeOH/HCL	1:10	19,3±0,9

*Στατιστικά σημαντική διαφορά με 2^ο, 4^ο, 5^ο, 6^ο, 8^ο & 9^ο πιλοτικό. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p<0,05.

Τα κύρια κλάσματα ανθοκυανινών των υπόλοιπων πιλοτικών, εκτός δηλαδή του 1^{ου} και του 7^{ου}, αναλύθηκαν, επιπλέον, ως προς το περιεχόμενό τους σε σάκχαρα με HPLC, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.4. Επιλογή συστήματος καθαρισμού βάσει ανάλυσης σακχάρων.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΠΛΑ ΣΑΚΧΑΡΑ						
				<u>Ως προς το αρχικό εκχύλισμα</u> Σύνολο σακχάρων: 53±2,3%		
Πιλοτικό πείραμα	Πέρασμα από ρητίνη	Αναλογία δείγματος: ρητίνης	Ρητίνη- Διαλύτης	Φρουκτόζη (%)	Γλυκόζη (%)	Σύνολο σακχάρων (%)
2 ^ο	1 ^ο	1:10	XAD16- MeOH/κιτρικό	2,2	3,8	6,0
4 ^ο	1 ^ο	1:10	XAD7- EtOH/κιτρικό	1,5	2,7	4,2
5 ^ο	1 ^ο	1:10	XAD16- EtOH/κιτρικό	0,4	0,5	0,9*
6 ^ο	1 ^ο	1:5	XAD16- MeOH/κιτρικό	12,7	21,5	34,2
8 ^ο	1 ^ο	1:10	XAD7- MEOH/HCl	0,5	0,5	1,0*
9 ^ο	1 ^ο	1:10	XAD16- MEOH/HCl	0,2	1,5	1,7

* Στατιστικά σημαντική διαφορά με όλα τα υπόλοιπα πιλοτικά.

Μέσω της ανάλυσης αυτής, επιλέχθηκαν τα πιλοτικά 5 & 8 ως τα αποδοτικότερα. Έγινε επανάληψη των πειραμάτων αυτών με 2g δείγματος. Παρακάτω παρατίθεται η ανάλυση των κύριων κλασμάτων των πειραμάτων με 2g δείγματος ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικές ανθοκυανίνες και σάκχαρα με HPLC:

Πίνακας 6.5. Επιλογή συστήματος καθαρισμού. Ανάλυση κύριων κλασμάτων ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικές ανθοκυανίνες και σάκχαρα με HPLC.

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ					
					Στο καθαρισμένο δείγμα
Πείραμα	Πέρασμα	Ρητίνη	Μίγμα	mg C3GE/100g	% σάκχαρα

	από ρητίνη		Διαλυτών	φρέσκου φρούτου	
10 ^ο πιλοτικό	1 ^ο	XAD-7	MeOH/HCl	22,5± 1,5	20,0
11 ^ο πιλοτικό	2 ^ο	XAD-7	MeOH/HCl	20,6±0,3	20,3
12 ^ο πιλοτικό	3 ^ο	XAD-7	MeOH/HCl	20,1±0,1	23,2
13 ^ο πιλοτικό	1 ^ο	XAD-16	EtOH/κιτρικό	16,7±0,4 ^{**}	1,6

^{**}Στατιστικά σημαντική διαφορά με 10^ο, 11^ο & 12^ο πιλοτικό.

Αρχικά, έγινε σύγκριση των πειραμάτων κατά το πρώτο πέρασμα από τη ρητίνη, η οποία έδειξε ότι το σύστημα XAD16-EtOH/κιτρικό οδήγησε σε μικρότερη ανάκτηση ανθοκυανινών σε σύγκριση με το σύστημα XAD7-MeOH/HCl. Γι' αυτό το λόγο, με το δεύτερο σύστημα πραγματοποιήθηκε 2^ο και 3^ο πέρασμα από τη ρητίνη. Η ανάλυση σε σάκχαρα, αντίθετα, έδειξε ότι με το σύστημα XAD16-EtOH/κιτρικό εκλούστηκε κλάσμα ανθοκυανινών πολύ υψηλότερης καθαρότητας. Μέσω της ανάλυσης ολικών ανθοκυανινών και σακχάρων, λοιπόν, και τα δυο συστήματα αποδείχτηκαν αποτελεσματικά για την παραλαβή κλάσματος ανθοκυανινών. Η επιλογή του συστήματος XAD7-MeOH/HCl βασίστηκε κυρίως στην καλύτερη απόδοση όσον αφορά στην ανάκτηση των ανθοκυανινών, στον καλύτερο χειρισμό που μπορούν να μας παρέχουν οι συγκεκριμένοι διαλύτες και στο γεγονός ότι το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε κατά τον καθαρισμό με XAD16-EtOH/κιτρικό είχε πολύ μεγαλύτερη μάζα λόγω υψηλής περιεκτικότητας σε κιτρικό που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

6.4. Σύσταση μερικώς καθαρισμένου κλάσματος ανθοκυανινών

Μετά την επιλογή του αποδοτικότερου συστήματος, καθαρίστηκαν συνολικά 24g εκχυλίσματος βύσσινου, των οποίων το περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά και ανθοκυανίνες είναι το εξής:

Ολικά φαινολικά συστατικά: 161,9±26,5mg GAE/ 100g φρέσκου φρούτου

ή 20,2±3,3mg GAE/g καθαρού δείγματος

Ολικές ανθοκυανίνες: 23,3±3,6mg C3GE/ 100g φρέσκου φρούτου

ή 2,9±0,1mg C3GE/g καθαρού δείγματος

Έπειτα, υπολογίστηκε η (%) ανάκτηση φαινολικών συστατικών και ανθοκυανινών:

Ανάκτηση φαινολικών συστατικών (%): 66,5±24,2

Ανάκτηση ανθοκυανινών (%): 90,3±2,1

βάσει της εξίσωσης: (mg συστατικού καθαρισμένου δείγματος/mg συστατικού αρχικού εκχυλίσματος)*100

Η έκλουση των ανθοκυανινών έλαβε χώρα σε μεγάλο ποσοστό, απομονώθηκε σχεδόν το σύνολο των συστατικών αυτών σε αντίθεση με τα ολικά φαινολικά συστατικά τα οποία εκλούστηκαν σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς, όπως προαναφέρθηκε, η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται για την απομόνωση χρωστικών ουσιών χρωματογραφικά.

Παρόμοια αποτελέσματα στην ανάκτηση των ανθοκυανινών φαίνεται να προέκυψαν από την μελέτη των Coutinho et al. 2004. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την ρητίνη XAD7 για την έκλουση κλάσματος ανθοκυανινών από το κόκκινο λάχανο και κατέληξαν ότι η ανάκτηση των συστατικών αυτών κυμαινόταν από 24% έως 95%^[156]. Τα αποτελέσματά μας συνάδουν, ακόμη με τα αντίστοιχα των Andersen et al. 1988 σε μια από τις πρώτες μελέτες στο αντικείμενο αυτό. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν καθαρισμό ανθοκυανινών μέσω της ρητίνης XAD7 χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως μέσο έκλουσης^[158]. Υψηλό ποσοστό ανθοκυανινών ανακτήθηκε και στη μελέτη των Park et al. 2008, στην οποία οι ερευνητές πραγματοποίησαν καθαρισμό ανθοκυανινών σε μαύρο ρύζι χρησιμοποιώντας την XAD7 και οξινισμένη μεθανόλη, όπως στην εν λόγω μεταπτυχιακή μελέτη^[159].

Τέλος, η μελέτη των Bunea et al. 2013, στην οποία, όπως προαναφέρθηκε, βασίστηκε η δική μας μεθοδολογία έδειξε αρκετά υψηλή ανάκτηση και καθαρότητα του κλάσματος ανθοκυανινών από μύρτιλλα. Το κλάσμα αυτό φάνηκε μάλιστα να εμφανίζει ευεργετικές ιδιότητες στην πρόληψη μελανώματος του δέρματος και πιθανά να μπορεί να δράσει ως επικουρική θεραπεία κατά της μετάστασης σε ποντίκια^[150].

Όσον αφορά στην ανάλυση των σακχάρων, το σύστημα που επιλέχθηκε, φάνηκε να μειώνει την περιεκτικότητα του αρχικού εκχυλίσματος σε σάκχαρα κατά 30-32,6%. Η καθαρότητα του κλάσματος των ανθοκυανινών, που παρελήφθη, λοιπόν είναι:

Καθαρότητα κλάσματος ανθοκυανινών (%) = $60 \pm 3,3$

Γενικά, τα περισσότερα άρθρα, στα οποία έχει εφαρμοστεί διαχωρισμός κλάσματος ανθοκυανινών με ρητίνες δεν αναφέρουν στοιχεία για την καθαρότητα των ανθοκυανινών ή την ποσότητα των σακχάρων που περιέχεται στο τελικό δείγμα. Παρ' όλα αυτά, συλλέχθηκαν κάποια στοιχεία από λιγότερες μελέτες.

Σε μελέτη των *Cerezo et al. 2010*, για παράδειγμα, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός ανθοκυανινών φράουλας με ρητίνη XAD7 και έπειτα το κλάσμα ανθοκυανινών διαχωρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία κατ'αντιροή (CCC). Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η καθαρότητα των ανθοκυανινών κυμαινόταν εντός του εύρους 90-92%^[157]. Σε μια άλλη μελέτη των *Coutinho et al. 2004*, η οποία προαναφέρθηκε, υπολογίστηκε η ποσότητα των σακχάρων που περιεχόταν στο τελικό δείγμα, το οποίο είχε υποστεί καθαρισμό αρχικά με ρητίνη XAD7 και έπειτα σε μια δεύτερη στήλη χρωματογραφίας με Sephadex LH20. Η μελέτη κατέληξε ότι το τελικό δείγμα περιείχε 0,5g/L σάκχαρα σε σύγκριση με την αρχική συγκέντρωση των 25g/L. Οι ερευνητές, όμως επισήμαναν ότι η ανάκτηση ανθοκυανινών από την Sephadex LH20 ήταν πολύ μικρότερη σε σύγκριση με την ρητίνη XAD7^[156]. Τα ευρήματα αυτά είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτό που προσδιορίστηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη. Η απόκλιση αυτή ενδέχεται να οφείλεται είτε στη διαφορετική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είτε στο διαφορετικό φρούτο που μελετήθηκε. Το πιθανότερο, όμως, είναι η διαφοροποίηση αυτή να αποδίδεται στο γεγονός ότι στα άρθρα αυτά πραγματοποιήθηκαν πρόσθετες διαδικασίες διαχωρισμού με αποτέλεσμα ο καθαρισμός να είναι πιθανόν πιο πλήρης αποδίδοντας κλάσματα ανθοκυανινών με υψηλότερη καθαρότητα.

6.5. Απόδοση διαφορετικών μεθόδων ενθυλάκωσης

Η ενθυλάκωση σε μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος πραγματοποιήθηκε με 2 τεχνικές. Οι 2 αυτές τεχνικές συγκρίθηκαν μεταξύ τους κατά την ενθυλάκωση τόσο του αρχικού εκχυλίσματος όσο και του καθαρισμένου δείγματος. Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ενθυλάκωσης χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις διαλύματος αλγινικού, συγκεκριμένα 0,5%, 1,5% και 2,5%. Σε συγκέντρωση 0,5%, σχηματίστηκαν μικροσφαιρίδια τα οποία δεν ήταν σταθερά. Δηλαδή η δομή τους δεν ήταν συμπαγής με αποτέλεσμα αυτά να καταρρέουν. Γι' αυτό το λόγο, αποκλείστηκαν κατευθείαν από τη διαδικασία της ενθυλάκωσης. Τα μικροσφαιρίδια που σχηματίστηκαν με 2,5% αλγινικό οξύ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη απόδοση ενθυλάκωσης ανθοκυανινών και φαινολικών συστατικών, με αποτέλεσμα να επιλεγεί η συγκέντρωση στο 1,5% ως η αποδοτικότερη, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.6. Απόδοση ενθυλάκωσης των διαφορετικών τεχνικών με χρήση 2g ακατέργαστου εκχυλίσματος βύσσινου ή καθαρισμένου εκχυλίσματος βύσσινου, ισοδύναμου με την ποσότητα 2g του ακατέργαστου.

	Μέθοδος	Πείραμα	V αλγινικού (ml)	C αλγινικού (%)	Είδος Εκχυλίσματος	Ενθυλάκωση ανθοκυανινών (%)	Ενθυλάκωση πολυφαινολών (%)
1.	Έγχυση δείγματος	1	100	2,5	Ακατέργαστο	34,6±3,1***	10,9±2,4***
		2	30	1,5	Ακατέργαστο	55,7±0,2 ^a	47,1±1,7 ^a
		3	100	1,5	Ακατέργαστο	52,6±2,0 ^b	41,7±2,3 ^b
		4	100	1,5	Καθαρισμένο	60,2±0,5 ^c	53,8±1,4 ^c
2.	Εμβάπτιση στο δείγμα	5	30	1,5	Ακατέργαστο	28,4±2,4**	37,6±1,2
		6	100	1,5	Ακατέργαστο	39,8±3,1	39,4±1,8
		7	100	1,5	Καθαρισμένο	40,5±3,7	37,7±2,0

** Στατιστικά σημαντική διαφορά με 6^ο και 7^ο πείραμα.

*** Στατιστικά σημαντική διαφορά απ' όλα τα πειράματα της πρώτης μεθόδου.

^{a,b,c} Διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους για την ίδια τεχνική.

