



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**«Πράσινη μικροενθυλάκωση πολυφαινολών από υποπροϊόντα 7
ποικιλιών μήλου (*Malus domestica*) σε β-HD κυκλοδεξτρίνη »**

Πτυχιακή εργασία

Ζαρογιάννης Σπύρος

Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καραθάνος Βάϊος, Καθηγητής Φυσικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μουρτζίνος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής στον Τομέα Επιστήμης &
Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονική Σχολή του Α.Π.Θ.

Χίου Αντωνία, Επίκουρος Καθηγήτρια στη Χημεία Τροφίμων, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο

Αφιερώνεται στην οικογένεια

και στους φίλους μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από το φοιτητή του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, Ζαρογιάννη Σπύρο. Το πειραματικό μέρος έλαβε χώρα στο εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας & Βιοχημείας Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 υπό την επίβλεψη του κου Καραθάνου Β., Καθηγητή του Τμήματος.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Καραθάνο για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση καθώς και την ηθική υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που έδειξε στις ικανότητες μου. Η βοήθειά του και η φιλική του στάση καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής χρονιάς με βοήθησαν να ολοκληρώσω με επιτυχία την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Αντωνίου που με εμπιστεύθηκε για τη συνέχιση της ήδη υπάρχουσας έρευνας που είχε ξεκινήσει, για την συνεργασία που είχαμε όλο αυτό τον καιρό, για τις συμβουλές στη συγγραφή της εργασίας, για την εκπαίδευση στις πειραματικές πορείες και το χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου αλλά και τους εξωτερικούς συνεργάτες για το πολύ θερμό κλίμα και την επικοινωνία που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Τέλος, τους γονείς μου και την οικογένειά μου που στήριξαν ολοκληρωτικά τις σπουδές μου με κάθε δυνατό τρόπο.

Ο Ζαρογιάννης Σπύρος,

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	9
Abstract	11
Κατάλογος εικόνων.....	14
Κατάλογος πινάκων	15
Κατάλογος σχημάτων	16
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ.....	20
1.1. Εισαγωγή	20
1.2. Μέθοδοι ενθυλάκωσης	22
1.2.1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)	23
1.2.2. Ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/spray chilling).....	23
1.2.3. Περιστρεφόμενος δίσκος (Spinning disk)	24
1.2.4. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (Lyophilisation/freeze-drying)	24
1.2.5. Εξώθηση ή εκβολή (extrusion).....	27
1.2.6. Ρευστοποιημένη στοιβάδα (fluidized bed)	27
1.2.7. Προσρόφηση (absorption).....	28
1.2.8. Συγκρυστάλλωση (co-crystallization)	28
1.2.9. Συγκατακρήμνιση (coacervation).....	28
1.3. Μέσα εγκλεισμού	28
1.3.1. Πρωτεΐνες	29
1.3.2. Λιποσώματα	29
1.3.3. Υδατάνθρακες.....	30
1.3.3.1. Τροποποιημένο άμυλο (modified starch-MS).....	30
1.3.3.2. Μαλτοδεξτρίνη και φυτικά κόμματα	31
1.3.3.3. Κυκλοδεξτρίνες.....	32

1.4.	Κυκλοδεξτρίνες και λιποσώματα: διπλή ενθυλάκωση συστατικών.....	34
1.5.	Επιβεβαίωση επιτυχούς εγκλεισμού.....	36
1.5.1.	Διαφορική Σαρωτική θερμιδομετρία (DSC)	36
1.5.1.1.	Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης.....	38
1.5.2.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	40
1.5.2.1.	Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης.....	42
1.5.3.	Περίθλαση Ακτινών Χ (XRD).....	43
1.5.3.1.	Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης.....	44
1.5.4.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία(IR).....	45
1.5.4.1.	Εφαρμογές της μεθόδου	46
2.	ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΕ ΦΥΤΑ.....	47
2.1.	Ενθυλάκωση σε φυτά με βιοδραστικό ενδιαφέρον	47
2.2.	Το φυτό Malus Domestica.....	49
2.2.1.	Γενικά	49
2.2.2.	Βοτανικά χαρακτηριστικά του μήλου (Malus Domestica).....	49
2.2.3.	Παραγωγή του μήλου (Malus Domestica)	51
2.2.4.	Ποικιλίες του μήλου (Malus Domestica)	51
2.2.5.	Χημικό περιεχόμενο του μήλου (Malus Domestica).....	53
2.2.5.1.	Μακροθρεπτικά συστατικά του μήλου (Malus Domestica)	54
2.2.5.2.	Μικροθρεπτικά συστατικά του μήλου (Malus Domestica)	55
2.3.	Ευεργετική δράση του μήλου (Malus Domestica)	58
2.4.	Υποπροϊόντα μήλου με βιοδραστικό ενδιαφέρον	59
3.	«ΠΡΑΣΙΝΟΣ» ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	61
3.1.	Εισαγωγή	61
3.2.	«Πράσινη» εκχύλιση-τεχνικές.....	63
3.3.	Μελέτες σχετικές με το περιεχόμενο των φυτικών υποπροϊόντων	66
	ΣΚΟΠΟΣ	69

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
1. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΛΟΥΔΑΣ ΜΗΛΟΥ ΣΕ B-HD- ΚΥΚΛΟΔΕΣΤΡΙΝΗ	71
1.1. Παραλαβή ξηρών δειγμάτων φλούδας μήλων.....	71
1.2. Εκχυλίσεις δειγμάτων φλούδας μήλου.....	71
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	74
2.1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	74
2.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1- διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH*).....	76
2.3. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών	79
2.4. Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP).....	83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	86
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	87
1.1. Αξιολόγηση ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	87
1.2. Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH	88
1.3. Αξιολόγηση της αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP	89
1.4. Αξιολόγηση ολικών φλαβονοειδών.....	90
2. Βελτιστοποίηση της εκχύλισης	92
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

Περίληψη

Οι φλούδες του μήλου, υπο-προϊόντα των μήλων, θεωρούνται μια φθηνή και πλούσια πηγή πολυφαινολών η οποία μπορεί να εκχυλιστεί και να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη προϊόντων που προάγουν την υγεία. Η ανάγκη για εκμετάλλευση αυτών προϊόντων και των ευεργετικών ιδιοτήτων τους έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον σε νέες μεθόδους παραλαβής των πολυφαινολών.

«Πράσινες» τεχνικές εκχύλισης χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάκτηση συστατικών με στόχο τη μείωση της τοξικότητας, τη μειωμένη κατανάλωση ενέργειας και την εξασφάλιση ασφαλών και υψηλής ποιότητας εκχυλισμάτων. Η γλυκερόλη θεωρείται ιδανική περίπτωση «πράσινου», μη-συμβατικού διαλύτη για την εκχύλιση πολυφαινολών καθώς είναι μη-τοξική, βιοδιασπώμενη και έχει ψηλό σημείο βρασμού. Για την ενίσχυση της παραλαβής των πολυφαινολών χρησιμοποιούνται και οι κυκλοδεξτρίνες. Είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση συστατικών στο εσωτερικό τους, δημιουργώντας σύμπλοκα εγκλεισμού, με στόχο την προστασία από αντιδράσεις οξείδωσης και την αύξηση της διαλυτότητάς τους.

Η διαδικασία της εκχύλισης βελτιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken λαμβάνοντας υπόψη τρεις διαφορετικές μεταβλητές: συγκέντρωση γλυκερόλης, συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασία. Τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς τέσσερις παραμέτρους: συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική ικανότητα, το περιεχόμενο σε ολικά φλαβονοειδή και την αναγωγική ικανότητα. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

Οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορίστηκαν με $C_{CD}=7-13\%$, $C_{gl}=30-60\%$ και $T=80^{\circ}\text{C}$, δηλαδή οι εκχυλίσεις 8 και 14 ήταν οι ιδανικές για τις μέγιστες προβλεπόμενες τιμές της παραμέτρου Y_{tp} .

Η γλυκερόλη μπορεί να είναι αποδοτική ως ένας εναλλακτικός πράσινος διαλύτης για την εκχύλιση των πολυφαινολών με μεγαλύτερη απόδοση από το νερό, όταν η μεθανόλη ή η αιθανόλη θα πρέπει να αποφευχθούν.

Ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ πολυφαινολών και κυκλοδεξτρίνων, γνωστή και ως μοριακή ενθυλάκωση, προσφέρει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές εκχυλίσσεις, όπως αυξημένη διαλυτότητα στο νερό, προστασία από οξείδωση και προστασία από αποσύνθεση που προκαλείται από φως και θέρμανση.

Λέξεις κλειδιά: [κυκλοδεξτρίνες, πολυφαινόλες, ενθυλάκωση, πράσινη εκχύλιση, φλούδες μήλων]

Abstract

Apple peels, apple by-products, seem to be a low-cost and rich source of polyphenols, that can be extracted and used for the development of other products, that can promote health. The need of exploitation of these products and their beneficial properties has turn the research interest to new methods of receiving polyphenols.

«Green» extraction techniques are used widely for the recovery of ingredients, in order to achieve reduced toxicity and energy consumption and ensure the safety and high quality of extracts. Glycerol could be considered as an ideal green non-conventional solvent for the extraction of polyphenols as it is non-toxic, biodegradable and has a high boiling point. Cyclodextrins was also employed as an enhancer for the extraction of polyphenols. They are cyclic oligosaccharides and can act as host molecules in forming inclusion complexes with ingredients aiming to protect from oxidation reactions and increase their solubility.

The process was optimized by implementing a central composite (Box-Behnken) experimental design, taking into consideration the following independent variables: glycerol concentration (C_{gl}), cyclodextrin concentration (C_{CD}) and temperature (T). The evaluation of the extraction model was based on four responses: total phenolic content, antioxidant ability, total flavonoid content and reductive capacity. The following conclusions were drawn:

The maximum desirability was achieved with $C_{CD}=7-13\%$, $C_{gl}=30-60\%$ και $T=80^{\circ}\text{C}$. Under these conditions, the maximum values estimated were under the extraction models 8 and 14.

Overall, it appears that glycerol can be effective as an alternative green solvent for the extraction of polyphenols with improved efficiency than water when methanol or ethanol have to be avoided.

The formation of inclusion complexes between polyphenols and cyclodextrins, known as molecular encapsulation, does provide certain advantages over other

conventional solvent-extraction processes, such as increased water solubility, protection against oxidation and protection against decomposition caused by heat or light.