Όσον αφορά στην πρώτη διαδικασία ενθυλάκωσης, η μείωση της ποσότητας των ανθοκυανινών που προορίζεται για εγκλεισμό ανά γραμμάριο σωματιδίων, δεν οδηγεί σε αύξηση του ποσοστού απόδοσης ενθυλάκωσης. Επιπλέον, σε κάθε πειραματική διαδικασία, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, το ποσοστό απόδοσης ενθυλάκωσης ολικών φαινολικών ενώσεων είναι μικρότερο από το ποσοστό απόδοσης ενθυλάκωσης ανθοκυανινών, ενώ παράλληλα παρατηρείται ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών αυτών. Το πρόβλημα που προέκυψε είναι ότι η απόδοση ενθυλάκωσης δεν ήταν σταθερή μεταξύ των πειραματικών εφαρμογών, γεγονός που πιθανά πηγάζει από κάποιο πειραματικό σφάλμα λόγω των διαφόρων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση αυτή. Στις παραμέτρους αυτές συγκαταλέγονται, ο χρόνος και η ταχύτητα ανάδευσης, ο χρόνος επαφής με το χλωριούχο ασβέστιο, η συγκέντρωση των διαλυμάτων και η απόσταση της σύριγγας από την επιφάνεια του διαλύματος^[160]. Σε μελέτη των *Zam et al. 2014*, επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της εν λόγω μεταπτυχιακής μελέτης. Στη μελέτη αυτή, οι ερευνητές παρασκεύασαν σφαιρίδια αλγινικού άλατος με έγχυση δείγματος πολυφαινόλων από φλοιό ροδιού καταλήγοντας ότι η απόδοση ενθυλάκωσης για τις προανθοκυανιδίνες έφτασε στο 46,34% και για τις πολυφαινόλες στο 43,90% στις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες^[161]. Παρόμοια αποτελέσματα στην απόδοση ενθυλάκωσης φαίνεται να προέκυψαν επίσης από τη μελέτη των *Noor Hafizar et al. 2010*. Στη μελέτη αυτή, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η απόδοση ενθυλάκωσης για τα μακροσφαιρίδια, που παρασκευάστηκαν με 4% αλγινικό οξύ, υπολογίστηκε στο 51%, ενώ για τα μικροσφαιρίδια, που παρασκευάστηκαν με 1% αλγινικό οξύ, στο 34%^[114]. Στην βιβλιογραφία, παρ' όλα αυτά έχουν αναφερθεί και πολύ υψηλότερες τιμές απόδοσης ενθυλάκωσης για ανθοκυανίνες^[115] και πολυφαινόλες^[162]. Επομένως, πιθανά, είναι δυνατόν να εξασφαλιστεί υψηλότερη απόδοση ενθυλάκωσης βελτιστοποιώντας τις διάφορες παραμέτρους που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τέλος, η αποδόση ενθυλάκωσης του μερικώς καθαρισμένου δείγματος βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την απόδοση ενθυλάκωσης του αρχικού εκχυλίσματος. Αντίστοιχα άρθρα δεν βρέθηκαν μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση. Πιθανά, λοιπόν, το μερικώς καθαρισμένο δείγμα να αποδίδει καλύτερα. Από την άλλη πλευρά, όμως, η διαφορά αυτή δεν είναι τόσο μεγάλη και δεν επιβεβαιώθηκε στον δεύτερο τρόπο ενθυλάκωσης με αποτέλεσμα να μην μπορούμε ίσως να ισχυριστούμε κάποιο σημαντικό εύρημα.

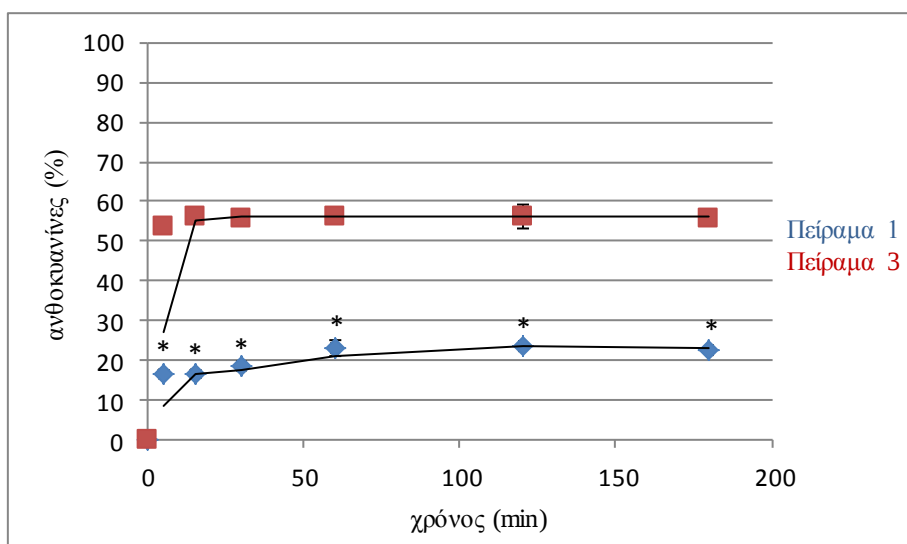
Όσον αφορά στη δεύτερη διαδικασία ενθυλάκωσης, από τον παραπάνω πίνακα διαφαίνεται ότι μειώνοντας την ποσότητα των ανθοκυανινών που προορίζεται για εγκλεισμό ανά γραμμάριο σωματιδίων, οδηγούμαστε σε μια αύξηση του ποσοστού απόδοσης ενθυλάκωσης κατά $13,2 \pm 2,2$ για το αρχικό εκχύλισμα και κατά $13,4 \pm 1,8$ για το καθαρισμένο δείγμα. Τα ποσοστά αυτά δε διαφέρουν μεταξύ τους. Δεν προέκυψε γενικά στατιστικά σημαντική διαφορά

στα ποσοστά ενθυλάκωσης τόσο των ανθοκυανινών όσο και των φαινολικών συστατικών ανάμεσα στο καθαρισμένο και μη καθαρισμένο δείγμα κατά την 2^η τεχνική ενθυλάκωσης. Συνεπώς, μπορεί να ειπωθεί ότι τα δύο δείγματα (ακατέργαστο και κατεργασμένο εκχύλισμα) συμπεριφέρονται με παρόμοιο τρόπο κατά τον εγκλεισμό με εμβάπτιση του δείγματος. Επιπλέον, φαίνεται ότι το ποσοστό απόδοσης ενθυλάκωσης τόσο για τις ανθοκυανίνες όσο και για τις πολυφαινόλες κινείται σε παρόμοια επίπεδα. Μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση, παρατηρήθηκαν ανεπαρκή ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την ενθυλάκωση ανθοκυανινών σε σφαιρίδια αλγινικού άλατος μέσω τη διαδικασίας αυτής. Στα δύο άρθρα που βρέθηκαν δεν αναφέρονται καθόλου στοιχεία για την απόδοση ενθυλάκωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Επιπλέον, η απόδοση ενθυλάκωσης για τις ανθοκυανίνες εκφράζεται σε mg/g ξηρών μικροσφαιριδίων και όχι σε ποσοστό με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των *Yamdech et al. 2012*, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η απόδοση ενθυλάκωσης των ανθοκυανινών έφτανε τα $17.1 \pm 0.3 \text{ mg/g}^{[163]}$. Σε μια άλλη μελέτη των ίδιων ερευνητών, καταγράφηκε μια απόδοση ενθυλάκωσης στα $2.3 \pm 0.2 \text{ mg/g}^{[164]}$. Τα ευρήματα αυτά είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά που προσδιορίστηκαν στην εν λόγω μεταπτυχιακή μελέτη ($0,8 \pm 0,1 \text{ mg/g}$). Το γεγονός αυτό πιθανά αποδίδεται στην περιεκτικότητα του φρούτου προς διερεύνηση σε ανθοκυανίνες και κυρίως στην ποσότητα ανθοκυανινών που προορίζεται για εγκλεισμό ανά g μικροσφαιριδίων κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, μέσω της ανάλυσης του πίνακα 6.6 και της συζήτησης που προηγήθηκε, δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης των δύο μεθόδων ως προς την απόδοση ενθυλάκωσης. Θα μπορούσε, λοιπόν, να ειπωθεί με κάποια επιφύλαξη ότι επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση ενθυλάκωσης ανθοκυανινών και ολικών φαινολικών ενώσεων με την πρώτη διαδικασία εγκλεισμού σε σύγκριση με τη δεύτερη.

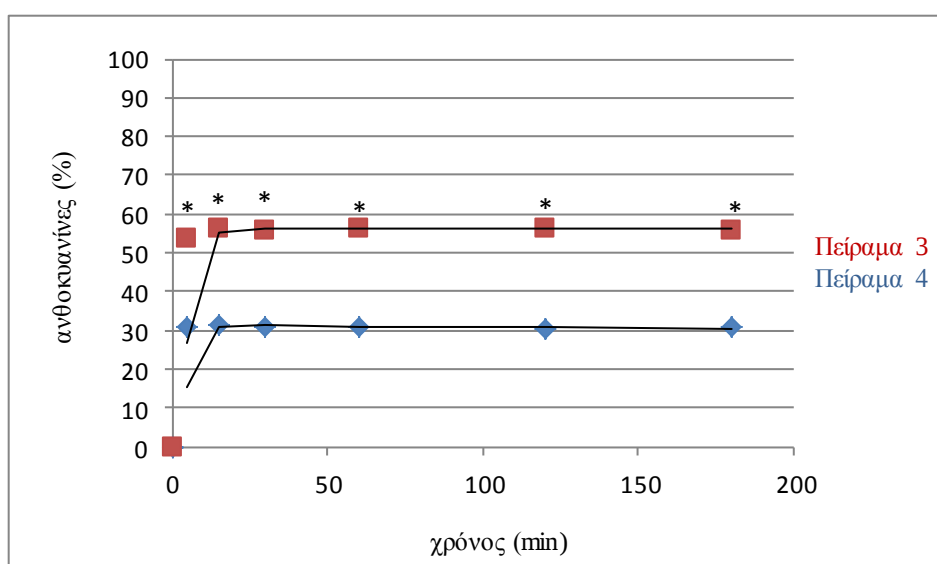
6.6. Απελευθέρωση πυρηνικού υλικού

Πραγματοποιήθηκε, στη συνέχεια, μελέτη της απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού συναρτήσει του χρόνου. Μελετήθηκε, συγκεκριμένα, η απελευθέρωση των εγκλεισμένων ανθοκυανινών και ολικών φαινολικών συστατικών σε ορισμένα από τα πειράματα που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 6.5. Αρχικά, παρατίθενται οι καμπύλες απελευθέρωσης των ανθοκυανινών συναρτήσει του χρόνου:



Διάγραμμα 6.1. Καμπύλες απελευθέρωσης ανθοκυανινών για τα πειράματα 1&3 όπως αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική έγχυσης δείγματος. *Στατιστικά σημαντική διαφορά ανά χρονική στιγμή.

Συγκρίνοντας τις παραπάνω καμπύλες, φαίνεται ότι η απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού από τα μικροσφαιρίδια που παρασκευάστηκαν με 2,5% αλγινικό οξύ (Πείραμα 1) είναι στατιστικά σημαντική μειωμένη σε όλες τις χρονικές στιγμές. Οι ανθοκυανίνες, δηλαδή, απελευθερώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα μικροσφαιρίδια που παρασκευάζονται με 1,5% αλγινικό οξύ (Πείραμα 3) με τη μέθοδο έγχυσης του δείγματος.



Διάγραμμα 6.2. Καμπύλες απελευθέρωσης ανθοκυανινών για τα πειράματα 3&4 όπως αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική έγχυσης δείγματος. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε κάθε χρονική στιγμή.

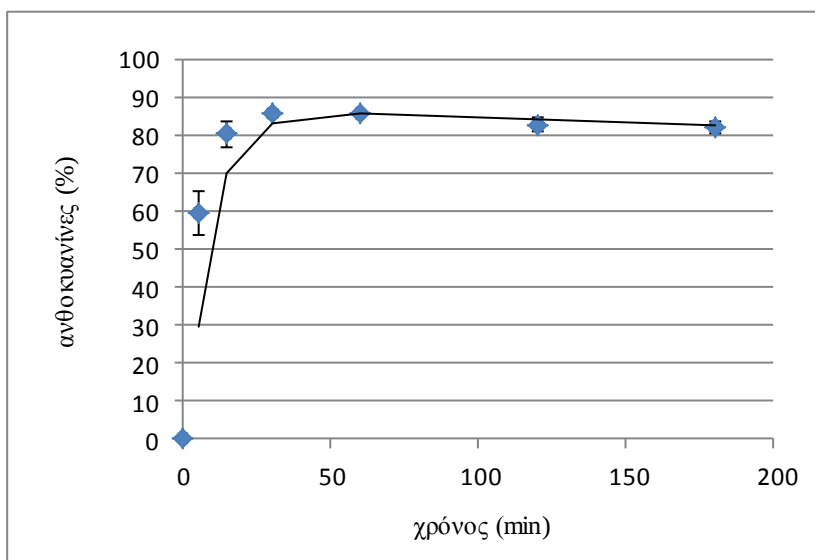
Στο διάγραμμα αυτό αποτυπώνονται οι καμπύλες απελευθέρωσης ανθοκυανινών του κατεργασμένου (Πείραμα 4) και ακατέργαστου δείγματος (Πείραμα 3) κατά τη μέθοδο εγκλεισμού με έγχυση του δείγματος. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι η απελευθέρωση του εγκλεισμένου πυρηνικού υλικού είναι πολύ υψηλότερη κατά την πειραματική διαδικασία ενθυλάκωσης του αρχικού λυοφιλιωμένου δείγματος. Δεν υπάρχει αντίστοιχη βιβλιογραφία που να συγκρίνει αποτελέσματα ενθυλάκωσης μερικώς καθαρισμένου και ακατέργαστου κλάσματος ανθοκυανινών, δε μπορούμε, όμως, με βεβαιότητα να υποστηρίξουμε το συγκεκριμένο εύρημα για 2 λόγους. Πρώτον, διότι για το πείραμα 2 το οποίο διεκπεραιώθηκε με την ίδια μέθοδο χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα ακατέργαστου δείγματος βρέθηκε ότι το πλατώ απελευθέρωσης ανθοκυανινών επιτεύχθει περίπου στο 30% σε αντίθεση με το 55% που υπολογίστηκε στο πλαίσιο του 3^{ου} πειράματος. Δεύτερον, μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση, φάνηκε ότι στις έρευνες που μελετούν το συγκεκριμένο αντικείμενο, τα ποσοστά απελευθέρωσης ανθοκυανινών πλησιάζουν περισσότερο στο 30%.