Keywords: [cyclodextrins, polyphenols, encapsulation, green extraction, apple peels]

Κατάλογος εικόνων

Εικ.1. Σχηματική αναπαράσταση δυο αντιπροσωπευτικών τύπων ενθυλάκωσης.....	σ.19
Εικ.2. (Α) Σχηματική απεικόνιση της διπλοστοιβάδας ενός λιποσώματος και (Β) ο εγκλεισμός πυρήνα μέσα στην υδατική φάση του λιποσώματος.....	σ.29
Εικ.3. Σχηματική απεικόνιση της: (1) α-κυκλοδεξτρίνης, (2) β-κυκλοδεξτρίνης, (3) γ-κυκλοδεξτρίνης	σ.31
Εικ.4. Χημική δομή β-κυκλοδεξτρίνης	σ.32
Εικ.5. Δομή κάποιων αντιοξειδωτικών μύλου	σ.56
Εικ.6. Μηχανισμός δράσης DPPH	σ.75
Εικ.7. Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων	σ.78
Εικ.8. Αρχή μεθόδου FRAP	σ.82

Κατάλογος πινάκων

Πίν.1: Διαστάσεις α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης	σ.32
Πίν.2: Παγκόσμια παραγωγή μήλων το 2008	σ.51
Πίν.3: Διατροφική αξία μήλου, ωμού, με τη φλούδα	σ.53
Πίν.4: Πειραματικές τιμές των μεταβλητών των εκχυλίσεων	σ.71
Πίν.5: Αποτελέσματα μετρήσεων του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος/g ξηρής φλούδας μήλου.....	σ.83
Πίν.6: Αποτελέσματα μετρήσεων της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg Trolox /g ξηρής φλούδας μήλου	σ.84
Πίν.7: Αποτελέσματα μετρήσεων της αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg ασκορβικού οξέος/g ξηρής φλούδας μήλου	σ.85
Πίν.8: Αποτελέσματα μετρήσεων των ολικών φλαβονοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης/g ξηρής φλούδας μήλου	σ.86
Πίν.9: Αποτελέσματα μετρήσεων των ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης /g ξηρής φλούδας μήλου	σ.87
Πίν.10: Πολυωνυμική εξίσωση για την παράμετρο TFn (ολικά φλαβονοειδή).....	σ.95
Πίν.11: Πολυωνυμική εξίσωση για την παράμετρο DPPH (ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο).....	σ.95
Πίν.12: Πολυωνυμική εξίσωση για την παράμετρο TP (ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο).....	σ.96

Κατάλογος σχημάτων

Σχ.1: Διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού	σ.25
Σχ.2: Μεταβολές που μπορούν να παρατηρηθούν με τη χρήση της Διαφορική Θερμιδομετρίας Σάρωσης	σ.36
Σχ.3: Θερμογράφημα ενός φαρμάκου στο οποίο παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες T_o , T_e και T_m	σ.38
Σχ.4: Προσδιορισμός του χρόνου επαγωγής (IP) με χρήση της διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε ισόθερμες συνθήκες	σ.39
Σχ.5: Ακτινοδιάγραμμα περίθλασης ακτινών X ουσίας	σ.43
Σχ.6: Ακτινοδιάγραμμα β-CD (1), p-ABA (2) και συμπλόκου β-CD – p-ABA	σ.44
Σχ.7: Αριθμός δημοσιευμένων ερευνών για τα φυτικά προϊόντα και τις πιθανές χρήσεις τους από την βάση δεδομένων PubMed	σ.67
Σχ.8: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.....	σ.74
Σχ.9: Καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τα ισοδύναμα Trolox.....	σ.77
Σχ.10: Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης, με AcAc ($\mu\text{g OΦΛ/g}$).....	σ.80
Σχ.11: Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης, χωρίς AcAc ($\mu\text{g OΦΛ/g}$ με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B).....	σ.81
Σχ.12: Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος (Ascorbic acid, AA) mg.....	σ.76
Σχ.13: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan ..	σ.94
Σχ.14: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan	σ.94

- Σχ.15: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan.....σ.95
- Σχ.16: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chiefσ.95
- Σχ.17: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chief.....σ.96
- Σχ.18: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chief.....σ.96
- Σχ.19: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Jonathanσ.97
- Σχ.20: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Jonathan.....σ.97
- Σχ.21: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chief.....σ.98
- Σχ.22: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chief..... σ.98
- Σχ.23: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chiefσ.99
- Σχ.24: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathanσ.99
- Σχ.25: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathan.....σ.100
- Σχ.26: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathan.....σ.100
- Σχ.27: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief.....σ.101

Σχ.28: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief.....σ.101

Σχ.29: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief.....σ.102

Σχ.30: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief.....σ.102

Σχ.31: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief.....σ.103

Σχ.32: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief.....σ.103

Σχ.33: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan.....σ.104

Σχ.34: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan.....σ.104

Σχ.35: Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan.....σ.105

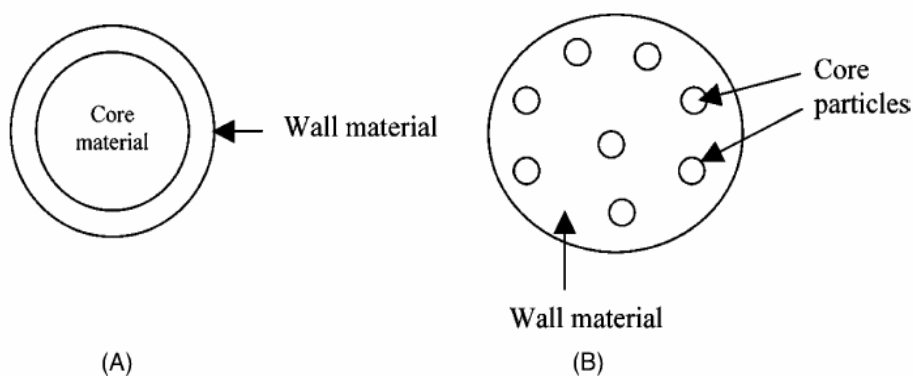
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ

1.1. Εισαγωγή

Η μικροενθυλάκωση, αναπτύχθηκε περίπου πριν από 60 χρόνια, ορίζεται ως μια τεχνολογία εγκλεισμού στερεών, υγρών, ή αέριων υλικών σε ένα φορέα εγκλεισμού, ο οποίος μπορεί να απελευθερώνει το περιεχόμενό του με ελεγχόμενο ρυθμό υπό καθορισμένες συνθήκες. Αυτά τα στοιχεία ενσωματώνονται στο υλικό επένδυσης και το παραγόμενο προϊόν χαρακτηρίζεται ως κάψουλα, όπου το μέγεθός της, η δομή της και η μορφή της εξαρτώνται από τα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της (Desai & Park, 2005, Vilstrup et al., 2001).

Τα εγκλεισμένα υλικά μπορεί να είναι απομονωμένα μόρια ή ένα μίγμα μορίων, τα οποία ονομάζονται πυρήνας, συμπλήρωμα, ενεργή ή εσωτερική φάση, καθώς και φάση ωφέλιμου φορτίου, ενώ ο παράγοντας ενθυλάκωσης καλείται επένδυση, μεμβράνη, κέλυφος, εξωτερικό κάλυμμα, κάψουλα, υλικό μεταφοράς, εξωτερική φάση ή μήτρα, το οποίο μπορεί να προέρχεται από σάκχαρα, κόμμεα, πρωτεΐνες, φυσικούς και τροποποιημένους πολυσακχαρίτες, λιπίδια και συνθετικά πολυμερή (Gibbs et al., 1999, Nedovic et al., 2011, Mozafari et al., 2006). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται δυο παραδείγματα αρχιτεκτονικής μικροκάψουλας.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση δυο αντιπροσωπευτικών τύπων ενθυλάκωσης. Όπου core material/practices: πυρήνας/εγκλεισμένα μόρια και wall material: πυρήνας (Desai & Park, 2005)

Σκοπός της ενθυλάκωσης είναι η προστασία της εσωτερικής φάσης από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η επίδραση του φωτός, η υγρασία, η οξείδωση και η θέρμανση (Shahidi & Han, 1993). Στη βιομηχανία τροφίμων βρίσκει εφαρμογή σε αρωματικά συστατικά, αιθέρια έλαια, προβιοτικά, γλυκαντικά, μέταλλα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, ένζυμα, ιχνοστοιχεία, μικροοργανισμοί, χρωστικές ουσίες και σταθεροποιητές. Οι λόγοι για τους οποίους η μικροενθυλάκωση βρίσκει εφαρμογή ευρέως, είναι οι εξής: (Betrolini et al., 2001, Schrooyen et al, 2001, Desai & Park, 2005, Mourtzinou et al., 2007).

1. Προστασία του πυρήνα με τη μείωση της αντιδραστικότητάς του με το εξωτερικό περιβάλλον
2. Μείωση της μεταφοράς του στο εξωτερικό περιβάλλον
3. Αύξηση του χρόνου ζωής
4. Τροποποίηση των αρχικών του ιδιοτήτων
5. Ελεγχόμενη απελευθέρωσή του σε βάθος χρόνου
6. Διαχωρισμός συστατικών
7. Επικάλυψη δυσάρεστης γεύσης και οσμής
8. Αύξηση διαλυτότητας συστατικών
9. Προστασία από μικροβιολογικές επιμολύνσεις
10. Μετατροπή σε στερεή σκόνη ουσιών, που βρίσκονται σε στερεή κατάσταση, με αποτέλεσμα τη μεταφορά τους και την προσθήκη τους σε τρόφιμα
11. Μείωση της παραγωγής τοξικών προϊόντων λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων

Για πολλά χρόνια ο μικροεγκλεισμός χρησιμοποιούταν από τις φαρμακευτικές εταιρίες ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η σταθερότητα των φαρμάκων και να ρυθμίζεται η αποδέσμευσή τους, να ελαχιστοποιούνται οι παρενέργειες των φαρμάκων και να καλύπτεται η πικρή γεύση κάποιων φαρμακευτικών ουσιών. Ωστόσο, η μέθοδος δεν ήταν τόσο διαδεδομένη στις βιομηχανίες τροφίμων εξαιτίας του υψηλού κόστους παραγωγής. Μετά την ανακάλυψη νέων, πιο οικονομικών τεχνικών και υλικών, τα τρόφιμα με ενσωματωμένα εγκλεισμένα δραστικά συστατικά έχουν αυξηθεί ραγδαία με στόχο την βελτίωση της θρεπτικής τους αξίας. (Gibbs et al., 1999, Kuang et al., 2010).

1.2. Μέθοδοι ενθυλάκωσης

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης, οι οποίες γενικά περιλαμβάνουν την παρασκευή γαλακτώματος του συστατικού ως μέσου ενθυλάκωσης ακολουθούμενη από ταχεία ξήρανση. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από την τελική χρήση του προϊόντος, από τις ιδιότητες του συστατικού που θα εγκλειστεί, από το κόστος παραγωγής, από το βαθμό σταθερότητας που απαιτείται κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία του καθώς και από τις απαιτούμενες ιδιότητες απελευθέρωσης.

Ανάλογα με την τεχνική εγκλεισμού τα εγκλεισμένα προϊόντα αποκτούν διαφορετικά σχήματα (φίλμ, σφαίρες, ακανόνιστα σωματίδια) και διαφορετική δομή (πορώδη ή συμπαγή, άμορφη, κρυσταλλική ή υαλώδη) που θα επηρεάσουν τη διάχυση των ενθυλακωμένων συστατικών και συνεπώς τη σταθερότητα του τροφίμου κατά την αποθήκευση (Madene et al., 2006, Gibbs et al., 1999, Zeller & Saleeb, 1998).

Οι πιο γνωστές μέθοδοι ενθυλάκωσης που περιγράφονται στη βιβλιογραφία διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

Χημικές Μέθοδοι:

- Σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complex)
- Συγκρυστάλλωση (co-crystallization)
- Προσρόφηση (adsorption)
- Συγκατακρήμνιση (coacervation)

Μηχανικές Μέθοδοι

- Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)
- Ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/spray chilling)
- Περιστρεφόμενος δίσκος (spinning disk)
- Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (lyophilisation/freeze-drying)
- Εξώθηση ή εκβολή (extrusion)

- Ρευστοποιημένη στοιβάδα (fluidized bed) (Παραμέρα, 2011)

1.2.1. Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

Η ξήρανση με ψεκασμό χρησιμοποιείται ευρέως ως τεχνική εγκλεισμού, κυρίως για αρωματικές ενώσεις. Είναι μια αξιόπιστη και αποδοτική μέθοδος με επαναληψιμότητα και δυνατότητα αναβάθμισης. Ιδανικότερα μέσα εγκλεισμού, για αυτήν την τεχνική, θεωρούνται αυτά που έχουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, μικρό ιξώδες και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες (π.χ. τροποποιημένο άμυλο, μαλτοδεξτρίνες, αραβικό κόμμι) (Año et al., 2011, Paramera et al., 2011).

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής της ακόμα και σε θερμοευαίσθητες ουσίες, αφού τα αρωματικά συστατικά παραμένουν αναλλοίωτα παρά τις υψηλές θερμοκρασίες της συσκευής (συνήθως 135°C). Αυτό οφείλεται στο ότι πρώτον, η εξάτμιση του νερού από την επιφάνεια των σταγονιδίων διατηρεί τη θερμοκρασία κάτω από 100°C και δεύτερον, ο χρόνος έκθεσης στην υψηλή θερμοκρασία είναι λίγα δευτερόλεπτα. Επίσης, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον εγκλεισμό τόσο υδατοδιαλυτών όσο και λιποδιαλυτών ουσιών (Fang et al., 2011, Mourtzinou et al., 2007, Ραπτοπούλου, 2011).

1.2.2. Ψύξη με ψεκασμό (spray cooling/spray chilling)

Είναι η μέθοδος εγκλεισμού με το μικρότερο κόστος και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εγκλεισμό ενός μεγάλου αριθμού οργανικών και ανόργανων αλάτων όπως, επίσης, και δομικών συστατικών των τροφίμων, ενζύμων, αρωματικών συστατικών, και άλλων λειτουργικών συστατικών για την αύξηση της σταθερότητάς τους στη θέρμανση καθώς και για την μετατροπή υγρών, υδρόφιλων συστατικών σε σκόνη. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται, επίσης, ικανοποιητικός ρυθμός απελευθέρωσης συστατικών σε ένα μεγάλο αριθμό εμπορικών προϊόντων (Mourtzinou et al., 2007).

Στην ψύξη με ψεκασμό, το προς ενθυλάκωση υλικό αναμιγνύεται με τον φορέα και ψεκάζεται με κρύο ή διατηρημένο σε απλή ψύξη αέρα, σε αντίθεση με το θερμό αέρα στην περίπτωση της ξήρανσης με ψεκασμό (Risch et al., 1995). Διαφέρει από τις

υπόλοιπες, αφού δεν περιλαμβάνει πραγματική ενθυλάκωση καθώς ένας σημαντικός αριθμός μορίων συγκρατούνται στην επιφάνεια του μέσου και η απελευθέρωση ξεκινά όταν το ενθυλακωμένο υλικό έρχεται σε επαφή με το τρόφιμο. Χρησιμοποιείται συνήθως για την ενθυλάκωση θειικού σιδήρου, βιταμινών, μεταλλικών ιόντων ή οργανικών οξέων (Paramera et al., 2011).

1.2.3. Περιστρεφόμενος δίσκος (Spinning disk)

Η τεχνική του περιστρεφόμενου δίσκου περιλαμβάνει το σχηματισμό εναιωρήματος σωματιδίων “πυρήνα” μέσα σε υγρό επικάλυψης και τη διέλευση του εναιωρήματος μέσα από περιστρεφόμενο δίσκο, υπό συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό μεμβράνης επικάλυψης, μικρότερης σε πάχος από το υλικό “πυρήνα” (Sparks & Jacobs, 1999).

1.2.4. Λυοφιλίωση ή ξήρανση με κατάψυξη (Lyophilisation/freeze-drying)

Η λυοφιλίωση είναι μια καθιερωμένη μέθοδος ξήρανσης, η οποία έχει την ιδιότητα να αυξάνει τη φυσική και χημική σταθερότητα ευπαθών προϊόντων για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Hafner et al., 2011). Η διεργασία της ξήρανσης με κατάψυξη είναι μια διαδικασία ξήρανσης, δηλαδή αφύγρανσης υγρών ή στερεών με υψηλή υγρασία τροφίμων. Η λέξη λυόφιλο αφορά το γεγονός της ταχύτατης ενυδάτωσης αυτών των προϊόντων. Λόγω του υψηλού κόστους, η διαδικασία βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην παραγωγή ακριβών προϊόντων όπως φάρμακα και ένζυμα.

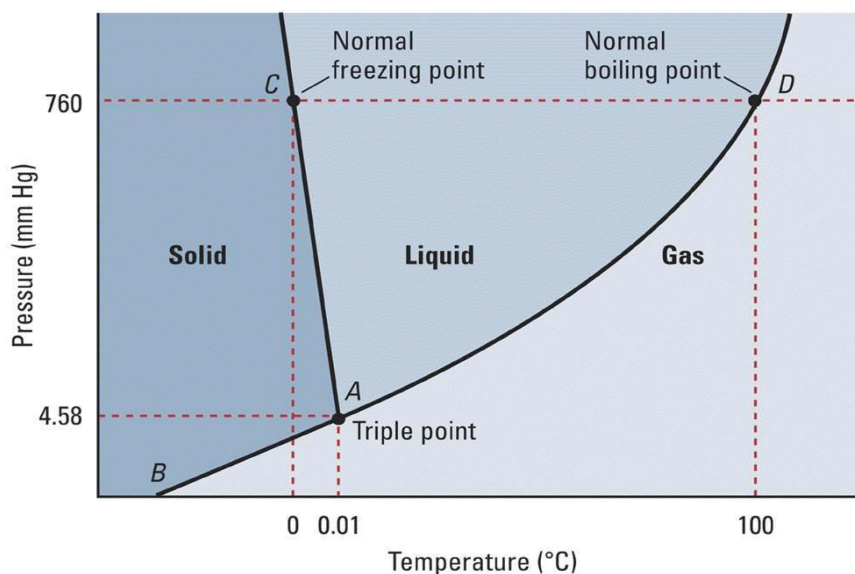
Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου οφείλονται στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στο προς αφυδάτωση τρόφιμο. Αυτός είναι ένας λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για τη βιομηχανική παραγωγή αυτών των προϊόντων. Κάποια από τα πλεονεκτήματα αναφέρονται παρακάτω:

- Διατήρηση της βιολογικής αξίας των προϊόντων (φαρμάκων, ενζύμων, τροφίμων)
- Διατήρηση των βιταμινών των τροφίμων

- Διατήρηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τροφίμων όπως η γεύση, το άρωμα και το χρώμα
- Δυνατότητα παραγωγής νέων δομών και προϊόντων
- Διατήρηση αρχικού όγκου (δεν παρατηρείται συρρίκνωση-κατάρρευση δομής)
- Δημιουργία μεγάλου πορώδους
- Ταχεία επανυδάτωση των αποξηραμένων προϊόντων (λόγω του μεγάλου πορώδους)
- Ταχεία διεξαγωγή χημικών και άλλων αντιδράσεων (λόγω μεγάλου πορώδους και της μεγάλης ειδικής επιφάνειας) στα αποξηραμένα τρόφιμα

Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το μεγάλο οικονομικό κόστος κυρίως σε επενδύσεις και εξοπλισμό και το μεγάλο ενεργειακό κόστος (κατάψυξη προϊόντων, κενό, κατάψυξη για την εξάχνωση, θέρμανση). Επίσης, τα προϊόντα όταν επανυδατώνονται είναι υδαρή και δεν αποκτούν την αρχική υφή/μηχανικές ιδιότητες του νωπού προϊόντος.

Η μέθοδος προκύπτει από την εξάχνωση του πάγου, με αποτέλεσμα το νερό που περιέχεται στα τρόφιμα να μεταβαίνει από τη στερεά του κατάσταση (πάγος) κατευθείαν στην αέρια (υδρατμός) χωρίς να περάσει από την υγρή. Η μετατροπή αυτή είναι δυνατή μόνο σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, όπως φαίνεται παρακάτω στο διάγραμμα φάσεων του νερού στο οποίο συνυπάρχουν και οι τρεις φάσεις στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Διάγραμμα φάσεων του καθαρού νερού.. Τριπλό σημείο νερού ($T=0,01^{\circ}\text{C}$ και $P=6,104\text{ mbar}$ ή $4,58\text{ mm Hg}$) (schools.birdville.k12.tx.us)

Για να επιτευχθεί η ξήρανση με κατάψυξη, είναι απαραίτητη η ύπαρξη κάποιων προϋποθέσεων:

- Κατάψυξη των προϊόντων σε θερμοκρασία $< -40^{\circ}\text{C}$ για να επιτευχθεί καλύτερη ποιότητα των αποξηραμένων τροφίμων
- Εφαρμογή χαμηλής πίεσης. Δημιουργία κενού και πίεσης χαμηλότερης τουλάχιστον από αυτήν του τριπλού σημείου ($4,58\text{ mm Hg}$)
- Παροχή στο προϊόν μεγάλου ποσού ενέργειας ούτως ώστε να πραγματοποιηθεί η εξάχνωση. Ενέργεια μπορεί να παρασχεθεί και από το περιβάλλον καθώς η διαφορά θερμοκρασίας του περιβάλλοντος (20°C) και ξηραντήρα (-40°C) είναι μεγάλη
- Αφαίρεση υδρατμών οι οποίοι δημιουργούνται εξαιτίας της εξάχνωσης. Ο πιο εύκολος τρόπος είναι η (επανα-)κατάψυξή τους σε ψυχόμενο θάλαμο
- Μικρός όγκος ή πάχος προϊόντος ούτως ώστε να επιτευχθεί καλύτερη μεταφορά θερμότητας σε όλη την επιφάνειά του (Karathanos et al., 2011)

1.2.5. Εξώθηση ή εκβολή (extrusion)

Η ενθυλάκωση με εξώθηση χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την ενθυλάκωση ασταθών και πτητικών αρωμάτων σε υαλώδη υποστρώματα υδατανθρακικής φύσης. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των ευαίσθητων στην οξείδωση αρωμάτων, όπως των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών, καθώς τα αέρια της ατμόσφαιρας διαχέονται με πολύ βραδύ ρυθμό μέσω των υδρόφιλων, υαλωδών υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αδιαπέραστου τείχους στο οξυγόνο. Ειδικότερα, στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων η επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης μπορεί να φθάσει τα 5 χρόνια, σε σύγκριση με εκείνα που έχουν προκύψει με ξήρανση με ψεκασμό (διάρκεια ζωής 1 έτος) ή με τα ξηραίνόμενα χωρίς την εφαρμογή μικροενθυλάκωσης έλαια (διάρκεια ζωής 6 μήνες) (Bencezdi & Blake, 1999).

1.2.6. Ρευστοποιημένη στοιβάδα (fluidized bed)

Η τεχνική είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην εφαρμογή ενός ομοιόμορφου υλικού επικάλυψης πάνω σε στερεά σωματίδια. Τα μέσα εγκλεισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, γαλακτοματοποιητές κ.τ.λ. Στην μέθοδο αυτή, τα υλικά επικάλυψης ρευστοποιούνται με τη χρήση θερμού αέρα σε θάλαμο υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η θερμοκρασία του θαλάμου θα πρέπει να βρίσκεται λίγο πιο πάνω από αυτή του σημείου τήξης του υλικού επικάλυψης ούτως ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων. Στη συνέχεια το τετηγμένο υλικό ψεκάζεται πάνω από τα σωματίδιο, δημιουργώντας ένα στρώμα επικάλυψης. Τέλος, το προϊόν ψύχεται και ξηραίνεται. Διάφορες παράμετροι, όπως το υλικό επικάλυψης, ο ρυθμός και η πίεση αέρα κατά τον ψεκασμό, και η θερμοκρασία/πίεση του αέρα ρευστοποίησης καθορίζουν τον τύπο και την ποιότητα των εγκλεισμένων σωματιδίων (Abbas et al, 2014, Gibbs et al, 1999; Guignon, 2002). Ένας μεγάλος αριθμός ουσιών έχουν εγκλειστεί με τη μέθοδο αυτή όπως το ασκορβικό οξύ (Knezevic et al., 1998).

1.2.7. Προσρόφηση (absorption)

Αποτελεί τη μέθοδο κατά την οποία το συστατικό προσροφάται στην επιφάνεια του υποστρώματος. Η προσρόφηση αποτελεί ιδιότητα ορισμένων μόνο υποστρωμάτων τα οποία διαθέτουν πόρους ικανούς να προσροφήσουν πτητικά συστατικά. Τέτοια υποστρώματα είναι η σακχαρόζη και το άμυλο καλαμποκιού μετά από κατάλληλη επεξεργασία. Έτσι επιτρέπεται η ελεγχόμενη απελευθέρωση των συστατικών αυτών αλλά και η επιλεκτική απομάκρυνση ορισμένων άλλων (Mourtzinou et al., 2007).