Συγκεκριμένα, σε μελέτη των Santos *et al.* 2013, οι ερευνητές ακολούθησαν την ίδια μεθοδολογία με την αντίστοιχη της εν λόγω μεταπτυχιακής μελέτης, και κατέληξαν ότι οι ανθοκυανίνες απελευθερώθηκαν γρήγορα κατά την πρώτη ώρα. Έπειτα, το ποσοστό απελευθέρωσης έφτασε σε πλατώ γύρω στο 20%, ενώ ακόμη και μετά από 2,5h τα μικροσφαιρίδια διατηρούσαν κάποιο ποσοστό του χαρακτηριστικού χρώματος των ανθοκυανινών^[115]. Αυτό παρατηρήθηκε και κατά τις δικές μας πειραματικές διαδικασίες δείχνοντας ότι η απελευθέρωση των ανθοκυανινών δεν ήταν πλήρης. Πιθανά, λοιπόν, το αποτέλεσμα που αποτυπώνεται στο διάγραμμα 6.2, μπορεί ίσως να αποδοθεί σε πειραματικό σφάλμα, όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 6.5, καθώς πολλές παράμετροι μπορεί να εμπλέκονται στη διαδικασία ενθυλάκωσης και απελευθέρωσης του εγκλεισμένου πυρηνικού υλικού.

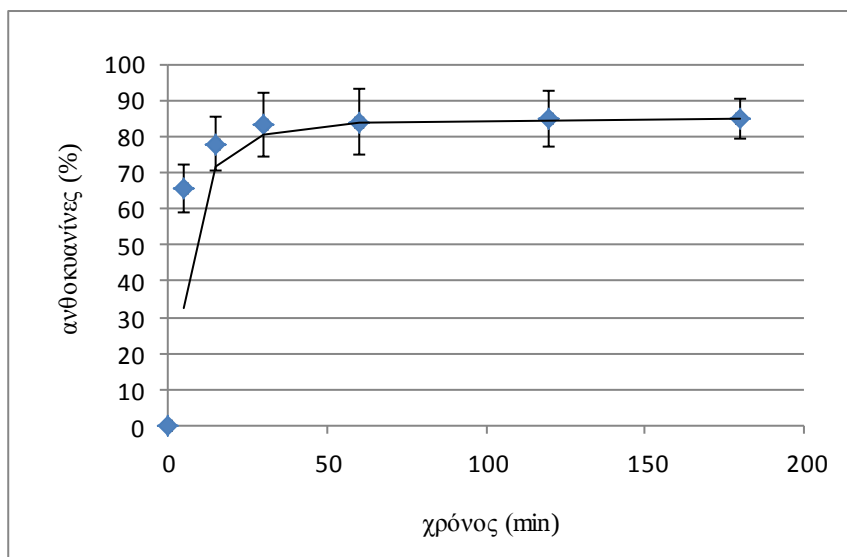
Αφήνοντας στην άκρη το ποσοστό των ανθοκυανινών που απελευθερώνονται κατά απόλυτη τιμή, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η πορεία που ακολουθεί η απελευθέρωση συναρτήσει του χρόνου κατά τη μέθοδο εγκλεισμού με έγχυση του δείγματος είναι συγκεκριμένη. Αναλυτικά, παρατηρείται μια απότομη απελευθέρωση ανθοκυανινών μέχρι τα 5 πρώτα λεπτά και έπειτα γύρω σ' αυτή τη χρονική στιγμή επιτυγχάνεται πλατώ. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και η μελέτη των Noor *et al.* 2010. Στην έρευνα αυτή, συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η απελευθέρωση ανθοκυανινών ήταν γρήγορη κατά τα πρώτα ένα με δύο λεπτά, ακολουθήσε αργή εκρόφηση μέχρι τα 5min οπότε και επιτεύχθη το πλατώ. Το πλατώ μάλιστα αποδόθηκε σε

ισορροπία της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών ανάμεσα στα μικροσφαιρίδια και στην υδατική φάση^[114].

Μελέτες απελευθέρωσης ανθοκυανινών διεκπεραιώθηκαν και για τα μικροσφαιρίδια που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο εμβάπτισης στο δείγμα. Οι καμπύλες παρατίθενται παρακάτω:



Διάγραμμα 6.3. Καμπύλη απελευθέρωσης ανθοκυανινών για το πείραμα 6 όπως αυτό αναφέρεται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική εμβάπτισης στο δείγμα.

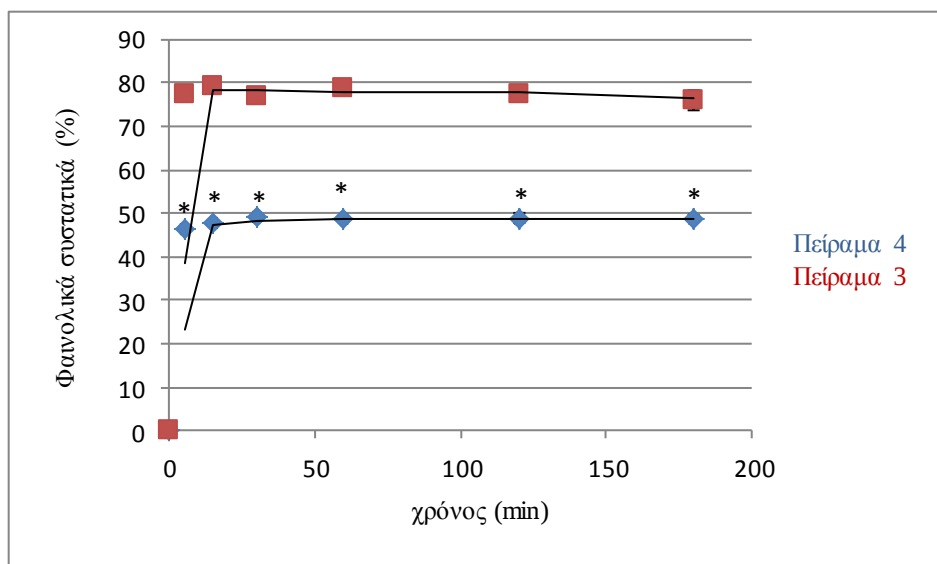


Διάγραμμα 6.4. Καμπύλη απελευθέρωσης ανθοκυανινών για το πείραμα 7 όπως αυτό αναφέρεται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική εμβάπτισης στο δείγμα.

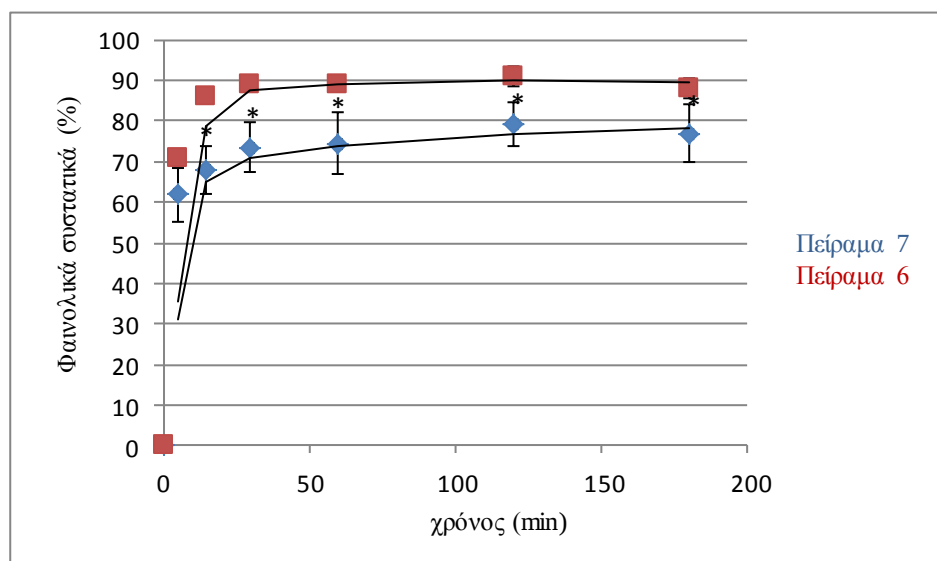
Παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι κατά τη δεύτερη μέθοδο ενθυλάκωσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, σε καμία χρονική στιγμή, στα ποσοστά απελευθέρωσης ανθοκυανινών ανάμεσα στο ακατέργαστο (Πείραμα 6) και στο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα (Πείραμα 7). Τα άρθρα που συγκεντρώθηκαν μετά από εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση γι' αυτή τη μέθοδο ενθυλάκωσης, δε διέθεταν πληροφορίες σχετικές με μελέτες απελευθέρωσης ανθοκυανινών και ολικών φαινολικών ενώσεων.

Μέσω των διαγραμμάτων 6.2, 6.3 και 6.4 καθίσταται αντιληπτό ότι οι 2 τεχνικές ενθυλάκωσης που εφαρμόστηκαν διαφέρουν σημαντικά ως προς την πορεία απελευθέρωσης των ανθοκυανινών που λαμβάνει χώρα συναρτήσει του χρόνου. Η πορεία απελευθέρωσης της πρώτης μεθόδου περιγράφηκε παραπάνω. Στη δεύτερη τεχνική, σε αντίθεση με την πρώτη, η εκρόφιση των ανθοκυανινών είναι σταδιακή μέχρι περίπου τα πρώτα 30min, μια χρονική στιγμή κατά την οποία επιτυγχάνεται το πλατώ. Στη μέθοδο αυτή, επιπλέον, η απελευθέρωση επιτυγχάνεται σε πολύ υψηλότερα ποσοστά φτάνοντας στο 85% περίπου των ενθυλακωμένων ανθοκυανινών.

Κατά τις μελέτες απελευθέρωσης των διαφόρων πειραματικών διαδικασιών, πέρα από τις ανθοκυανίνες, μελετήθηκαν επιπλέον οι πορείες και τα ποσοστά απελευθέρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων. Παρακάτω παρατίθενται οι αντίστοιχες καμπύλες:



Διάγραμμα 6.5. Καμπύλες απελευθέρωσης ολικών φαινολικών ενώσεων για τα πειράματα 3&4 όπως αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική έγχυσης δείγματος. *Στατιστικά σημαντική διαφορά ανά χρονική στιγμή.



Διάγραμμα 6.6. Καμπύλες απελευθέρωσης ολικών φαινολικών ενώσεων για τα πειράματα 6&7 όπως αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 6.6 με την τεχνική εμβάπτισης στο δείγμα. *Στατιστικά σημαντική διαφορά ανά χρονική στιγμή.

Από τα παραπάνω διαγράμματα, καθίσταται αντιληπτό ότι η απελευθέρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με την απελευθέρωση των ανθοκυανινών σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Παράλληλα, τα συστατικά αυτά φαίνεται ότι απελευθερώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά τη 2^η τεχνική ενθυλάκωσης. Μέσω των μελετών απελευθέρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων φάνηκε ότι

όλα τα πειράματα εξήγαγαν διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, από το διάγραμμα 6.4, φαίνεται, όπως και στις ανθοκυανίνες, ότι κατά τη μέθοδο ενθυλάκωσης με έγχυση του δείγματος, η απελευθέρωση των ολικών φαινολικών συστατικών είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη για το κατεργασμένο δείγμα (Πείραμα 4) σε όλες τις χρονικές στιγμές. Η μεγάλη αυτή διαφορά είναι πιθανόν να οφείλεται σε κάποιο πειραματικό σφάλμα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Αντίστοιχα, και στο διάγραμμα 6.5, από τα 15min και έπειτα, η απελευθέρωση των ολικών φαινολών φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη για το μερικώς καθαρισμένο δείγμα. Παρ' όλα αυτά, στο πείραμα 7, οι διακυμάνσεις των τυπικών αποκλίσεων βρέθηκαν να είναι μεγάλες με αποτέλεσμα οι διαφορές με το πείραμα 6 να μην είναι τελικά τόσο σημαντικές.

Παρά τις διαφορές στα ποσοστά, η συνολική πορεία απελευθέρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών είναι κοινή τόσο για το μερικώς καθαρισμένο όσο και για το ακατέργαστο εκχύλισμα ανά μέθοδο ενθυλάκωσης. Επιπλέον, η πορεία αυτή τόσο για την 1^η όσο και για την 2^η τεχνική ενθυλάκωσης είναι αντίστοιχη μ' αυτήν που περιγράφηκε παραπάνω για τις ανθοκυανίνες.

Στη μελέτη των *Mandal et al.2010*, οι ερευνητές εφάρμοσαν τις 2 μεθόδους ενθυλάκωσης που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη για τον εγκλεισμό ενός φαρμάκου, καταλήγοντας ότι η απελευθέρωση αυτού έφτασε στο 80-90% και στις δύο διαδικασίες^[165]. Η απόκλιση από τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης πιθανά οφείλεται στη διαφορετική φύση των ουσιών που προορίζονταν για ενθυλάκωση, καθώς επίσης στη διαφορετική μέθοδο εγκλεισμού και μελέτης της απελευθέρωσης που ακολουθήθηκε.