1.2.8. Συγκρυστάλλωση (co-crystallization)

Μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιείται σακχαρόζη ως μέσο εγκλεισμού για την ενθυλάκωση του πυρήνα. Η σακχαρόζη βρίσκεται σε μορφή σιροπιού διατηρημένη σε υψηλή θερμοκρασία ούτως ώστε να αποφευχθεί η κρυστάλλωση. Έπειτα, συγκεκριμένη ποσότητα πυρήνα προστίθεται στο σιρόπι με συνεχόμενη ανάδευση, με τελικό αποτέλεσμα την κρυστάλλωση των μορίων της σακχαρόζης και του πυρήνα. Τέλος, τα ενθυλακωμένα προϊόντα στη συνέχεια ξηραίνονται και μαζεύονται σε ομοιόμορφο σχήμα (Desai & Park, 2005).

1.2.9. Συγκατακρήμνιση (coacervation)

Η τεχνική περιλαμβάνει την απομόνωση ενός ή περισσότερων υδροκολλοειδών από το αρχικό διάλυμα και στη συνέχεια εναπόθεση των κατακρημνισμάτων υπό μορφή μεμβράνης γύρω από τη βιοδραστική ουσία που βρίσκεται υπό τη μορφή εναιωρήματος ή γαλακτώματος στο ίδιο μέσο. Το πιο σημαντικό από τα υδροκολλοειδή συστήματα που χρησιμοποιούνται στην τεχνική αυτή είναι το σύστημα ζελατίνης/τραγακανθικού κόμμεος. Η τεχνική θεωρείται ιδιαίτερα ακριβή (Gouin et al., 2004).

1.3. Μέσα εγκλεισμού

Υπάρχουν πολλά υλικά τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα εγκλεισμού (encapsulant), καθένα από τα οποία έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα μέσα εγκλεισμού ποικίλλουν και περιλαμβάνουν κυρίως υδατάνθρακες (άμυλο,

κυκλοδεξτρίνες, μαλτοδεξτρίνη, κυτταρίνη), κόμμεα, πρωτεΐνες ή λιπίδια (λιποσώματα), συνθετικά πολυμερή αλλά και ενώσεις που αποτελούνται από συνδυασμό των παραπάνω. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν ένα ή περισσότερα διαφορετικά είδη υλικών. Η επιλογή του μέσου ενθυλάκωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: τις απαιτήσεις του τελικού προϊόντος, τη φύση του ενθυλακωμένου συστατικού, την τεχνική εγκλεισμού, το κόστος, πιθανή έγκριση από τον FDA. Το μέσο εγκλεισμού που θα επιλεγεί δεν πρέπει να αντιδρά με το εγκλεισμένο συστατικό, θα πρέπει να βρίσκεται σε πρακτική μορφή, να έχει χαμηλό ιξώδες σε υψηλές συγκεντρώσεις, να έχει καλές γαλακτωματοποιητικές-σταθεροποιητικές ικανότητες και να απελευθερώνει την ενθυλακωμένη ουσία σε επιθυμητό χρόνο και τόπο (Madene et al., 2006, Gibbs et al., 1999, Zeller & Saleeb, 1998).

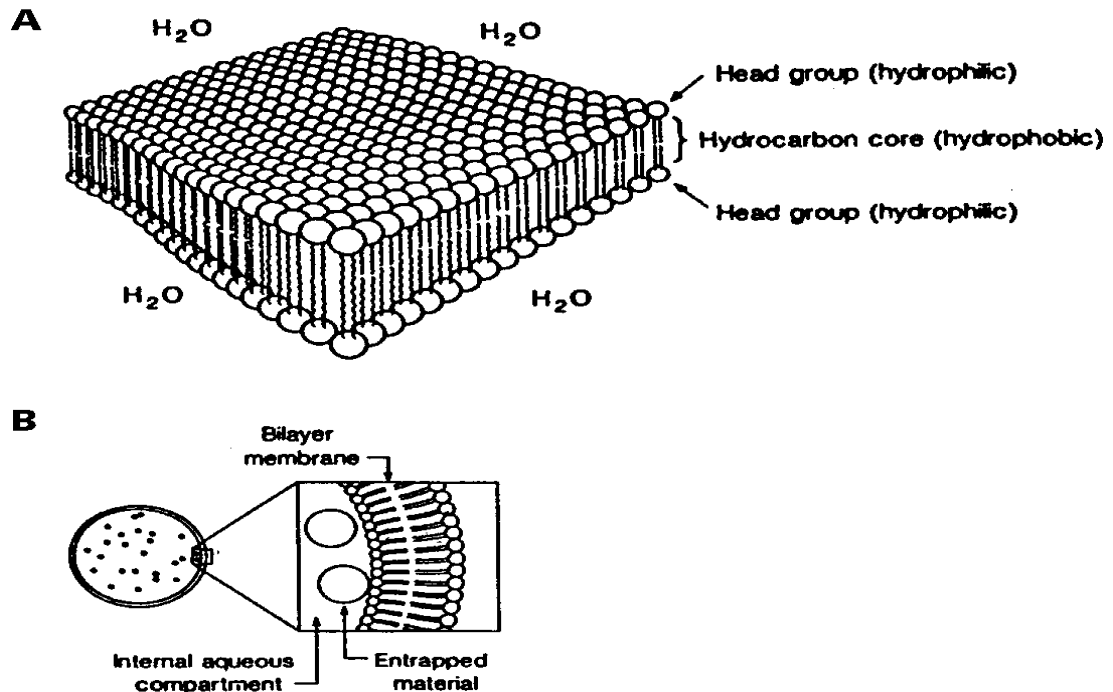
1.3.1. Πρωτεΐνες

Χρησιμοποιούνται κυρίως πρωτεΐνες γάλακτος και πρωτεΐνες σόγιας. Έχουν αμφιφιλικές ιδιότητες, μεγάλο MB, ευκινησία στη μοριακή τους αλυσίδα και εξαιρετικές λειτουργικές ιδιότητες όπως διαλυτότητα, ιξώδες και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες. Χρησιμοποιούνται επίσης οι πολυπεπτόνες και τα παράγωγα ζελατίνης, τα οποία σχηματίζουν σταθερά γαλακτώματα αλλά έχουν μικτή διαλυτότητα στο ψυχρό νερό, αντιδρούν με καρβονύλια και έχουν υψηλό κόστος (Paramera et al., 2011).

1.3.2. Λιποσώματα

Είναι κολλοειδή σωματίδια που προέρχονται από την αναδίπλωση των λιποειδικών διπλοστοιβάδων, με αποτέλεσμα στο εσωτερικό τους να εγκλωβίζεται νερό. Έτσι, η μεμβράνη που δημιουργείται μπορεί να διαχωρίσει δυο υδατικά διαμερίσματα (Nelsson et al., 2007). Εξαιτίας της ύπαρξης αυτών των στοιβάδων, τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δέσμευση και την απελευθέρωση υδρόφιλων, λιπόφιλων και αμφίφιλων μορίων. Ο κύριος μηχανισμός για το σχηματισμό λιποσωμάτων είναι η αλληλεπίδραση των φωσφολιποειδών και των μορίων νερού. Το πυρηνικό υλικό μπορεί είτε να εγκλειστεί στην κοιλότητα του λιποσώματος τη στιγμή του σχηματισμού του είτε να προσκολληθεί στην επιφάνειά του ή ενδομεμβρανικά (Fang & Bhandari, 2010). Η χρήση της τεχνικής αυτής στη βιομηχανία τροφίμων είναι ιδιαίτερα περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης της ενθυλάκωσης, το υψηλό

κόστος και της αυξημένης πιθανότητας «διαφυγής» υδατοδιαλυτών εγκλεισμένων μορίων κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Zuidam et al., 2010). Αναπαράσταση λιποσώματος φαίνεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. (Α) Σχηματική απεικόνιση της διπλοστοιβάδας ενός λιποσώματος και (Β) ο εγκλεισμός πυρήνα μέσα στην υδατική φάση του λιποσώματος (Reineccius, 1995)

1.3.3. Υδατάνθρακες

1.3.3.1. Τροποποιημένο άμυλο (modified starch-MS)

Το άμυλο είναι ένας ομοπολυσακχαρίτης που αποτελείται από πολλά μόρια γλυκόζης και περιέχεται στις πατάτες και στα δημητριακά. Οι κόκκοι του αμύλου είναι αδιάλυτοι στο ψυχρό νερό αλλά σε θερμό νερό σχηματίζουν ένα πηκτό διάλυμα. Ως τροποποίηση του αμύλου ορίζουμε, την ήπια αποικοδόμηση ή φυσική κατεργασία ή αντίδραση των $-OH$ με διάφορες ουσίες (οξικό ανυδρίτη, οξικό βινύλιο, φωσφορικά άλατα) με στόχο τη μεταβολή και βελτίωση των φυσικοχημικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του φυσικού αμύλου. Παραδείγματα τροποποιημένου αμύλου είναι τα εξής:

- Δεξτρίνες
- Λευκασμένο άμυλο

- Οξειδωμένο άμυλο
- Μερικώς φωσφορυλιωμένο άμυλο
- Υποκατεστημένο άμυλο (π.χ. εστεροποίηση με οκτενυλοηλεκτρικό ανυδρίτη)
- Άμυλο με σταυροειδείς δεσμούς (Nilsson et al., 2007; Mposkou et al., 2004)

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο εγκλεισμού στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί το οκτενυλο-ηλεκτρικό τροποποιημένο άμυλο. Η τροποποίηση του αμύλου έγκειται στην προσθήκη μιας λιπόφιλης ομάδας στην αλυσίδα του αμύλου. Η προσθήκη, λοιπόν, της οκτενυλο-ηλεκτρικής ομάδας τροποποιεί τον υδρόφιλο χαρακτήρα του αμύλου και αυξάνει τη γαλακτωματοποιητικές ικανότητά του. Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του αμύλου καθιστά το τροποποιημένο άμυλο ιδανικό για τη συγκράτηση των πτητικών συστατικών κατά την ξήρανση με ψεκασμό (Fernandes et al., 2014). Τέλος, ανήκει στην κατηγορία του ανθεκτικού αμύλου, δηλαδή είναι ανθεκτικό στην ενζυμική υδρόλυση του πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο κατά την πέψη του και μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου (Ai et al., 2013).

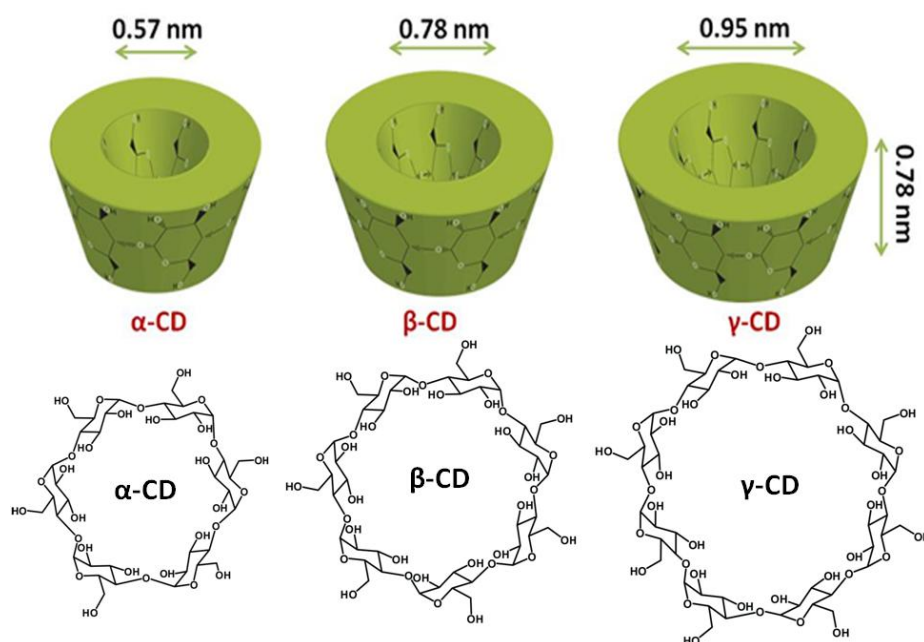
1.3.3.2. Μαλτοδεξτρίνη και φυτικά κόμμεα

Η μαλτοδεξτρίνη προέρχεται από μερική υδρόλυση του καλαμποκιού με οξέα ή ένζυμα και παρέχεται σε διάφορα ισοδύναμα δεξτρόζης (DE). Διατίθεται σε διάφορα MB αλλά δεν διαθέτει γαλακτωματοποιητικές ικανότητες και έχει χαμηλή συγκράτηση των πτητικών συστατικών. Τέλος, έχει χαμηλό ιξώδες, καλή διαλυτότητα και ενθυλακώνει κυρίως αρωματικές ενώσεις.

Τα κόμμεα είναι άγευστα, έχουν χαμηλό ιξώδες και γαλακτωματοποιητικές ικανότητες αλλά έχουν καλή συγκράτηση. Επίσης, έχουν υψηλή διαλυτότητα, είναι σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH και έχουν την ικανότητα σχηματισμού πηκτών. Εξαιτίας όμως του υψηλού κόστους, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τη μαλτοδεξτρίνη (Groppe et al., 2005; Mposkou et al., 2004).

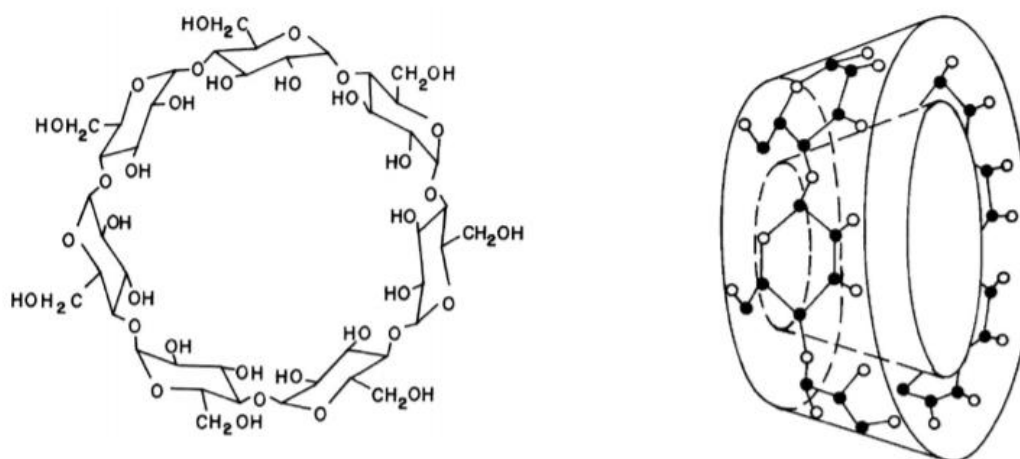
1.3.3.3. Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες προέρχονται από την ενζυμική υδρόλυση του αμύλου. Το ένζυμο γλυκοζυλοτρανσφεράση προέρχεται από μικροοργανισμούς ή φυτά και αποικοδομεί το άμυλο με ενδομοριακό σπάσιμο της αλυσίδας. Είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 6 (α-κυκλοδεξτρίνη), 7 (β-κυκλοδεξτρίνη) και 8 (γ-κυκλοδεξτρίνη) άτομα D-γλυκοπυρανόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με α(1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Παρακάτω δίνεται μια αναπαράσταση των τριών κυκλοδεξτρίνων στην Εικόνα 3:



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της: (1) α-κυκλοδεξτρίνη, (2) β-κυκλοδεξτρίνη, (3) γ-κυκλοδεξτρίνη (http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/images/Research_fig2.png)

Το μόριό τους σε κάθετη τομή μοιάζει με κόλouro κώνo. Όσο ο αριθμός των μονάδων γλυκοπυρανόζης αυξάνει τόσο αυξάνει και η διάμετρος του κώνου που σχηματίζει το μόριο της κυκλοδεξτρίνης. Το εσωτερικό της κοιλότητάς τους είναι σχετικά υδρόφοβο λόγω της παρουσίας των μεθυλενομάδων, ενώ η είσοδός τους είναι υδρόφιλη λόγω της παρουσίας πρωτοταγών και δευτεροταγών υδροξυλομάδων (Del Valle et al., 2004). Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η χημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης:



Εικόνα 4. Χημική δομή β-κυκλοδεξτρίνης (Looftsson, 2005)

Τα χαρακτηριστικά αυτά του μορίου δίνουν στην κυκλοδεξτρίνη την ικανότητα να δρα ως μόριο-ξενοδοχείο, σχηματίζοντας σύμπλοκα με μεγάλο αριθμό μορίων (Del Valle, 2004). Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals. Μόνο σχετικά μη πολικά μόρια, δηλαδή υδρόφοβα, κατάλληλου μεγέθους μπορούν να εισχωρήσουν στην κοιλότητά τους. Ωστόσο για να σχηματισθεί σύμπλοκο εγκλεισμού τις περισσότερες φορές αρκεί μόνο κάποιο μη πολικό μέρος του μορίου να εγκλωβιστεί στην κοιλότητα. Το μέγεθος, η χημική δομή και η πολικότητα του εγκλεισμένου μορίου επηρεάζουν κυρίως το σχηματισμό συμπλόκου. (Paramera et al., 2011). Οι διαστάσεις των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων κυκλοδεξτρίνων εμφανίζονται στον Πίνακα 1. Οι συγκεκριμένες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με μια ευρεία ποικιλία οργανικών συστατικών. Το μέγεθος της κοιλότητας επιτρέπει την εκλεκτική δέσμευση ορισμένων μορίων. Η β-κυκλοδεξτρίνη αποτελεί το πιο συνηθισμένο μέσω εγκλεισμού εξαιτίας της υψηλής ικανότητας που έχει να σχηματίζει σύμπλοκα και λόγω χαμηλού κόστους σε σχέση με την α- και γ-κυκλοδεξτρίνη (Mourtzinis et al., 2007, Del Valle et al., 2004).

Πίνακας 1. Διαστάσεις α-, β- και γ- κυκλοδεξτρίνης (Del Valle, 2005)

Τύπος κυκλοδεξτρίνης	Εσωτ. Διάμετρος (Å)	Εξωτ. Διάμετρος (Å)	Ύψος κόλουρου κώνου (Å)
α-κυκλοδεξτρίνη	4.7-5.3	14.6	7,9
β-κυκλοδεξτρίνη	6.0-6.5	15.4	7,9
γ-κυκλοδεξτρίνη	7.5-8.3	17.5	7,9

Η διαλυτότητα των α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνων στους 25°C είναι 145, 18.5 και 81.9 mg αντίστοιχα ανά 100 ml νερού. Η διαλυτότητα αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης, η διαλυτότητα αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός μεθυλίωσης. Η μέγιστη διαλυτότητα επιτυγχάνεται με τη μεθυλίωση των 2/3 των υδροξυλ-ομάδων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η τυχαίως μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη παρουσιάζει υδατοδιαλυτότητα >500 mg/mL. Ωστόσο, η διαλυτότητα μειώνεται όταν η μεθυλίωση ξεπερνά το μέγιστο βαθμό (Looftsson & Brewste, 1996, Looftsson et al., 2005). Ο σχηματισμός συμπλόκου, γενικά, μεταβάλλει τη διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης. Εάν το εγκλεισμένο μόριο είναι μη διαλυτό στο νερό, συχνά το σχηματισθέν σύμπλοκο έχει μικρότερη διαλυτότητα από το μόριο της κυκλοδεξτρίνης αλλά μεγαλύτερη από το μη εγκλεισμένο συστατικό (Mourtzinis et al., 2007).

1.4. Κυκλοδεξτρίνες και λιποσώματα: διπλή ενθυλάκωση συστατικών

Όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, τα δυο αυτά μέσα εγκλεισμού είναι κατάλληλα, το καθένα ξεχωριστά, για την ενθυλάκωση διαφορετικών συστατικών. Από τη μια, τα λιποσώματα έχουν τη δυνατότητα εγκλωβισμού υδρόφιλων, λιπόφιλων και αμφίφιλων μορίων αλλά περιορισμένη ικανότητα συγκράτησης λιποδιαλυτών μορίων στις εξωτερικές τους διπλοστοιβάδες. Από την άλλη, οι κυκλοδεξτρίνες αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα μη-υδατοδιαλυτών μορίων, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να στοχεύσουν φάρμακα σε βιολογικούς στόχους. Για να ξεπερασθούν τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου ξεχωριστά, δημιουργήθηκε η ιδέα της διπλής ενθυλάκωσης ουσιών. Έτσι, εάν ένα μη-υδατοδιαλυτό μόριο ενθυλακωθεί σε κυκλοδεξτρίνη, θα προκύψει υδατοδιαλυτό σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια θα μπορέσει να εγκλειστεί στην εσωτερική υδρόφιλη κοιλότητα των λιποσωμάτων (και όχι στη λιπιδική διπλοστοιβάδα

σε περίπτωση απουσία της κυκλοδεξτρίνης). Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται το ποσοστό του φαρμάκου-ουσίας που μπορεί να εγκλειστεί.

Ωστόσο, τα λιποσώματα που εγκλείουν σύμπλοκα ουσίας-κυκλοδεξτρίνης είναι λιγότερο σταθερά (όσον αφορά την μεμβρανική συνοχή) σε σχέση με τα λιποσώματα που εγκλείουν σκέτη την ουσία. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και των μορίων κυκλοδεξτρίνης μπορεί να καταλήξουν σε επαναδιοργάνωση της λιπιδικής μεμβράνης προκαλώντας γρήγορη απελευθέρωση του εγκλεισμένου μορίου. Επιπλέον, τα λιπίδια μπορεί να εισέλθουν στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης σχηματίζοντας σύμπλοκα εγκλεισμού, αντικαθιστώντας το φάρμακο, το οποίο αναγκαστικά θα απελευθερωθεί (Jessy Shaji & Sneha Iyer, 2014, Maestrelli et al., 2005, McCormack & Gregoriadis, 1994).

Τα τελευταία χρόνια έγιναν πολλές μελέτες πάνω στην διπλή ενθυλάκωση λιποσωμάτων και κυκλοδεξτρίνων. Οι McCormack και Gregoriadis (1994) δημιούργησαν σύμπλεγμα β-κυκλοδεξτρίνης ενωμένης με δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), ρετινόλη (R) και ρετινοϊκό οξύ σε συνδυασμό με λιποσώματα DVR (dehydration-rehydration vesicles). Οι Loukas et al. (1998) παρασκεύασαν σύμπλεγμα ινδομεθακίνης, αντιφλεγμονώδους ουσίας με β-κυκλοδεξτρίνης (βCyd) και ινδομεθακίνη / υδροξυπροπυλο- β - κυκλοδεξτρίνη (HPβCyd) σε πολυστιβαδικά λιποσώματα. Οι Fatouros et al. (2001), παρασκεύασαν σύμπλεγμα πρεδνιζολόνης / β-κυκλοδεξτρίνης και πρεδνιζολόνης / υδροξυπροπυλ – κυκλοδεξτρίνη σε λιποσώματα. Οι Salem et al. (2003) παρασκεύασαν σύμπλεγμα του αντιβιοτικού κλαριθρομυκίνη με κυκλοδεξτρίνες σε λιποσώματα. Οι F. Maestrelli et al. (2005), παρασκεύασαν λιποσωματικά πολυστιβαδικά κυστίδια (MLV) που περιέχουν σύμπλοκα κετοπροφένη-κυκλοδεξτρίνης και προορίζονταν για τοπική χορήγηση φαρμάκου, με σκοπό την ταυτόχρονη αξιοποίηση των ευνοϊκών ιδιοτήτων των δύο μεταφορέων. Οι Tavares et al. (2006) παρασκεύασαν σύμπλεγμα μορίων DNA με 6-μονοδεοξυ-6-μονοαμινο-β-κυκλοδεξτρίνη (Am-β-CD) σε ευαίσθητα στο pH λιποσώματα. Οι Jessy Shaji και Sneha Iyer (2014) παρασκεύασαν λιποσώματα που περιείχαν κερκετίνη και σύμπλεγμα κερκετίνης/β-κυκλοδεξτρίνης. Οι Neng Qui et al. (2015), εξέτασαν τα νανοσωματίδια Barbigerone (Bar)/β-υδροξυπροπυλ - κυκλοδεξτρίνη / λιπόσωμα.