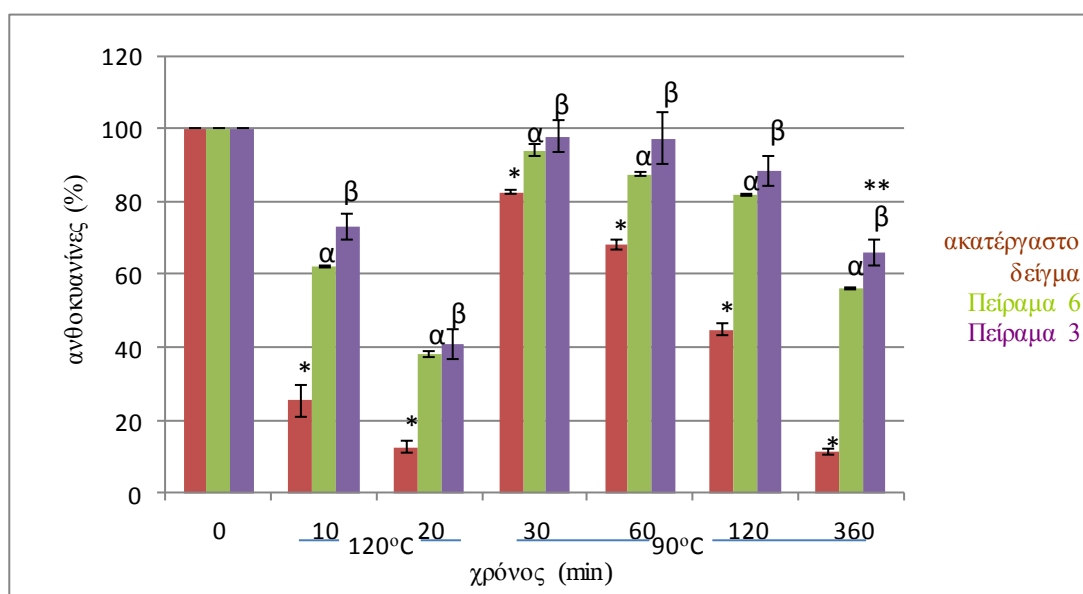
Όσον αφορά στην 1^η τεχνική ενθυλάκωσης, αρκετά από τα άρθρα της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η απελευθέρωση των πολυφαινολών φτάνει σε αρκετά υψηλά επίπεδα. Για παράδειγμα, στη μελέτη των *Isailović et al. 2012*, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η απελευθέρωση των αντιοξειδωτικών συναρτήσει του χρόνου έφτασε στο 100%^[166]. Σε μια άλλη μελέτη των *Zam et al. 2013*, η απελευθέρωση πολυφαινολών φλοιού ροδιού από μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος φάνηκε να φτάνει στο 64,9% σε περιβάλλον γαστρικών υγρών και στο 88,4% σε συνθήκες εντερικού περιεχομένου^[167]. Η διαφοροποίηση σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα πιθανά οφείλεται στη διαφορετική πρώτη ύλη που έχει χρησιμοποιηθεί καθώς επίσης στις διαφορετικές μεθόδους ενθυλάκωσης και διαδικασίες απελευθέρωσης που έχουν εφαρμοστεί. Παρόμοια αποτελέσματα μ' αυτά της εν λόγω μελέτης στην απελευθέρωση των ολικών φαινολικών συστατικών φαίνεται να προέκυψαν στη μελέτη των *Deladino et al.2007*. Η μελέτη

αυτή κατέληξε ότι η απελευθέρωση των αντιοξειδωτικών από μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος έφτασε στο $47,4 \pm 0,3\%$ στο νερό^[168].

6.7. Σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες

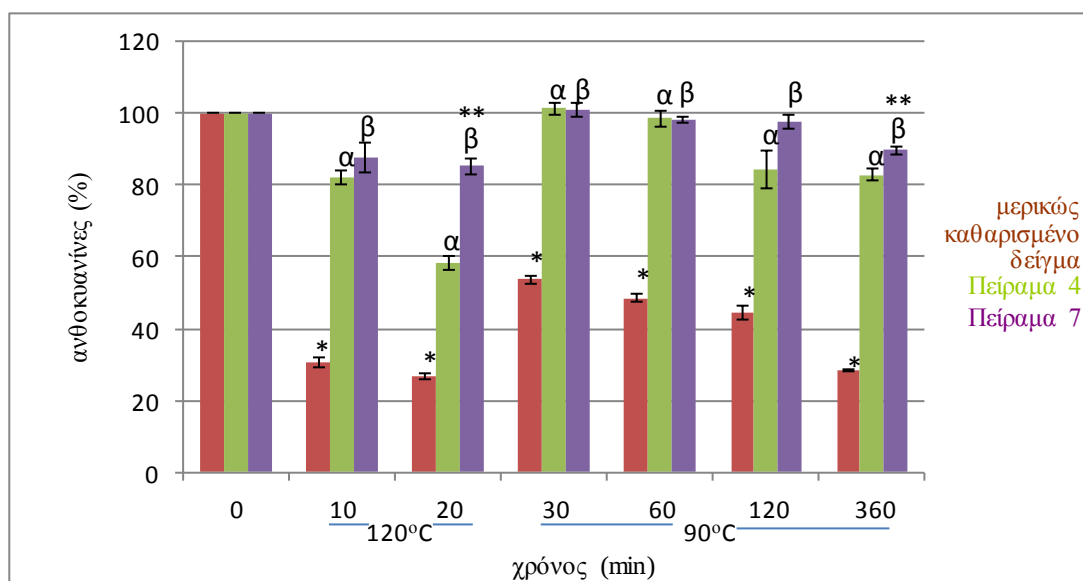
Τέλος, μελετήθηκε η σταθερότητα των ανθοκυανινών του μερικώς καθαρισμένου και ακατέργαστου εκχυλίσματος ανθοκυανινών, που ενθυλακώθηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.6. Η σταθερότητα ελέγχθηκε σε δύο θερμοκρασίες, συγκεκριμένα στους 90°C και 120°C . Χρησιμοποιήθηκαν υψηλές θερμοκρασίες διότι ακολουθήθηκε ένα επιταχυνόμενο πρωτόκολλο οξείδωσης των ανθοκυανινών σύμφωνα με την μελέτη των *Yamdech et al. 2012*^[164]. Η γρήγορη υποβάθμιση ανθοκυανινών σε υψηλές θερμοκρασίες πιθανά σχετίζεται με την παρουσία σακχάρων που οδηγούν σε αντιδράσεις Maillard^[163].

α) Θερμική σταθερότητα ολικών ανθοκυανινών



Διάγραμμα 6.7. Σταθερότητα ανθοκυανινών ακατέργαστου εκχυλίσματος με τις 2 τεχνικές εγκλεισμού (Πείραμα 6-εμβάπτιση στο δείγμα & Πείραμα 3-έγχυση δείγματος) στους 90°C και στους 120°C . *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο $t=0\text{min}$. **Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων ενθυλάκωσης. ^{α,β}Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ελεύθερων και ενθυλακωμένων ανθοκυανινών ανά χρονική στιγμή.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι οι ανθοκυανίνες του ακατέργαστου δείγματος προστατεύονται, ανεξάρτητα από τον τρόπο ενθυλάκωσης, τόσο στους 90°C όσο και στους 120°C. Επομένως, ο εγκλεισμός προσφέρει σταθερότητα διότι τα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος περιορίζουν τις αντιδράσεις των ανθοκυανινών με το οξυγόνο^[163]. Στους 90°C, η ανάκτηση ανθοκυανινών μετά τις 6h, ήταν στο 56,4% και 66% για τη μέθοδο με εμβάπτιση στο δείγμα και τη μέθοδο με έγχυση του δείγματος, αντίστοιχα. Στους 120°C, μετά τα 20min, η ανάκτηση ανθοκυανινών για τις δύο μεθόδους ήταν 38,2% και 40,8%, αντίστοιχα, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών αυτών.



Διάγραμμα 6.8. Σταθερότητα ανθοκυανινών μερικώς καθαρισμένου δείγματος με τις 2 τεχνικές εγκλεισμού (Πείραμα 7-εμβάπτιση στο δείγμα & Πείραμα 4-έγχυση δείγματος) στους 90°C και στους 120°C. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0min. **Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων ενθυλάκωσης. ^{α,β}Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ελεύθερων και ενθυλακωμένων ανθοκυανινών ανά χρονική στιγμή.

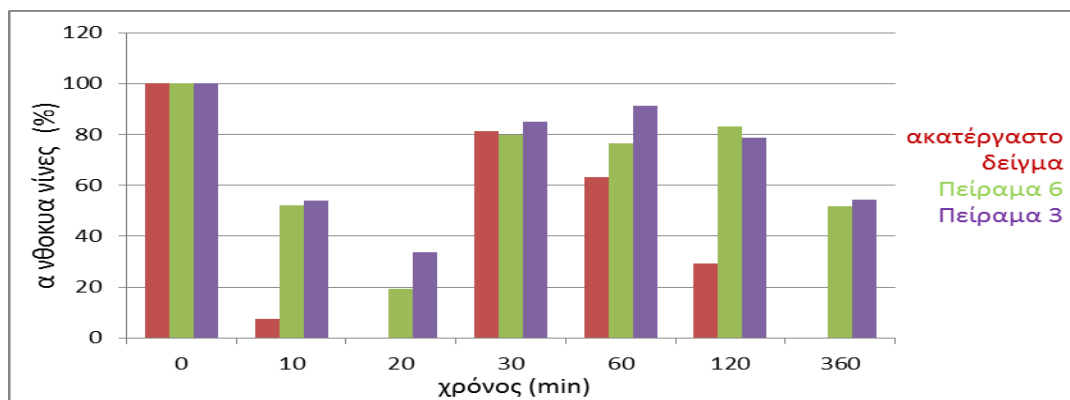
Από το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι οι δύο τεχνικές ενθυλάκωσης ενισχύουν τη σταθερότητα των ανθοκυανινών του μερικώς καθαρισμένου δείγματος τόσο στους 90°C όσο και στους 120°C. Επιπλέον, διαφαίνεται ότι και στις δύο θερμοκρασίες, κατά τη μέθοδο εμβάπτισης στο δείγμα επιτυγχάνεται καλύτερη προστασία. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση ανθοκυανινών βρέθηκε 87,9% και 82,9% στους 90°C, 85,5% και 58,5% στους 120°C, για τη μέθοδο εμβάπτισης στο δείγμα και τη μέθοδο έγχυσης του δείγματος, αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα 6.7 και 6.8, παρατηρούμε ότι δε μπορούμε με βεβαιότητα να υποστηρίξουμε ότι κάποια από τις δύο μεθόδους ενθυλάκωσης προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα στις ανθοκυανίνες κατά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες. Μπορεί, όμως, να ειπωθεί με επιφύλαξη ότι η μέθοδος εμβάπτισης στο δείγμα εμφανίζει συγκρίσιμα ή καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη μέθοδο έγχυσης του δείγματος. Παράλληλα, καθίσταται εμφανές ότι το μερικώς καθαρισμένο δείγμα ανακτάται σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με το ακατέργαστο δείγμα τόσο στους 90°C όσο και στους 120°C. Αυτό ισχύει και για τις δύο μεθόδους ενθυλάκωσης.

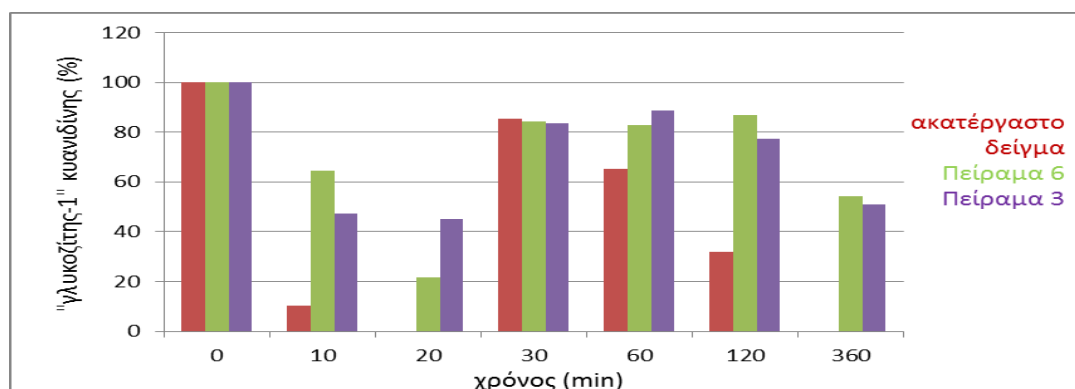
Γενικά, και τα δύο συστήματα ενθυλάκωσης αποδείχθηκαν περισσότερο σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με τα ελεύθερα εκχυλίσματα. Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά^[115,164]. Συγκεκριμένα, σε μελέτη των *Yamdech et al. 2012*, διερευνήθηκε η σταθερότητα ενθυλακωμένων ανθοκυανινών μύρτιλλου στους 80°C, 100°C και 121°C. Η έρευνα κατέληξε ότι η ανάκτηση ανθοκυανινών ήταν 91%, 82% και 89%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα που προέκυψαν για το καθαρό δείγμα στη μέθοδο εμβάπτισης στο δείγμα. Η διαφοροποίηση σε σχέση με τα υπόλοιπα αποτελέσματα πιθανά οφείλεται στο διαφορετικό φρούτο που μελετήθηκε καθώς επίσης στη διαφορετική μέθοδο εκχύλισης και ενθυλάκωσης που ακολουθήθηκε^[164]. Σε μια άλλη μελέτη των ίδιων ερευνητών, παρήχθησαν μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος (1,5%) τα οποία εμβαπτίστηκαν σε εκχύλισμα ανθοκυανινών μύρτιλλου. Στο πλαίσιο της έρευνας αυτής, μελετήθηκε η σταθερότητα των ενθυλακωμένων ανθοκυανινών στους 40°C και στους 100°C καταλήγοντας ότι η ανάκτηση ήταν 98,8% και 24,1%, αντίστοιχα, μετά από 10h. Η διαφοροποίηση σε σχέση με τα δικά μας ευρήματα πιθανά αποδίδεται στο διαφορετικό φρούτο που μελετήθηκε ή στη διαφορετική μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε ή ακόμη και στο γεγονός ότι η σταθερότητα ελέγχθηκε σε διαφορετικές συνθήκες^[163].