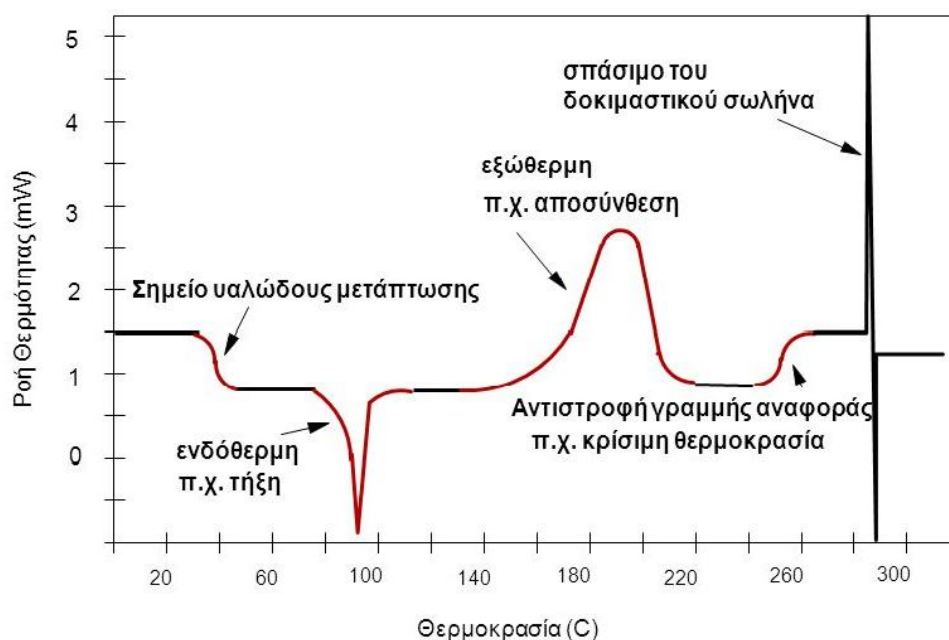
1.5.Επιβεβαίωση επιτυχούς εγκλεισμού

1.5.1. Διαφορική Σαρωτική θερμιδομετρία (DSC)

Η μέθοδος DSC είναι μια μέθοδος θερμικής ανάλυσης και χρησιμοποιείται για την παροχή πληροφοριών για ουσίες και συστατικά, όσον αφορά την μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων, αλλά και την εκτίμηση της σταθερότητας κατά την θέρμανση και την οξείδωση (Clas et al., 1999). Η μέθοδος μελετά τις μεταβολές της ενθαλπίας, δηλαδή το ποσό θερμότητας που περικλείει, που συμβαίνουν που συμβαίνουν σε ένα δείγμα όταν αυτό θερμαίνεται ή ψύχεται υπό καθορισμένες συνθήκες. Μπορούν να εξετασθούν και φαινόμενα όπως η κρυστάλλωση εξάχνωση, η τήξη κ.α.

Οι καμπύλες της μεθόδου DSC καταγράφουν την διαφορική είσοδο θερμότητας στο δείγμα-τρόφιμο (εκφρασμένη ως αναλογία θερμότητας dH /dt σε W (J/s) ή cal/s) στην τεταγμένη, προς τη θερμοκρασία (T) ή τον χρόνο (t) στην τετμημένη. Μία πρότυπη παρουσίαση των τριών κύριων φυσικοχημικών φαινομένων που διακρίνονται από το DSC δίνονται στο Σχήμα 2. Οι εξώθερμες αντιδράσεις σχεδιάζονται ανοδικά στο συγκεκριμένο διάγραμμα, ενώ οι ενδόθερμες καθοδικά.

Όταν η μεταβολή της ενθαλπίας (ΔH) για μία αντίδραση είναι θετική ($\Delta H > 0$), ο αισθητήρας θερμότητας του δείγματος στη διάταξη ενεργοποιείται και στέλνεται το αντίστοιχο σήμα. Για εξώθερμες μεταβολές ($\Delta H < 0$), ο αισθητήρας αναφοράς ενεργοποιείται ώστε να εξισορροπήσει τις θερμοκρασίες δείγματος και αναφοράς και επαναφέρει τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ δείγματος-υλικού αναφοράς (ΔT) στο μηδέν. Το γεγονός αυτό δίνει ένα αντίθετο σήμα σε σχέση με την προηγούμενη κατάσταση (όταν $\Delta H > 0$). Από τη στιγμή που αυτές οι εισροές ενέργειας είναι ανάλογες του μεγέθους των θερμικών ενεργειών που εμπλέκονται στις μεταπτώσεις, οι καταγραφές δίνουν απ' ευθείας θερμιδομετρικές μετρήσεις (Karathanos et al., 2011).



Σχήμα 2. Μεταβολές που μπορούν να παρατηρηθούν με τη χρήση της Διαφορική Θερμιδομετρίας Σάρωσης (images.slideplayer.gr)

Μια τυπική διάταξη DSC αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

α) Δύο υποδοχείς, έναν για το δείγμα (S) και έναν αναφοράς (R). Το δείγμα τοποθετείται σε ένα μικρό μεταλλικό καψίδιο που εξασφαλίζει ιδανική θερμική αγωγιμότητα. Τα καψίδια μπορεί να είναι ανοιχτά, να είναι ερμητικά κλειστά ή να έχουν οπή. Το μέγεθος του δείγματος είναι 3-5 mg, ενώ οι σκόνες χαμηλής πυκνότητας, όπως αυτές που προκύπτουν από λυοφιλίωση, πρέπει να πιέζονται ώστε να καταλαμβάνουν τον πυθμένα του καψιδίου για να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη κατανομή της θερμότητας στο δείγμα. Στους δύο υποδοχείς παρέχεται θερμότητα από τον κλίβανο, συνήθως με σταθερό και στους δύο ρυθμό. Η θερμοκρασία μετράται με πολύ ευαίσθητα θερμοστοιχεία και πρέπει να παραμένει η ίδια και στους δύο υποδοχείς.

β) Έναν κλίβανο, ο οποίος πρέπει να παρέχει ομοιόμορφη θέρμανση και γραμμικό ρυθμό θέρμανσης. Πρέπει να είναι μικρός σε όγκο και μάζα και να είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να μην επιτρέπει αλληλεπιδράσεις.

γ) Ένα σύστημα ψύξης, το οποίο να δίνει τη δυνατότητα επίτευξης θερμοκρασιών χαμηλότερων της θερμοκρασίας δωματίου. Ως μέσο ψύξης για ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υγρό άζωτο.

δ) Φιάλες παροχής είτε αδρανούς αερίου είτε οξυγόνου. Η ροή του αερίου αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της θερμικής ανάλυσης.

δ) Ένα λογισμικό, το οποίο ρυθμίζει τη θερμοκρασία σε ένα ευρύ φάσμα ρυθμού ψύξης / θέρμανσης

ε) Ένα καταγραφικό σύστημα, το οποίο περιέχει ενσωματωμένο έναν ενισχυτή για τα σήματα του αισθητήρα θερμοκρασίας και των θερμοστοιχείων διαφορικής θερμοκρασίας (Ross et al., 1995).

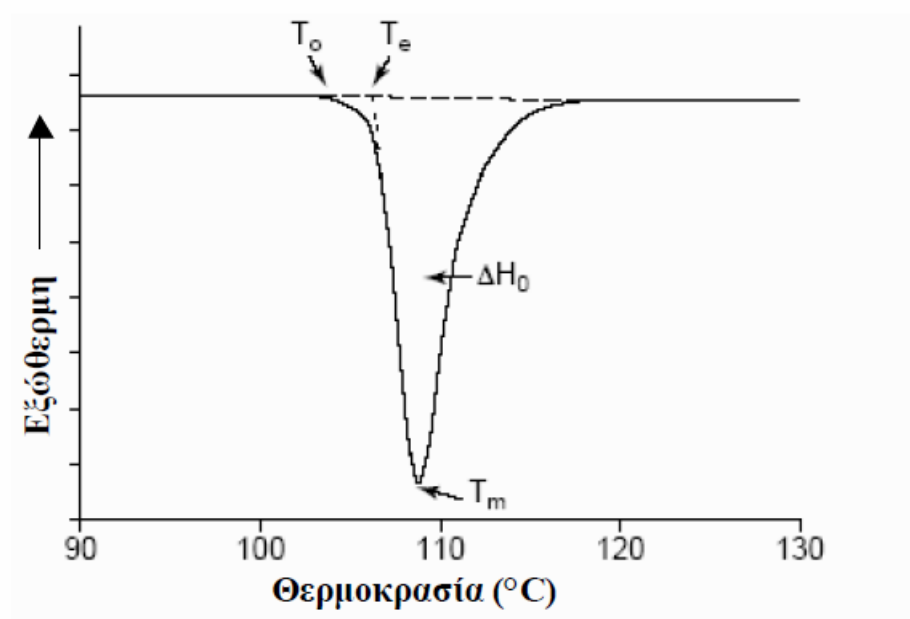
1.5.1.1. Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης

Εφαρμογές της μεθόδου αποτελούν ο προσδιορισμός του σημείου τήξεως μια ουσίας, η εκτίμηση της σταθερότητάς της σε οξειδωτικές συνθήκες και η επιβεβαίωση εγκλεισμού ουσιών.

Με την τεχνική της DSC μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια το σημείο τήξεως μίας κρυσταλλικής ουσίας. Μια ουσία 100% κρυσταλλική αναμένεται να παρουσιάζει μια οξεία κορυφή. Όταν το δείγμα δεν είναι απόλυτα καθαρό, μπορεί να παρατηρηθεί διεύρυνση της κορυφής και ελάττωση της θερμοκρασίας τήξεως. Στην Σχήμα 3 παρουσιάζεται το θερμογράφημα ενός μορίου με φαρμακευτική δράση. Όπως παρατηρείται υπάρχουν τρεις αξιοσημείωτες θερμοκρασίες:

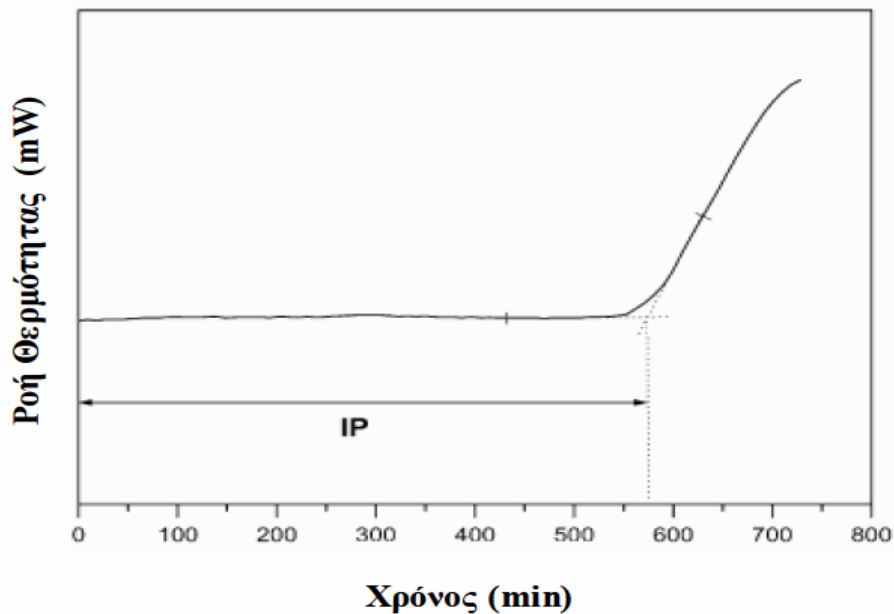
- T_o : Η θερμοκρασία στην οποία η καμπύλη αρχίζει να αποκλίνει από την αρχική της πορεία
- T_e : Το σημείο τομής της προέκτασης της αρχική πορείας της καμπύλης και της προέκτασης της γραμμής της νέας καμπύλης, όπως φαίνεται στην εικόνα
- T_m : Η θερμοκρασία της κορυφής της καμπύλης

Το σημείο τήξεως είναι η θερμοκρασία T_e , αν και πολλοί ερευνητές αναφέρουν ως σημείο τήξεως τη θερμοκρασία T_m . Η τιμή της ενθαλπίας τήξης, ΔH_0 , εξαρτάται από την επιλογή της γραμμής βάσης (baseline). Γενικά, η περιοχή προκύπτει όταν χαραχθεί η γραμμή που ενώνει το σημείο που η καμπύλη αποχωρίζεται από τη βασική γραμμή του θερμογραφήματος, με το σημείο που η καμπύλη επανέρχεται στη βασική γραμμή (Mourtzinou et al., 2007).



Σχήμα 3. Θερμογράφημα ενός φαρμάκου στο οποίο παρουσιάζονται οι θερμοκρασίες T_o , T_e και T_m (Clas et al., 1999)

Η μέθοδος DSC χρησιμοποιείται επίσης για τη μελέτη της πορείας της οξείδωσης ουσιών, μέσω παροχής οξυγόνου στα δείγματα. Στη μέθοδο αυτή, Χρόνος επαγωγής (IP) είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι να παρατηρηθεί μια απότομη αύξηση στο ρυθμό της οξείδωσης και λαμβάνεται από το θερμογράφημα (Σχήμα 4) στο σημείο που αρχίζει η καμπύλη να αλλάζει κλίση λόγω της εξώθερμης αντίδρασης της οξείδωσης (Velasco et al., 2004).



Σχήμα 4. Προσδιορισμός του χρόνου επαγωγής (IP) με χρήση της διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης σε ισόθερμες συνθήκες (Valesco et al., 2004)

Για τη διερεύνηση του επιτυχούς ή μη εγκλεισμού μιας ουσίας χρησιμοποιούνται οι δυο παραπάνω εφαρμογές. Όσον αφορά την πρώτη εφαρμογή, συγκρίνονται τα θερμογράφημα της ουσίας σκέτης και της ουσίας ενθυλακωμένης. Ο εγκλεισμός θεωρείται επιτυχής, μόνο εάν στο δεύτερο θερμογράφημα η καμπύλη του σημείου τήξεως δεν εμφανιστεί. Όσον αφορά τη δεύτερη εφαρμογή, η καμπύλη στο θερμογράφημα, μετά τον εγκλεισμό, μετατοπίζεται προς τα δεξιά, δηλαδή ο χρόνος επαγωγής είναι μεγαλύτερος. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην προστασία της ενθυλακωμένης ουσίας από την οξείδωση (Clas et al., 1999). Τέλος, η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης έχει εφαρμοστεί από τους Pinto et al. (2004) και Meier et al. (2001) για τη μελέτη του εγκλεισμού φαρμακευτικών μορίων σε κυκλοδεξτρίνες.

1.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο

NMR, άλλοι, οι λιγότεροι, όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπιν. Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση.

Ένα βασικό γνώρισμα είναι ότι η συχνότητα συντονισμού μιας συγκεκριμένης ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της έντασης του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Αυτό το γνώρισμα χρησιμοποιείται στις τεχνικές απεικόνισης· αν ένα δείγμα τοποθετηθεί σε ανομοιογενές μαγνητικό πεδίο, τότε οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων του δείγματος εξαρτώνται από το πού βρίσκονται στο πεδίο. Επειδή η ανάλυση της τεχνικής απεικόνισης εξαρτάται από το μέγεθος της βαθμίδωσης του μαγνητικού πεδίου, γίνονται πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη αυξημένης έντασης πεδίου, χρησιμοποιώντας συχνά υπεραγωγούς. Η αποτελεσματικότητα του NMR μπορεί επίσης να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας υπερπόλωση και/ή χρησιμοποιώντας δισδιάστατες, τρισδιάστατες ή υψηλότερων διαστάσεων τεχνικές πολλαπλής συχνότητας. Η αρχή του NMR περιλαμβάνει συνήθως δύο διαδοχικά βήματα:

- Τη στοίχιση (πόλωση) των πυρηνικών μαγνητικών σπιν σε ένα εφαρμοζόμενο, σταθερό μαγνητικό πεδίο H_0
- Τη διαταραχή αυτής της στοίχισης των πυρηνικών σπιν χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρομαγνητικό παλμό, συνήθως ραδιοφωνικής συχνότητας (RF). Η απαιτούμενη συχνότητα διαταραχής εξαρτάται από το στατικό μαγνητικό πεδίο (H_0) και τους πυρήνες της παρατήρησης

Τα δύο πεδία επιλέγονται, συνήθως, ώστε να είναι κάθετα μεταξύ τους, επειδή αυτό μεγιστοποιεί την ένταση σήματος του NMR. Η τελική απόκριση από τον συνολικό μαγνητισμό (M) των πυρηνικών σπιν είναι το φαινόμενο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία NMR και τη μαγνητική τομογραφία. Και οι δύο χρησιμοποιούν έντονα εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία (H_0) για να πετύχουν διασπορά και πολύ υψηλή σταθερότητα ώστε να δώσουν φασματική ανάλυση, οι λεπτομέρειες της οποίας περιγράφονται από τις χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts), το φαινόμενο Ζέεμαν (Zeeman effect) και τις μετατοπίσεις Νάιτ (Knight shifts) (στα μέταλλα) (Zheltikov et al., 2006, Wikipedia).

1.5.2.1. Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται για την μελέτη συμπλόκων εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνες επιβεβαιώνοντας τον σχηματισμό των συμπλόκων και δίνοντας πληροφορίες για την δομή και την στοιχειομετρία τους (Schneider et al., 1998). Πιο αναλυτικά, η φασματοσκοπία NMR όταν εφαρμοστεί στη μελέτη του εγκλεισμού μορίων στην κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

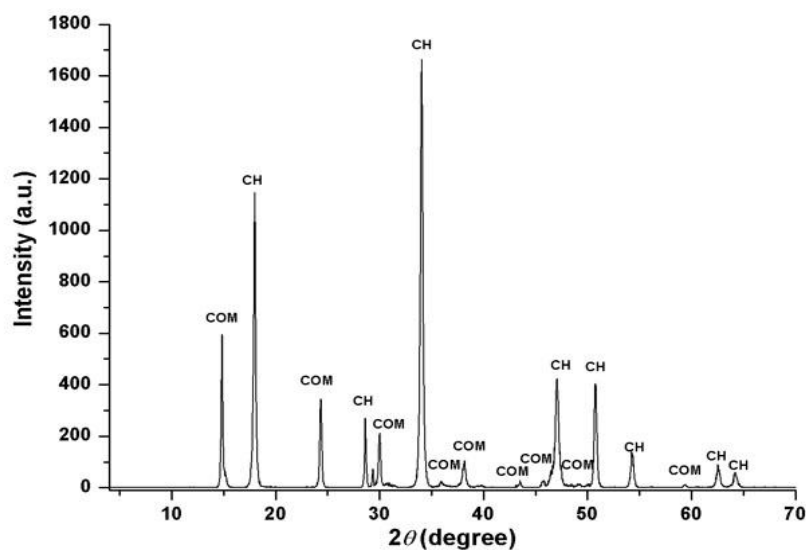
- Τη δημιουργία του συμπλόκου λόγω μετατόπισης των κορυφών των εσωτερικών υδρογόνων, H-3 και H-5, της β-κυκλοδεξτρίνης. Συνήθως το φάσμα του ελεύθερου συστατικού συγκρίνεται με το φάσμα του συστατικού παρουσία του μέσου εγκλεισμού (Kokkinou et al., 2001).
- Την τιμή της σταθεράς σχηματισμού και τιμών θερμοδυναμικών μεγεθών σχηματισμού του συμπλόκου (Rekharsky & Inoue, 1998).
- Τη στοιχειομετρία του συμπλόκου εγκλεισμού (Yannakopoulou et al., 2002). Στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται οι μεταβολές της χημικής μετατόπισης κάποιων πυρήνων.

- Τη δομή του συμπλόκου στο διάλυμα. Μέσω του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ μπορούν να ληφθούν λεπτομέρειες όσον αφορά στο ποιά πρωτόνια του εγκλειόμενου μορίου εντοπίζονται εσωτερικά της κοιλότητας της β-κυκλοδεξτρίνης, στην περίπτωση που το μέσο εγκλεισμού είναι η κυκλοδεξτρίνη (Mourtzis et al., 2004, Mourtzinis et al., 2007).

1.5.3. Περίθλαση Ακτινών X (XRD)

Η Περίθλαση Ακτινών X (XRD) είναι μια διαδικασία κατά την οποία μια δέσμη παραλλήλων ακτινών X «κάμπτεται» καθώς διέρχεται διαμέσου ενός λεπτού εμποδίου ή μιας μικρής σχισμής. Έπειτα, οι περιθλώμενες ακτίνες ανιχνεύονται με φωτογραφικό φιλμ και με την προσεκτική εξέταση και μελέτη της θέσης και της έντασης των κηλίδων στο φιλμ εξαγάγουμε συμπεράσματα για την κρυσταλλική δομή του δείγματος. Η περίθλαση ακτίνων-X από δείγματα σε μορφή σκόνης, επιτρέπει τον προσδιορισμό της δομής και της σύστασης του δείγματος, το οποίο μπορεί να περιέχει περισσότερες από μία κρυσταλλικές ενώσεις (φάσεις). Μπορούν να μελετηθούν στερεά οιασδήποτε χημικής φύσης όπως απλές και σύνθετες χημικές ενώσεις, κράματα μετάλλων και ορυκτά, οργανικά μόρια και άλλα (Skoog et al., 1998).

Σε ένα φάσμα περίθλασης ακτίνων-X κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια οικογένεια κρυσταλλικών επιπέδων (hkl). Για κάθε οικογένεια επιπέδων θα υπάρχει ένα μικρό ποσοστό κρυσταλλιτών οι οποίοι είναι κατάλληλα προσανατολισμένοι για να περιθλούν την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X για κάθε κρυσταλλική φάση είναι μοναδικό, όπως ακριβώς και το δακτυλικό αποτύπωμα. Χρησιμοποιούμε την θέση και την σχετική ένταση μιας σειράς κορυφών έτσι ώστε να ταυτοποιήσουμε τα πειραματικά δεδομένα με αποθηκευμένα φάσματα σε μια βάση δεδομένων. Παράδειγμα διαγράμματος συγκεκριμένης ουσίας φαίνεται στο Σχήμα 5.

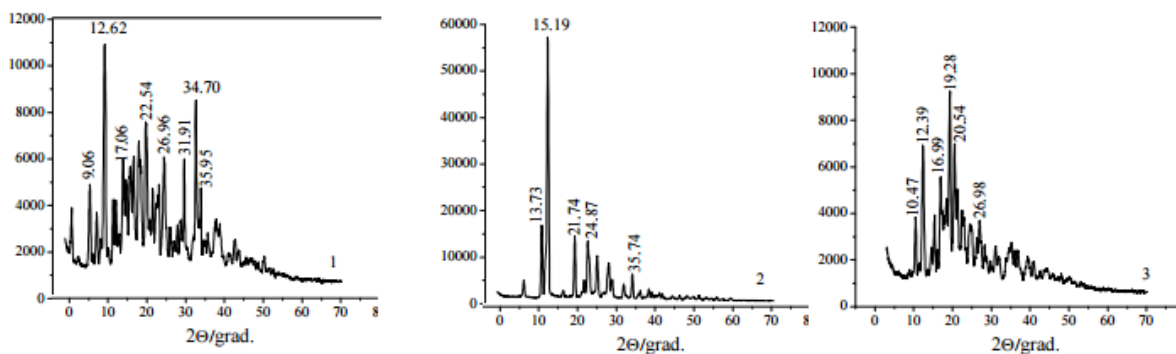


Σχήμα 5. Ακτινοδιάγραμμα περίθλασης ακτινών Χ ουσίας (http://nanobiodomyl.gr/page_id=40)

1.5.3.1. Εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη της ενθυλάκωσης

Εφαρμογές της μεθόδου αποτελούν η ταυτοποίηση κρυσταλλικών ουσιών που προκύπτει από τη μελέτη της θέσης και της έντασης των κορυφών σε ένα ακτινοδιάγραμμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που θέλουμε να προσδιορίσουμε τον εγκλεισμό κυκλοδεξτρίνης με άλλες ουσίες.