β) Θερμική σταθερότητα επιμέρους ανθοκυανινών

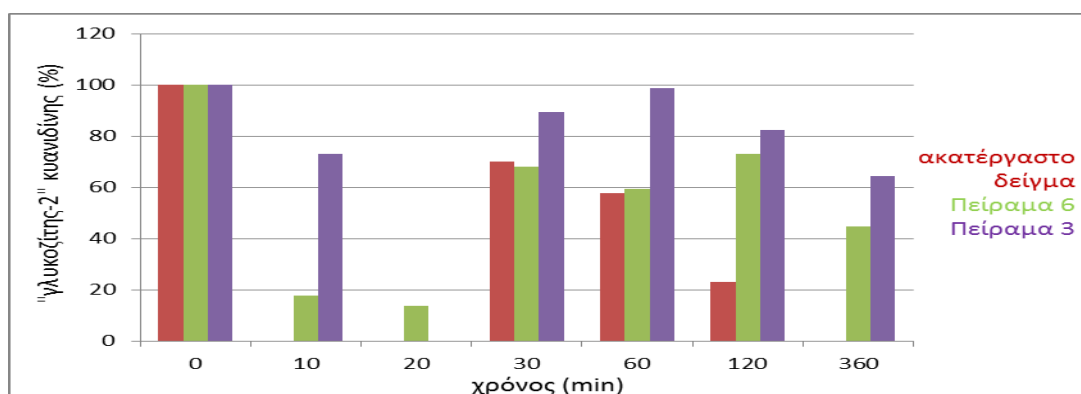
Τα δείγματα αυτά καθώς επίσης τα αρχικά εκχυλίσματα (ακατέργαστο & μερικώς καθαρισμένο δείγμα) αναλύθηκαν στις επιμέρους ανθοκυανίνες με HPLC. Στα αρχικά εκχυλίσματα ανιχνεύθηκαν 2 κύριες κορυφές, πιθανότατα παράγωγα κυανιδίνης δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητας του βύσσινου σε 3-(2^Z-γλυκοζυλο-ρουτινοζίτη) της κυανιδίνης και 3-Ο-ρουτινοζίτη της κυανιδίνης. Σε μικρότερη αναλογία ανιχνεύθηκαν 2 ακόμα συστατικά τα οποία δεν αξιολογήθηκαν στην ποσοτικοποίηση. Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα θερμικής σταθερότητας των αρχικών εκχυλισμάτων και των ενθυλακωμένων δειγμάτων:



Διάγραμμα 6.9. Σταθερότητα ανθοκυανινών στο ακατέργαστο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 3) και εμφάνισης (Πείραμα 6) στους 90°C και στους 120°C.

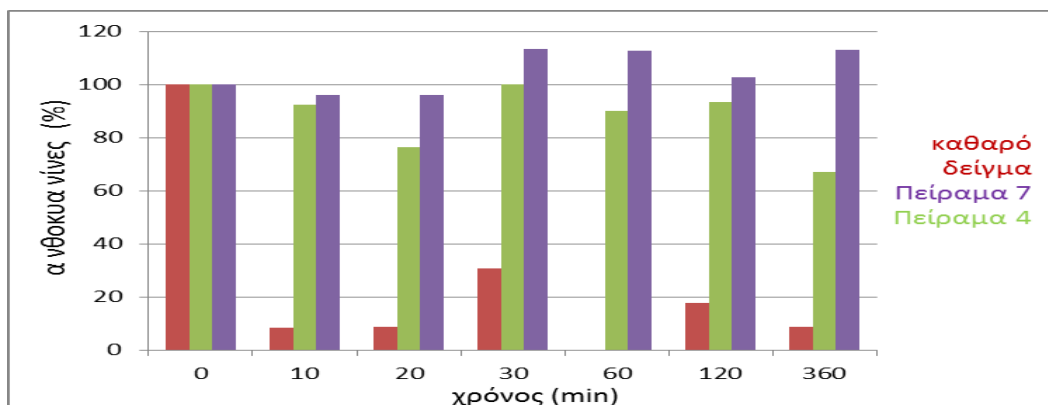


Διάγραμμα 6.10. Σταθερότητα της επιμέρους ανθοκυανίνης, «γλυκοζίτη-1» της κυανιδίνης στο ακατέργαστο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 3) και εμφάνισης (Πείραμα 6) στους 90°C και στους 120°C.

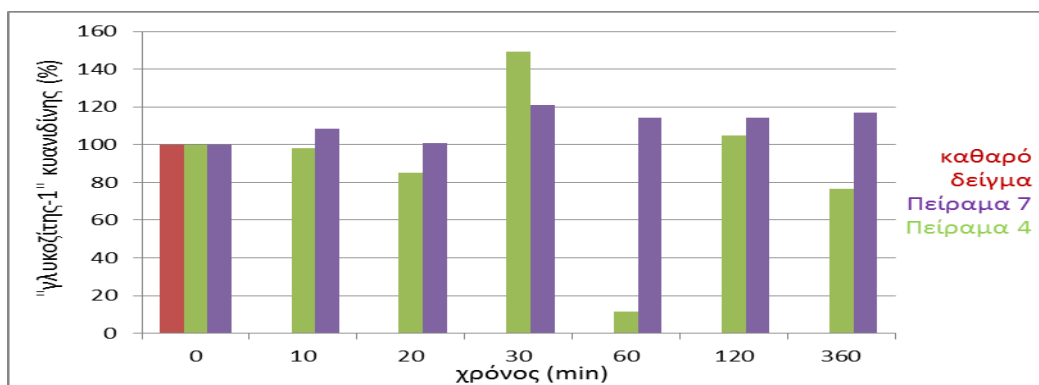


Διάγραμμα 6.11. Σταθερότητα της επιμέρους ανθοκυανίνης, «γλυκοζίτη-2» της κυανιδίνης στο ακατέργαστο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 3) και εμφάνισης (Πείραμα 6) στους 90°C και στους 120°C.

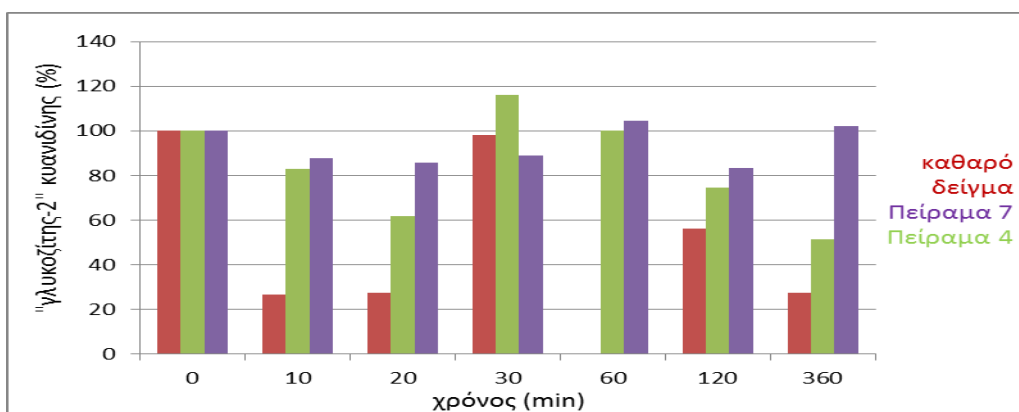
Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 6.9-6.11, το ακατέργαστο εκχύλισμα υπέστη σημαντική απώλεια των επιμέρους ανθοκυανινών κατά τη θερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των δύο κύριων ανθοκυανινών που ταυτοποιήθηκαν με HPLC κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων ωρών στους 90°C. Στους 120°C, κατά τα 10 πρώτα λεπτά ανιχνεύτηκε μόνο ο γλυκοζίτης-2 της κυανιδίνης σε πολύ μικρή ποσότητα. Τελικά, κατά το τέλος της θέρμανσης δεν ανιχνεύτηκε καμία επιμέρους ανθοκυανίνη στο δείγμα. Μετά τον εγκλεισμό του δείγματος παρουσιάστηκε μεγαλύτερη σταθερότητα των ενθυλακωμένων ανθοκυανινών, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα 6.9-6.11, ανεξάρτητα από την τεχνική που εφαρμόστηκε για την παραγωγή των μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος. Η τεχνική εγκλεισμού με έγχυση του δείγματος (Πείραμα 3) οδήγησε σε υψηλότερη διατήρηση ανθοκυανινών συγκριτικά με την τεχνική ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα (Πείραμα 6), όπως είχε επιβεβαιωθεί και μέσω μέτρησης ολικών ανθοκυανινών με τη μέθοδο διαφορικού pH. Το σύνολο των επιμέρους ανθοκυανινών ακολούθησε παρόμοια πορεία με αυτήν που καταγράφηκε στο διάγραμμα 6.7 για την σταθερότητα ολικών ανθοκυανινών του ενθυλακωμένου ακατέργαστου δείγματος με τις 2 τεχνικές εγκλεισμού στους 90°C και στους 120°C.



Διάγραμμα 6.12. Σταθερότητα ανθοκυανινών στο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 4) και εμφάνισης (Πείραμα 7) στους 90°C και στους 120°C.



Διάγραμμα 6.13. Σταθερότητα της επιμέρους ανθοκυανίνης, «γλυκοζίτη-1» της κυανιδίνης στο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 4) και εμφάνισης (Πείραμα 7) στους 90°C και στους 120°C.

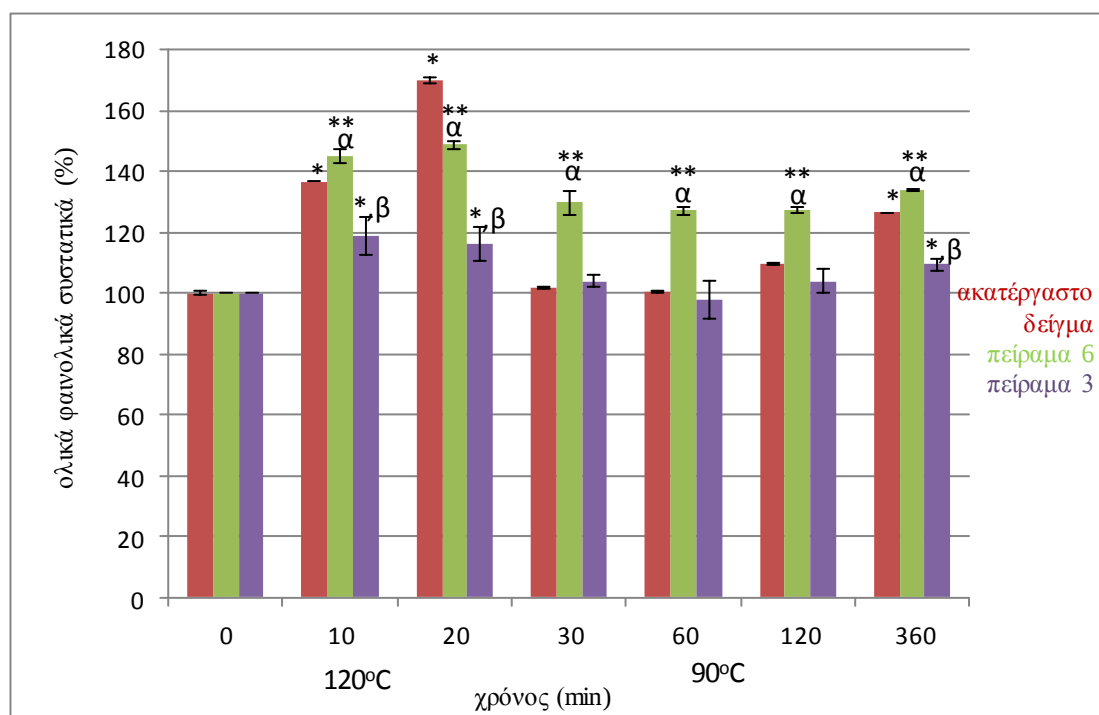


Διάγραμμα 6.14. Σταθερότητα της επιμέρους ανθοκυανίνης, «γλυκοζίτη-2» της κυανιδίνης στο μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα και στα ενθυλακωμένα δείγματα αυτού με την τεχνική έγχυσης (Πείραμα 4) και εμφάνισης (Πείραμα 7) στους 90°C και στους 120°C.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 6.12-6.14, μέσω της ανάλυσης HPLC επιβεβαιώθηκε ότι το μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα υπέστη σημαντική απώλεια των ανθοκυανινών του κατά τη θερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε μόνο ο «γλυκοζίτης-2» της κυανιδίνης ενώ ο «γλυκοζίτης-1» χάθηκε από την αρχή της θέρμανσης του δείγματος. Μετά τον εγκλεισμό του δείγματος αυξήθηκε η σταθερότητα των ενθυλακωμένων ανθοκυανινών, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα 6.12-6.14, ανεξάρτητα από την τεχνική που εφαρμόστηκε για την παραγωγή των μικροσφαιριδίων αλγινικού άλατος. Η τεχνική ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα φάνηκε να πλεονεκτεί καθώς πέτυχε υψηλότερη διατήρηση ανθοκυανινών, εύρημα το οποίο είχε επιβεβαιωθεί και μέσω της ανάλυσης ολικών ανθοκυανινών με τη μέθοδο διαφορικού pH. Κατά το εγκλεισμό του δείγματος, προστατεύτηκε ο γλυκοζίτης-1 της κυανιδίνης ανεξάρτητα από την τεχνική ενθυλάκωσης.

γ) Θερμική σταθερότητα ολικών φαινολικών συστατικών

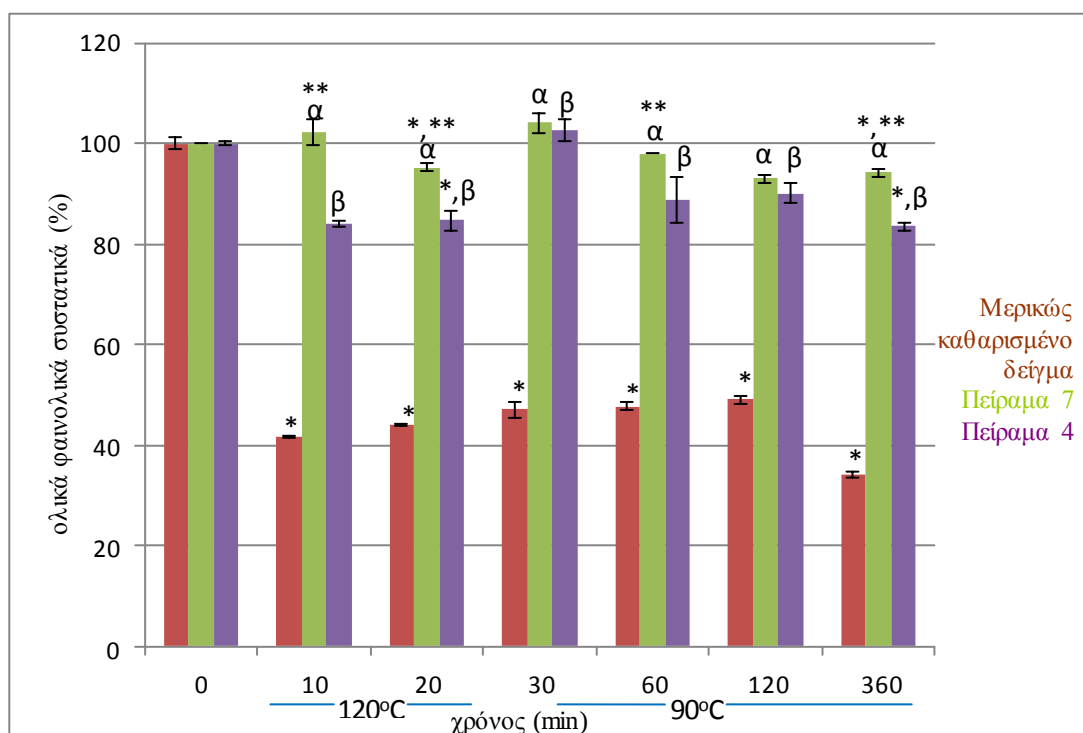
Παράλληλα, μελετήθηκε και η σταθερότητα των ολικών φαινολικών συστατικών του μερικώς καθαρισμένου και ακατέργαστου εκχυλίσματος στους 90°C και 120°C. Παρακάτω παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμματα:



Διάγραμμα 6.15. Σταθερότητα ολικών φαινολικών συστατικών ακατέργαστου εκχυλίσματος με τις 2 τεχνικές εγκλεισμού στους 90°C και στους 120°C. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0min. **Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων

ενθυλάκωσης.^{α,β} Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ελεύθερων και ενθυλακωμένων ανθοκυανινών ανά χρονική στιγμή

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι αυξάνεται η συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών τόσο στο αρχικό ακατέργαστο εκχύλισμα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία όσο και στα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος ανεξάρτητα από την τεχνική ενθυλάκωσης. Οι 2 τεχνικές, παρ' όλα αυτά, διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, καθίσταται αντιληπτό ότι η διαδικασία ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσού ολικών φαινολικών συστατικών του ακατέργαστου εκχυλίσματος (Πείραμα 6) στους 90°C. Στους 120°C, αντίθετα, ενώ στην αρχή παρατηρείται αυτή η αύξηση, στο τέλος του πειράματος δεν επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα. Από την άλλη πλευρά, η τεχνική ενθυλάκωσης με έγχυση του δείγματος (Πείραμα 3) φαίνεται να οδηγεί σε μια πιο σταδιακή αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Από το διάγραμμα φαίνεται ακόμη ότι η αύξηση ολικών φαινολών που επετεύχθη με τη συγκεκριμένη τεχνική ήταν μικρότερη σε σχέση με την αύξηση που σημειώθηκε κατά τη θερμική επεξεργασία του ακατέργαστου δείγματος αυτού καθ' αυτού και στις δύο θερμοκρασίες.



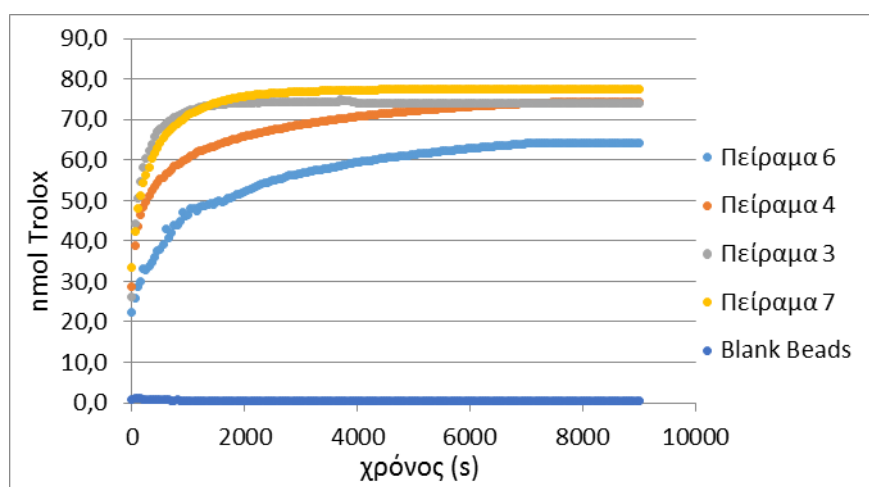
Διάγραμμα 6.16. Σταθερότητα ολικών φαινολικών συστατικών μερικώς καθαρισμένου δείγματος με τις 2 τεχνικές εγκλεισμού στους 90°C και στους 120°C. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0min. **Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων ενθυλάκωσης.^{α,β} Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ελεύθερων και ενθυλακωμένων ανθοκυανινών ανά χρονική στιγμή.

Στην περίπτωση του μερικώς καθαρισμένου εκχυλίσματος (διάγραμμα 6.16) φάνηκε ότι χάνεται σημαντικό ποσοστό του ολικού φαινολικού του περιεχομένου κατά τη θερμική επεξεργασία. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι δύο τεχνικές ενθυλάκωσης ενισχύουν τη σταθερότητα των ολικών φαινολικών ενώσεων του μερικώς καθαρισμένου δείγματος τόσο στους 90°C όσο και στους 120°C. Η τεχνική ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα εμφανίζει, όπως και στην περίπτωση του ακατέργαστου δείγματος, καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την τεχνική ενθυλάκωσης με έγχυση του δείγματος. Συγκεκριμένα, και στους 90°C και στους 120°C, με την πρώτη διαδικασία διατηρείται πολύ υψηλότερο ποσό ολικών φαινολών.

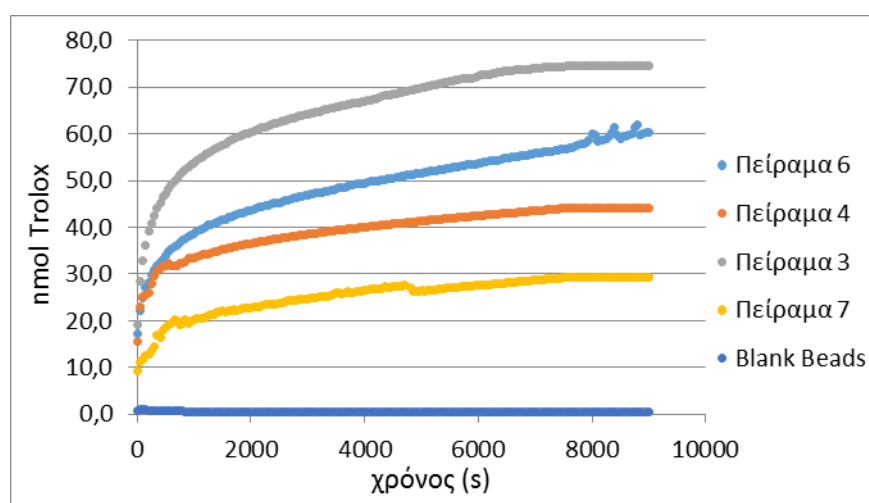
Η μελέτη των *Kim et al. 2006*, κατέληξε σε παρόμοια αποτελέσματα με τα αντίστοιχα της εν λόγω μεταπτυχιακής διατριβής. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές συμπέραναν ότι οι ολικές φαινολικές ενώσεις αιθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος φλοιού από λωτό αυξήθηκαν κατά τη θερμική επεξεργασία. Ακόμη, όσον αφορά στο υδατικό εκχύλισμα επιβεβαιώθηκε ότι η αύξηση αυτή ήταν πιο έντονη καθώς αύξανε η θερμοκρασία επεξεργασίας του δείγματος^[169]. Η ενίσχυση του ολικού φαινολικού περιεχομένου κατά τη απευθείας θέρμανση φυτικών προϊόντων έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετές μελέτες ενώ παράλληλα έχουν προταθεί πιθανοί μηχανισμοί εμφάνισης του φαινομένου αυτού^[170, 171]. Παρ' όλα αυτά, σε επίπεδο εκχυλισμάτων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυξάνουν οι ολικές φαινολικές ενώσεις κατά τη θέρμανση. Σε έρευνα των *Zhang et al. 2013*, φάνηκε ότι οι φαινολικές ενώσεις οδηγούν σε αύξηση της έντασης του καφέ χρώματος κατά την καραμελοποίηση των σακχάρων καθώς επίσης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των προϊόντων καραμελοποίησης. Η μελέτη κατέληξε ότι η σύζευξη μεταξύ φαινολικών συστατικών και σακχάρων είναι μερικώς υπεύθυνη για την παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών κατά τη θέρμανση^[172]. Η μελέτη των *Woo et al. 2015*, έδειξε ότι η γλυκόζη και μαλτόζη εμφανίζουν ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών κατά τη θέρμανση και παράλληλα η αντιοξειδωτική τους αυτή δράση αυξάνει καθώς αυξάνει ο χρόνος και η θερμοκρασία επεξεργασίας των σακχάρων^[173]. Σε αρκετές μελέτες αναφέρεται ότι με τη θέρμανση αυξάνεται η αντιοξειδωτική δράση σε φρούτα και λαχανικά λόγω ενίσχυσης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των συστατικών που απαντώνται φυσικά στα τρόφιμα^[173] ή λόγω παραγωγής νέων ενώσεων όπως τα αντιοξειδωτικά προϊόντα της αντίδρασης Maillard^[174, 175]. Βάσει των ευρημάτων αυτών ίσως μπορεί να εξηγηθεί η αύξηση των ολικών φαινολικών συστατικών κατά τη θερμική επεξεργασία του ακατέργαστου εκχυλίσματος αλλά και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ της μελέτης σταθερότητας των ολικών φαινολών του ακατέργαστου και του μερικώς καθαρισμένου δείγματος.

6.8. Αντιοξειδωτική ικανότητα ενθυλακωμένων δειγμάτων

Με τη μέθοδο δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενθυλακωμένων προϊόντων που ελήφθησαν απ' όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Το συγκεκριμένο πείραμα είναι πρωτότυπο διότι σ' αυτό αξιολογήθηκαν οι αντιοξειδωτικές δράσεις του πυρηνικού υλικού ενώ αυτό βρίσκεται εγκλεισμένο σε μικροσφαιρίδια και απελευθερώνεται συναρτήσει του χρόνου σε υδραλκοολικό διάλυμα. Ιδανικά θα θέλαμε το διάλυμα να είναι υδατικό όμως το αντιδραστήριο DPPH είναι αδιάλυτο στο νερό. Οι καμπύλες δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας συναρτήσει του χρόνου για τα δείγματα είναι οι ακόλουθες:



Διάγραμμα 6.17. Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH από μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος (40mg μικροσφαιριδίων ανά 3mL δ/τος DPPH 100μM) εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox (nmol)



Διάγραμμα 6.18. Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH από μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος (20mg μικροσφαιριδίων ανά 3mL δ/τος DPPH 100μM) εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox (nmol)

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι όλα τα ενθυλακωμένα προϊόντα εκδηλώσαν αντιοξειδωτική δράση και στις δύο συγκεντρώσεις. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι στη συγκέντρωση κατά την προσθήκη 40mg μικροσφαιριδίων, τα πειράματα 3 (ακατέργαστο εκχύλισμα-τεχνική έγχυσης), 4 (μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα-τεχνική έγχυσης) και 7 (μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα-τεχνική εμβάπτισης) εμφανίσαν παρόμοιου βαθμού δέσμευση της ελεύθερης ρίζας, ενώ το πείραμα 6 (ακατέργαστο εκχύλισμα-τεχνική εμβάπτισης) δέσμευσε την ρίζα DPPH σε μικρότερο ποσοστό (10% περίπου λιγότερο από τα υπόλοιπα πειράματα). Η διαφοροποίηση μεταξύ των ενθυλακωμένων δειγμάτων του ακατέργαστου εκχυλίσματος πιθανά προέκυψε λόγω διαφορών στην απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού. Όσον αφορά στο μερικώς καθαρισμένο δείγμα, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο τεχνικών εγκλεισμού. Κατά την προσθήκη 20mg μικροσφαιριδίων, αντίθετα όλα τα ενθυλακωμένα διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους. Δεδομένου ότι στην περίπτωση της προσθήκης μεγάλης ποσότητας μικροσφαιριδίων πιθανόν να επήλθε κορεσμός του συστήματος, αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το παρατηρούμενο αποτέλεσμα. Την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση εκδήλωσαν τα μικροσφαιρίδια του πειράματος 3. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι, σ' αυτήν την περίπτωση, τα ενθυλακωμένα δείγματα του ακατέργαστου εκχυλίσματος εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας. Επιπλέον, η τεχνική έγχυσης του δείγματος φάνηκε να πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής εμβάπτισης στο δείγμα. Η απόδοση του εγκλεισμού σε συνδυασμό με το ρυθμό απελευθέρωσης των συστατικών από το φορέα αλλά και την ταχύτητα αντίδρασης των ελευθέρων ριζών με τα αντιοξειδωτικά, αποτελούν παράγοντες που συνεισέφεραν στη διαμόρφωση αυτού του αποτελέσματος.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2010. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p \leq 0,05\%$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την παρούσα διατριβή μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Το σύστημα εκχύλισης που επιλέχθηκε ήταν ικανό να απομονώσει ένα σημαντικό κλάσμα φυτοχημικών και ιδιαίτερα ανθοκυανινών από το βύσσινο.
- Αξιολογήθηκε και βελτιστοποιήθηκε διαδικασία χρωματογραφικού διαχωρισμού για τον καθαρισμό του ακατέργαστου εκχυλίσματος. Με τη χρήση της ρητίνης XAD7 και του μίγματος μεθανόλη/HCl, προέκυψαν εκχυλίσματα με μειωμένη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες συγκριτικά με το αρχικό εκχύλισμα. Παράλληλα το σύστημα διαχωρισμού που επιλέχθηκε οδήγησε σε υψηλή ανάκτηση ανθοκυανινών.
- Οι 2 τεχνικές που ακολουθήθηκαν για την ενθυλάκωση σε μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος οδήγησαν σε επιτυχή εγκλεισμό ανθοκυανινών.
- Συγκρίνοντας τις 2 τεχνικές διαπιστώθηκαν οι ακόλουθες διαφορές μεταξύ αυτών:
 - Ως προς την απόδοση εγκλεισμού, καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισε η διαδικασία ενθυλάκωσης με έγχυση του δείγματος.
 - Ως προς την απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού, φάνηκε να πλεονεκτεί η τεχνική ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα. Στην τεχνική αυτή, φάνηκε να επιτυγχάνεται αύξηση της απόδοσης ενθυλάκωσης μετά από μείωση της αναλογίας δείγματος ανθοκυανινών : ποσότητας μικροσφαιριδίων.
- Η πορεία απελευθέρωσης του πυρηνικού υλικού ήταν συγκεκριμένη για κάθε τεχνική εγκλεισμού. Ειδικότερα, όσον αφορά στην διαδικασία ενθυλάκωσης με έγχυση του δείγματος παρατηρήθηκε μια απότομη απελευθέρωση ανθοκυανινών μέχρι τα 5 πρώτα λεπτά και έπειτα κοντά σ' αυτή τη χρονική στιγμή επετεύχθη πλατώ. Στην διαδικασία ενθυλάκωσης με εμβάπτιση στο δείγμα, η εκρόφηση των ανθοκυανινών ήταν σταδιακή μέχρι περίπου τα πρώτα 30min, μια χρονική στιγμή κατά την οποία επετεύχθη το πλατώ.
- Κατά τη μέλετη σταθερότητας στους 90°C και στους 120°C, φάνηκε ότι και τα 2 συστήματα ενθυλάκωσης προστάτευσαν τις ανθοκυανίνες τόσο του ακατέργαστου όσο

και του μερικώς καθαρισμένου δείγματος. Παράλληλα, το μερικώς καθαρισμένο εκχύλισμα φάνηκε να ανακτάται σε πολύ υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με το ακατέργαστο δείγμα και στις δύο θερμοκρασίες ανεξάρτητα από την τεχνική ενθυλάκωσης. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και από την ανάλυση επιμέρους ανθοκυανινών χρωματογραφικά

- Κατά τη μελέτη σταθερότητας ολικών φαινολικών συστατικών στους 90°C και στους 120°C, φάνηκε ότι τα ενθυλακωμένα προϊόντα επέδειξαν σταθερότητα των συστατικών τόσο μετά από εγκλεισμό του ακατέργαστου όσο και του μερικώς καθαρισμένου δείγματος. Η σταθερότητα αυτή παρατηρήθηκε και στο ακατέργαστο εκχύλισμα προ εγκλεισμού, ενώ στο μερικώς καθαρισμένο διαπιστώθηκε σημαντική απώλεια ολικών φαινολών.
- Το ενθυλακωμένο πυρηνικό υλικό ανεξάρτητα από την τεχνική εγκλεισμού εκδήλωσε αντιοξειδωτικές ιδιότητες κατά τη δοκιμή δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH●.

Συγκεντρωτικά, ο μερικός καθαρισμός του ακατέργαστου δείγματος και η ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων του βύσσινου με διαφορετικές τεχνικές ήταν επιτυχείς. Τα μικροσφαιρίδια αλγινικού άλατος που παρασκευάστηκαν μέσω δύο διαδικασιών πρόσφεραν ορισμένου βαθμού ελεγχόμενη απελευθέρωση του πυρηνικού υλικού, διατήρησαν τη σταθερότητα των ολικών φαινολικών συστατικών και των ανθοκυανινών σε υψηλές θερμοκρασίες και παράλληλα φάνηκε ότι επιδεικνύουν αντιοξειδωτικές δράσεις. Απαιτείται βέβαια περαιτέρω μελέτη, μπορεί όμως να ειπωθεί ότι τα συστήματα αυτά θα μπορούσαν πιθανά να αξιοποιηθούν μελλοντικά, για παράδειγμα, από τη βιομηχανία καλλυντικών σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Chiou A, Panagopoulou EA, Karathanos VT. Food Sources, Chemical Applications and Health Benefits. In: Warner LM, editor. Handbook of Anthocyanins: Nova Science Publishers; 2014.
- [2] Horvath A, Zanetto A, Tavaud M, Christmann H, Laigret F. Origin of *Prunus cerasus* (sour cherry) genomes. 5 International Cherry Symposium. Bursa, TUR. 2005.
- [3] Stocks C. Forgotten Fruits: A guide to Britain's traditional fruit and vegetables from Orange Jelly turnips and Dan's Mistake gooseberries: Windmill; 2009.
- [4] Καζαντζής Κ, Χατζηχαρίσης Ι. Συνοπτική περιγραφή των κυριότερων ποικιλιών βυσσινιάς που αξιολογήθηκαν στο Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων. 2011. Προσπελάσθηκε στις 13 Ιουνίου, 2015, στο www.nagref.gr/journals/ethg/images/44/ethg44p8-11.pdf.
- [5] Gaia επιχειρείν. Προσπελάσθηκε στις 15 Ιουνίου, 2015, στο <http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%92%CF%85%CF%83%CF%83%CE%B9%CE%BD%CE%B9%CE%AC>.
- [6] Νικήσιανης Ν. Ολοκληρωμένη διαχείριση και αξιοποίηση εγκαταλελειμμένων οπωρώνων και αυτοφυών καρποφόρων φυτών (ΕΣΠΑ). Εκπόνηση Σχεδίων Ερευνητικών και Τεχνολογικών Αναπτυξιακών Έργων Καινοτομίας (ΑγροΕΤΑΚ) Παραδοτέο 1γ: Φυτοτεχνική μελέτη για την ορθή διαχείριση των οπωροφόρων δέντρων Μονάδα υλοποίησης: Ινστιτούτο Δασικών Ερευνών Θεσσαλονίκης 2015. p. 113.
- [7] Ποντίκης Κ. Ειδική δένδροκομία "Ακρόδρυα-Πυρηνόκαρπα-Λοιπά καρποφόρα" Τόμος II. Σταμούλη Α.Ε.; . 1996. p. 493.
- [8] Food and Agriculture Organization Statistics [FAOSTAT] (2015). Production of sour cherries in 2012 and 2013. Προσπελάσθηκε στις 15 Ιουνίου, 2015, στο <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- [9] Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Mediterranean diet and health. Biofactors. 2013;39:335-42.
- [10] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002;30:620-50.
- [11] Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. Atherosclerosis. 2006;187:1-17.
- [12] Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. Prog Lipid Res. 2007;46:244-82.
- [13] Hamid AA, Aiyelaagbe, OO, Usman, LA, Ameen, OM, Lawal, A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. African Journal of Pure and Applied Chemistry. 2010;4:142-51.

- [14] Gorinstein S, Leontowicz H, Lojek A, Leontowicz M, Ciz M, Krzeminski R, et al. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *J Agric Food Chem.* 2002;50:6102-8.
- [15] Han X, Shen, T, Lou, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci.* 2007;8:950-88.
- [16] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56:317-33.
- [17] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2:1231-46.
- [18] Ferretti G, Bacchetti T, Belleggia A, Neri D. Cherry antioxidants: from farm to table. *Molecules.* 2010;15:6993-7005.
- [19] McCune LM, Kubota C, Stendell-Hollis NR, Thomson CA. Cherries and health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51:1-12.
- [20] Papp N, Szilvassy B, Abranko L, Szabo T, Pfeiffer P, Szabo Z, Nyeki J, Ercisli S, Stefanovits-Banyai E, Heged A. Main quality attributes and antioxidants in Hungarian sour cherries: identification of genotypes with enhanced functional properties. *International Journal of Food Science and Technology* 2010;45:395-402.
- [21] Levaj B, Dragovic-Uzelac V, Delonga K, Ganic KK, Banovic M, Kovacevic, DB. Polyphenols and Volatiles in Sour Cherries, Berries and Jams. *Food Technol Biotechnol.* 2010;48:538-47.
- [22] National Nutrient Database for Standard Reference [USDA] (2015). Cherries, sour, red, raw. Προσπελάσθηκε στις 22 Ιουνίου, 2015, στο <http://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1861/2>.
- [23] Wojdylo A, Nowicka P, Laskowski P, Oszmianski J. Evaluation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruits for their polyphenol content, antioxidant properties, and nutritional components. *J Agric Food Chem.* 2014;62:12332-45.
- [24] Burkhardt S, Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Reiter RJ. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *J Agric Food Chem.* 2001;49:4898-902.
- [25] Khoo GM, Clausen MR, Redersen BH, Larsen E. Bioactivity and total phenolic content of 34 sour cherry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2011;24.
- [26] Kim DO, Heo HJ, Kim YJ, Yang HS, Lee CY. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J Agric Food Chem.* 2005;53:9921-7.
- [27] Bonerz D, Würth K, Dietrich H, Will F. Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *European Food Research and Technology.* 2007;224:355-64.
- [28] Blando F, Gerardi C, Nicoletti I. Sour Cherry (*Prunus cerasus* L) Anthocyanins as Ingredients for Functional Foods. *J Biomed Biotechnol.* 2004;2004:253-8.

- [29] Saric A, Sobocanec S, Balog T, Kusic B, Sverko V, Dragovic-Uzelac V, et al. Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mice consuming sour cherry juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods Hum Nutr.* 2009;64:231-7.
- [30] Mitić MN, Obradović MV, Kostić, DA, Micić, RJ, Pecev ET. . Polyphenol content and antioxidant activity of sour cherries from serbia *CI&CEQ.* 2012;18:53-62.
- [31] Serrano M, Guillen F, Martinez-Romero D, Castillo S, Valero D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agric Food Chem.* 2005;53:2741-5.
- [32] Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2010;2:1106-31.
- [33] Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:215S-7S.
- [34] Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:1818-92.
- [35] Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2013;68:125-31.
- [36] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;339:1523-6.
- [37] Dubick MA, Omaye ST. Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans. *J Nutraceut Functional & Med Foods.* 2001;3:67-93.
- [38] Nardini M, Natella F, Scaccini C. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets.* 2007;18:224-43.
- [39] Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:895-909.
- [40] Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:317S-25S.
- [41] Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009;58:537-52.
- [42] Benetou V, Orfanos P, Lagiou P, Trichopoulos D, Boffetta P, Trichopoulou A. Vegetables and fruits in relation to cancer risk: evidence from the Greek EPIC cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:387-92.
- [43] Favero A, Parpinel M, Franceschi S. Diet and risk of breast cancer: major findings from an Italian case-control study. *Biomed Pharmacother.* 1998;52:109-15.

- [44] Zhang SM, Hunter DJ, Rosner BA, Giovannucci EL, Colditz GA, Speizer FE, et al. Intakes of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:477-85.
- [45] Botterweck AA, van den Brandt PA, Goldbohm RA. A prospective cohort study on vegetable and fruit consumption and stomach cancer risk in The Netherlands. *Am J Epidemiol.* 1998;148:842-53.
- [46] Larsson SC, Hakansson N, Naslund I, Bergkvist L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:301-5.
- [47] Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption and incidence of gastric cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1998-2001.
- [48] Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:381-406.
- [49] Martinez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res.* 2005;166:177-211.
- [50] Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, et al. Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience.* 2009;159:1208-15.
- [51] Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent.* 2009;37:413-23.
- [52] Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *Am J Med.* 2006;119:751-9.
- [53] Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res.* 2008;33:2416-26.
- [54] Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord.* 2013;12:43.
- [55] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2:270-8.
- [56] Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res.* 2010;302:71-83.
- [57] Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res.* 2007;73:341-7.
- [58] Yousuf B, Gul K, Wani AA, Singh P. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;0.
- [59] Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:159-70.

- [60] Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr.* 2011;2:1-7.
- [61] Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 2008;269:281-90.
- [62] Ghosh D, Konishi T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16:200-8.
- [63] Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2013;12:483-508.
- [64] Ziberna L, Lunder M, Moze S, Vanzo A, Tramer F, Passamonti S, et al. Acute cardioprotective and cardiotoxic effects of bilberry anthocyanins in ischemia-reperfusion injury: beyond concentration-dependent antioxidant activity. *Cardiovasc Toxicol.* 2010;10:283-94.
- [65] Ide T, Ashakumary L, Takahashi Y, Kushiro M, Fukuda N, Sugano M. Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1534:1-13.
- [66] Murase T, Mizuno T, Omachi T, Onizawa K, Komine Y, Kondo H, et al. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J Lipid Res.* 2001;42:372-8.
- [67] Blakely S, Herbert A, Collins M, Jenkins M, Mitchell G, Grundel E, et al. Lutein interacts with ascorbic acid more frequently than with alpha-tocopherol to alter biomarkers of oxidative stress in female Zucker obese rats. *J Nutr.* 2003;133:2838-44.
- [68] Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Kojo H, Osawa T. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1184-97.
- [69] Tsuda T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J Agric Food Chem.* 2008;56:642-6.
- [70] Sasaki R, Nishimura N, Hoshino H, Isa Y, Kadowaki M, Ichi T, et al. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:1619-27.
- [71] Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr.* 2003;133:2125-30.
- [72] Matsumoto H, Nakamura Y, Iida H, Ito K, Ohguro H. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Exp Eye Res.* 2006;83:348-56.
- [73] Ohguro L, Ohguro H, Nakazawa M. Effects of anthocyanins in blackcurrant on retinal blood flow circulation of patients with normal tension glaucoma. A pilot study. *Hirosaki Med J.* 2007;59:23-32.

- [74] Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr.* 2010;103:730-4.
- [75] Bueno JM, Ramos-Escudero F, Saez-Plazab P, Munozc AM, Navasb MJ, Asuerob AG. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: general considerations concerning polyphenols and flavonoids. *Cr Rev Anal Chem* 2012;42:102-25.
- [76] Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod.* 1999;62:294-6.
- [77] Traustadottir T, Davies SS, Stock AA, Su Y, Heward CB, Roberts LJ, 2nd, et al. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. *J Nutr.* 2009;139:1896-900.
- [78] Seymour EM, Warber SM, Kirakosyan A, Noon KR, Gillespie B, Uhley VE, Wunder J, Urcuyo DE, Kaufman PB, Bolling SF. Anthocyanin pharmacokinetics and dose-dependent plasma antioxidant pharmacodynamics following whole tart cherry intake in healthy humans. *Journal of functional food.* 2014;2:509-16.
- [79] Tall JM, Seeram NP, Zhao C, Nair MG, Meyer RA, Raja SN. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. *Behav Brain Res.* 2004;153:181-8.
- [80] Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:480-7.
- [81] Miles MP, Andring JM, Pearson SD, Gordon LK, Kasper C, Depner CM, et al. Diurnal variation, response to eccentric exercise, and association of inflammatory mediators with muscle damage variables. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104:451-8.
- [82] Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev.* 2004;10:75-90.
- [83] Ducharme NG, Fortier LA, Kraus MS, Hobo S, Mohammed HO, McHugh MP, et al. Effect of a tart cherry juice blend on exercise-induced muscle damage in horses. *Am J Vet Res.* 2009;70:758-63.
- [84] Connolly DA, McHugh MP, Padilla-Zakour OI, Carlson L, Sayers SP. Efficacy of a tart cherry juice blend in preventing the symptoms of muscle damage. *Br J Sports Med.* 2006;40:679-83; discussion 83.
- [85] Howatson G, McHugh MP, Hill JA, Brouner J, Jewell AP, van Someren KA, Shave RE, Howatson SA. Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. *Scand J Med Sci Sports* 2009. 2009;1-10.
- [86] Kuehl KS, Perrier ET, Elliot DL, Chesnutt JC. Efficacy of tart cherry juice in reducing muscle pain during running: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2010;7:17.
- [87] Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science.* 1992;256:668-70.

- [88] Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2003;194:13-9.
- [89] Bobe G, Wang B, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD. Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC(Min) mice fed suboptimal levels of sulindac. *J Agric Food Chem.* 2006;54:9322-8.
- [90] Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Jr., Cleeman JI, Kahn RA, American Heart A, et al. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:e19-24.
- [91] Seymour EM, Singer AAM, Kirakosyan A, Urcuyo-Llanes DE, Kaufman PB, Bolling SF. Tart cherry intake reduces indices of metabolic syndrome in rats. *ISHS Acta Horticulturae 841: II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables: FAVHEALTH, 2007* Προσπελάσθηκε στις 15 Ιουλίου, 2015, στο http://www.actahort.org/books/841/841_25.htm.
- [92] Seymour EM, Lewis SK, Urcuyo-Llanes DE, Tanone, II, Kirakosyan A, Kaufman PB, et al. Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *J Med Food.* 2009;12:935-42.
- [93] Lynn A, Mathew S, Moore CT, Russell J, Robinson E, Soumpasi V, et al. Effect of a tart cherry juice supplement on arterial stiffness and inflammation in healthy adults: a randomised controlled trial. *Plant Foods Hum Nutr.* 2014;69:122-7.
- [94] Opp MR. Cytokines and sleep: the first hundred years. *Brain Behav Immun.* 2004;18:295-7.
- [95] Pigeon WR, Carr M, Gorman C, Perlis ML. Effects of a tart cherry juice beverage on the sleep of older adults with insomnia: a pilot study. *J Med Food.* 2010;13:579-83.
- [96] Howatson G, Bell PG, Tallent J, Middleton B, McHugh MP, Ellis J. Effect of tart cherry juice (*Prunus cerasus*) on melatonin levels and enhanced sleep quality. *Eur J Nutr.* 2012;51:909-16.
- [97] Matchynski JJ, Lowrance SA, Pappas C, Rossignol J, Puckett N, Sandstrom M, et al. Combinatorial treatment of tart cherry extract and essential fatty acids reduces cognitive impairments and inflammation in the mu-p75 saporin-induced mouse model of Alzheimer's disease. *J Med Food.* 2013;16:288-95.
- [98] Schumacher HR, Pullman-Mooar S, Gupta SR, Dinnella JE, Kim R, McHugh MP. Randomized double-blind crossover study of the efficacy of a tart cherry juice blend in treatment of osteoarthritis (OA) of the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:1035-41.
- [99] Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science & Technology.* 2013;21:512-23.
- [100] Anal K, Singh A. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology.* 2007;18:241-51.

- [101] Desai K, Park H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 2005;23:1361-94.
- [102] Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*. 2013;469-79.
- [103] Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr*. 1999;50:213-24.
- [104] Dziezak JD. Microencapsulation and encapsulated food ingredients. *Food Technology*. 1998;42:136-51.
- [105] Jyothi NV, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*. 2010;27:187-97.
- [106] Schrooyen PM, van der Meer R, De Kruif CG. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:475-9.
- [107] Kuang S, Oliveira J, Crean A. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010;50:951-68.
- [108] Zuidam NJ, Shimon E. (Eds). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*; Springer; 2010. p. 3-29.
- [109] Augustin MA, Hemar Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev*. 2009;38:902-12.
- [110] Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*. 2012;33:3279-305.
- [111] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210:908-10.
- [112] Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJ, Sagis LM. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;209:163-71.
- [113] Song H, Yu W, Gao M, Liu X, Ma X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym*. 2013;96:181-9.
- [114] Noor Hafizah A, Lee PM, Kong Hung L. Immobilization Of Red Anthocyanin Extract Of *Dendrobium Sonia* 'Red Born' In Calcium Alginate Bead. *International Conference on Science and Social Research*. 2010.
- [115] Santos DT, Albarelli JQ, Beppu MM, Meireles MAA. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. *Food Research International*. 2013;50:617-24.

- [116] Manojlovic V, Djonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. *Int J Nanomedicine*. 2006;1:163-71.
- [117] Champagne CP, Blahuta N, Brion F, Gagnon C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnol Bioeng*. 2000;68:681-8.
- [118] Prüsse U, Bilancetti L, Bucko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, Lewińska D, Manojlovic V, Massart B, et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap*. 2008;62:364-74.
- [119] Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, Halle JP, Neufeld RJ, Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;38:39-45.
- [120] Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, Goncalves AR, Veiga F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *Int J Pharm*. 2006;311:1-10.
- [121] Liu XD, Bao DC, Xue WM, Xiong Y, Yu WT, Yu XJ, Ma XJ, Yuan Q. Preparation of Uniform Calcium Alginate Gel Beads by Membrane Emulsification Coupled with Internal Gelation. *Journal of Applied Polymer Science* 2002;87:848-52.
- [122] Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*. 2006;63:176-87.
- [123] Carocho M, Barreiro M, Morales P, Ferreira I. Adding molecules to food, pros and con: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*. 2014:377-99.
- [124] Nedovica V, Kalusevica A, Manojlovic V, Levica S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) *Procedia Food Science*. 2011;1:1896-15.
- [125] Diab R, Jaafar-Maalej C, Fessi H, Maincent P. Engineered nanoparticulate drug delivery systems: the next frontier for oral administration? *AAPS J*. 2012;14:688-702.
- [126] Huq T, Khan A, Khan RA, Riedl B, Lacroix M. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53:909-16.
- [127] Neethirajan S, Jaya DS. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. 2011;4:39-47.
- [128] Joye IJ, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014;19:417-27.
- [129] Singh MN, Hemant KS, Ram M, Shivakumar HG. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res Pharm Sci*. 2010;5:65-77.

- [130] Kim KK, Pack DW. Microspheres for Drug Delivery. In: Ferrari M, Lee AP, Lee LJ, editor. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*: Springer; 2006. p. 19-50.
- [131] Young KR, Ross TM. Particle-based vaccines for HIV-1 infection. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2003;3:151-69.
- [132] Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, Cova L. Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine*. 2003;21:659-62.
- [133] Friedlander AM, Welkos SL, Ivins BE. Anthrax vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;271:33-60.
- [134] Kim J, Wilson DR, Zamboni CG, Green JJ. Targeted polymeric nanoparticles for cancer gene therapy. *J Drug Target*. 2015:1-15.
- [135] Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010;81:680-9.
- [136] Patravale VB, Mandawgade SD. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30:19-33.
- [137] Ammala A. Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35:113-24.
- [138] Martins IM, Barreiro MF, Coelho M, Rodrigues AE. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*. 2014;245:191-200.
- [139] Murtaza G, Waseem A, ur-Rehman N, Hussain I. Alginate microparticles for biodelivery: A review *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011;5:2726-37.
- [140] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37:106-26.
- [141] Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88:1-12.
- [142] Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*. 2005;26:6335-42.
- [143] Sun J, Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*. 2013;6:1285-309.
- [144] Jin HH, Kim DH, Kim TW, Shin KK, Jung JS, Park HC, Yoon SY. . In vitro evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012;51:1079-85.
- [145] Florczyk SJ, Leung M, Jana S, Li Z, Bhattarai N, Huang JI, et al. Enhanced bone tissue formation by alginate gel-assisted cell seeding in porous ceramic scaffolds and sustained release of growth factor. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:3408-15.

- [146] Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, et al. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials*. 2011;32:65-74.
- [147] Dai J, Gupte A, Gates L, Mumper RJ. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:837-47.
- [148] Wang E, Yin Y, Xu C, Liu J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. *J Chromatogr A*. 2014;1327:39-48.
- [149] Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*. 2005;88:1269-78.
- [150] Bunea A, Rugina D, Sconta Z, Pop RM, Pintea A, Socaciu C, et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*. 2013;95:436-44.
- [151] Liu XD, Yu WY, Zhang Y, Xue WM, Yu WT, Xiong Y, et al. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *J Microencapsul*. 2002;19:775-82.
- [152] Kopjar M, Orsolic M, Pilizota V. Anthocyanins, Phenols, and Antioxidant Activity of Sour Cherry Puree Extracts and their Stability During Storage. *International Journal of Food Properties*. 2014;17:1393-405.
- [153] Chandra A, Nair MG, Iezzoni AF. Isolation and Stabilization of Anthocyanins from Tart Cherries (*Prunus cermug* L.). *J Agrlc Food Chem*. 1993;41:1062-5.
- [154] Daenen L, Sterckx F, Delvaux FR, Verachttert H, Derdelinckx G. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:1103-14.
- [155] Simunic V, Kovac S, Gaso-Sokac D, Pfannhauser W, Murkovic M. Determination of anthocyanins in four Croatian cultivars of sour cherries (*Prunus cerasus*). *Eur Food Res Technol* 2005;220:575-8.
- [156] Coutinho MR, Quadri MB, Moreira RFPM, Quadri MGN. Partial Purification of Anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage). *Separation Science and Technology* 2004;39: 3769–82.
- [157] Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, Garcia-Parrillia MC, Troncoso AM. Isolation, identification and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*. 2010;123:574-82.
- [158] Andersen OM. Semipreparative Isolation and Structure Determination of Pelargonidin 3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1->2)-beta-D-glucopyranoside and Other Anthocyanins from the Tree *Dacrycarpus dacrydioides*. *Acta Chemica Scandinavica* 1988;42:462-8.

- [159] Park. SY, Kim SJ, Chang HI. Isolation of Anthocyanin from Black Rice (Heugjinjubyeo) and Screening of its Antioxidant Activities. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 2008;36:55-60.
- [160] Charles-Navarro D, Bocanegra-García V, Palos I, Rivera G, Esquivel-Ferriño P, Gracia-Vásquez S, Ortiz-Andrade R, Quiroz-Velásquez J, Hernández-Mendoza JL. Encapsulation and release characteristics of glibenclamide loaded calcium-alginate beads. *Quím Nova* 2010;33.
- [161] Zam W, Bashour G, Abdelwahed W, Khayata W. Alginate-pomegranate peels' polyphenols beads: effects of formulation parameters on loading efficiency. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;50:741-8.
- [162] Rijo P, Duarte A, Francisco AP, Semedo-Lemsaddek T, Simoes MF. In vitro antimicrobial activity of royleanone derivatives against Gram-positive bacterial pathogens. *Phyther Res*. 2014;28:76-81.
- [163] Yamdech R, Aramwit P, Kanokpanont S. Stability of anthocyanin in mulberry fruits extract adsorbed on calcium alginate beads 1st Mae Fah Luang University International Conference. 2012.
- [164] Yamdech R, Aramwit P, Kanokpanont S. Stability of Anthocyanin from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature Advanced Materials Research. 2012;506:587-90.
- [165] Mandal S, Kumar SS, Krishnamoorthy B, Basu SK. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Braz J Pharm Sci* 2010;46.
- [166] Isailović B, Kalušević A, Žuržul N, Coelho MT, Đorđević V, Alves VD, Sousa I, Moldão-Martins M, Bugarski B, Nedović VA. Microencapsulation of natural antioxidants from *pterispartum tridentatum* in different alginate and inulin systems 6th Central European Congress on Food. 2012.
- [167] Zam W, Bashour G, Abdelwahed W, Khayata W. Formulation and in-vitro release of pomegranate peels' polyphenols microbeads. *IJPSR*. 2013;4:3536-40.
- [168] Deladino L, Anbinder PS, Navarro AS, Martino MN. . Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 2008;71:126-34.
- [169] Kim SY, Jeong SM, Kim SJ, Jeon KI, Park E, Park HR, et al. Effect of heat treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) peel. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70:999-1002.
- [170] Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*. 2006;99:381-7.
- [171] Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, et al. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem*. 2004;52:3389-93.
- [172] Zhang X, Chen F, Wang M. Impacts of selected dietary polyphenols on caramelization in model systems. *Food Chem*. 2013;141:3451-8.

- [173] Woo KS, Kim HY, Hwang IG, Lee SH, Jeong HS. Characteristics of the Thermal Degradation of Glucose and Maltose Solutions. *Prev Nutr Food Sci*. 2015;20:102-9.
- [174] Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lericri CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci Technol* 2001;11:340-6.
- [175] Kim MJ, Kim CY, Park IS. Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chem* 2005;89:181-4.