Παράδειγμα ταυτοποίησης φαίνεται παρακάτω όπου το προς μελέτη σύμπλοκο είναι αυτό της β-CD με την ουσία παρα-αμινο βενζοϊκό οξύ (p-ABA). Πραγματοποιείται περίθλαση ακτινών Χ σε κάθε μια ουσία ξεχωριστά αλλά και στο σύμπλοκο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6. Η ενθυλάκωση του εγκλεισμένου μορίου είναι εμφανής καθώς οι κορυφές έχουν διαφοροποιηθεί. Η σύζευξη της β-CD με το p-ABA έχει επίσης και την κρυσταλλική δομή της β-CD (Mudgil et al., 2012).



Σχήμα 6. Ακτινοδιάγραμμα β-CD (1), p-ABA (2) και συμπλόκου β-CD – p-ABA (Mudgil et al., 2012)

1.5.4. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία(IR)

Η Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (IR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρου (μήκη κύματος από 1 έως 100μm) από κάποιο μέσο που εξετάζεται. Φωτόνια τέτοιας ενέργειας προκαλούν ταλαντωτικές και περιστροφικές κινήσεις στα μόρια. Στα φωτόνια που είναι ενεργά στο υπέρυθρο γίνεται άμεση σύζευξη της διπολικής ροπής με το φως και έχουμε μετασχηματισμό φωτονίου σε φωτόνιο. Έτσι προσδιορίζεται το ποσοστό απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας από το εξεταζόμενο δείγμα. Ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο μεγαλύτερη είναι η χαρακτηριστική απορρόφηση στο IR. Η μέθοδος δίνει πληροφορίες σχετικά με τις χαρακτηριστικές ομάδες που βρίσκονται στο μόριο, ακόμα και για τον προσανατολισμό τους στο χώρο. Έχει μεγάλη εκλεκτικότητα, για αυτό και το φάσμα χαρακτηρίζεται ως δακτυλικό αποτύπωμα της ένωσης.

Η μέθοδος που έχει επικρατήσει να χρησιμοποιείται είναι η φασματοσκοπία με χρήση μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Πρόκειται μια τεχνική μέτρησης για τη συλλογή των υπέρυθρων φασμάτων στην οποία αντί να καταγράφεται το ποσό της ενέργειας που απορροφάται για διαφορετικές συχνότητες της ακτινοβολίας, το φως IR οδηγείται στο δείγμα αφού πρώτα διαμορφωθεί μέσω ενός συμβολόμετρου. Η εκτέλεση μετασχηματισμού Fourier στο

συμβολογράφημα έχει ως αποτέλεσμα ένα φάσμα όμοιο με εκείνο που παίρνουμε από τη συμβατική φασματοσκοπία διασποράς (Guenzler et al., 2002).

1.5.4.1. Εφαρμογές της μεθόδου

Η εξέταση και ταυτοποίηση χημικών ενώσεων με την IR φασματοσκοπία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε ερευνητικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ποιοτικού και ποσοτικού ελέγχου σε μεγάλο πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών. Στη φαρμακευτική βιομηχανία η μέθοδος εφαρμόζεται για το χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των φαρμακευτικών ουσιών και πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή φαρμάκων, των βιολογικά ενεργών και αδρανών συστατικών τους, καθώς και τον έλεγχο της περιεκτικότητας και αποτίμηση των προϊόντων. Συγκεκριμένα, η χρησιμότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία δραστικών ομάδων σε ένα μόριο, αλλά και τον προσδιορισμό διάφορων κρυσταλλικών πολυμορφικών μορφών των φαρμάκων (Stuart et al., 2004).

Εκτός των άλλων, η Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (IR) χρησιμοποιείται για την μελέτη συμπλόκων εγκλεισμού με κυκλοδεξτρίνες επιβεβαιώνοντας τον σχηματισμό των συμπλόκων και δίνοντας πληροφορίες για την δομή και την στοιχειομετρία τους, καθώς και πληροφορίες για τις αλλαγές στα μοριακά βάρη των ουσιών με ή χωρίς κυκλοδεξτρίνη αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και εγκλεισμένου μορίου (Crupi et al., 2010).

2. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΕ ΦΥΤΑ

2.1.Ενθυλάκωση σε φυτά με βιοδραστικό ενδιαφέρον

Τα φυτά περιέχουν πλήθος μορίων και ουσιών τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της υγείας, όπως ίνες, βιταμίνες, φυτοστερόλες, καροτενοειδή, οργανικές ενώσεις και πολυφαινόλες (Pinho et al., 2014). Ένας μεγάλος αριθμός φυτικών εκχυλισμάτων και συστατικών τους έχουν προσαρμοστεί στη βιομηχανία τροφίμων ούτως ώστε να χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά και προϊόντα υγείας. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα αυτών των σκευασμάτων εξαρτάται από σταθερότητα, τη βιοδραστικότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα. Κάποια από τα προβλήματα είναι η μειωμένη διαλυτότητα στο νερό, οι διαφορές στην ποσότητα εκχυλίσματος που απαιτείται για την επίτευξη ενός σημαντικού ποσού δραστικών ουσιών και η ταχεία οξείδωσή τους (Fang et al., 2010). Ως εκ τούτου, νέες προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα, μια εκ των οποίων είναι η ενθυλάκωση των ουσιών αυτών.

Τα βότανα είναι γνωστά για την μεγάλη ποικιλία συστατικών που περιέχουν όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τανίνες, βιταμίνες και τερπένια, ουσίες με βιολογικές δράσεις, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές. Με την ενθυλάκωση επιτυγχάνεται μεγαλύτερη σταθερότητα σε βάθος χρόνου, ελεγχόμενη απελευθέρωση συστατικών και αύξηση της δραστικότητας έναντι σε κάποια είδη βακτηρίων. Έτσι, σωματίδια παραγόμενα από συνδυασμό ορισμένων εκχυλισμάτων από βότανα μπορούν να εφαρμοστούν στη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και συμπληρωμάτων (Matouskova et al., 2016).

Χυμοί φρούτων, όπως είναι αυτοί των τύπου-berry, φαίνεται να είναι πλούσιοι σε πολυφαινολικό και αντιοξειδωτικό περιεχόμενο που αποδίδεται κυρίως στις ανθοκυανίνες, μόρια τα οποία τους δίνουν και το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Ωστόσο, η χρήση εκχυλισμάτων ανθοκυανινών είναι περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής σταθερότητας σε περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, οξυγόνο και φως, pH κ.α.) κατά την αποθήκευση και επεξεργασία. Έτσι, με την ενθυλάκωση αντιμετωπίζονται αυτά τα προβλήματα. Κάποιες από τις χρήσεις των

ενθυλακωμένων προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων είναι ως φυσικές χρωστικές ή η προσθήκη τους σε «υγιεινά» τρόφιμα (Robert et al., 2015).

Οι Yesim et al. (2017) μελέτησαν το αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό περιεχόμενο ενθυλακωμένων ελαίων από βότανα (δεντρολίβανο, δάφνη, θυμάρι και φασκόμηλο) σε ψάρια. Οι Nathalia et al. (2016) μελέτησαν το φαινολικό περιεχόμενο φυτού στέβιας (*Stevia rebaudiana*) ενθυλακωμένου σε αλγινικό νάτριο. Οι Pastija et al. (2015) μελέτησαν το πολυφαινολικό περιεχόμενο πράσινου τσαγιού ενθυλακωμένου σε μαλτοδεξτρίνη ή/και β-κυκλοδεξτρίνη για να αυξήσουν το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε προϊόντα ψωμιού. Οι Amalia et al. (2017) μελέτησαν το πολυφαινολικό περιεχόμενο σάρκας και φλούδας ροδιού ενθυλακωμένου σε β-κυκλοδεξτρίνη. Οι Kelly Simon-Brown et al. (2017) μελέτησαν το πολυφαινολικό, αντιοξειδωτικό και σε 6-τζιντερόλη περιεχόμενο φυτού Τζίντζερ (*Zingiber officinale* Roscoe) ενθυλακωμένου σε μαλτοδεξτρίνη ή/και αραβικό κόμμι.

Οι Karathanos et al. (2007) ενθυλάκωσαν πολυφαινόλες από υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, πλούσια σε ελευρωπαΐνη, σε β-κυκλοδεξτρίνη με τη μέθοδο λυοφιλίωσης. Η μέθοδος προσδιορισμού επιτυχούς εγκλεισμού ήταν η DSC και η NMR. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το σύμπλεγμα ενθυλάκωσης ήταν ανθεκτικό στην οξείδωση και η διαλυτότητά του στο νερό αυξήθηκε κατά 50%. Οι Karathanos et al. (2008) ενθυλάκωσαν πολυφαινόλες από αιθανολικό εκχύλισμα πρόπολης, το οποίο ήταν πλούσιο σε τερπένια και πολυφαινόλες, σε β-κυκλοδεξτρίνη ούτως ώστε να αυξήσουν τη διαλυτότητά του στο νερό. Η μέθοδος προσδιορισμού επιτυχούς εγκλεισμού ήταν η DSC και η μέθοδος προσδιορισμού του φαινολικού περιεχομένου ήταν η Folin Ciocaltau. Οι Kalogeropoulos et al. (2010) ενθυλάκωσαν πολυφαινόλες, μεταξύ των οποίων γλυκοσίδες κερκετίνης, κατεχίνες και κερκετίνες, οι οποίες πάρθηκαν από μεθανολικό εκχύλισμα βάλσαμου, σε β-κυκλοδεξτρίνη. Οι πολυφαινόλες μετρήθηκαν με τη μέθοδο DPPH και FRAP. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης εγκλεισμού ήταν DSC και NMR, οι οποίες έδειξαν πως η σταθερότητα των συμπλεγμάτων κατά τη θερμική επεξεργασία και την οξείδωση ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα μη εγκλεισμένα διαλύματα σε β-κυκλοδεξτρίνη. Οι Ramírez-Ambrosi et al. (2014) ενθυλάκωσαν πολυφαινόλες και συγκεκριμένα ερυθρίνη, φλοριτζίνη και χλωρογενικό οξύ, οι οποίες πάρθηκαν από μήλα, σε β-κυκλοδεξτρίνη. Φάνηκε ότι οι δύο

πρώτες εκχυλίστηκαν καλύτερα σε αιθανόλη και η τρίτη καλύτερα σε νερό. Οι μέθοδοι ταυτοποίησης εγκλεισμού ήταν TGA, DSC, FTIR και XRPD.

2.2. Το φυτό *Malus Domestica*

2.2.1. Γενικά

Το μήλο είναι φρούτο, καρπός του δέντρου μηλιά (επιστ.: Μηλέα η ήμερος, λατ. *Malus domestica*). Είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρύτατα καλλιεργούμενα φρούτα. Το δέντρο είναι φυλλοβόλο και φτάνει τα 5-12 μέτρα ύψος με φύλλα που έχουν ελλειψοειδές σχήμα και μυτερή άκρη. Ανθίζει την άνοιξη με άσπρα άνθη (ελαφρά ροζ στην αρχή), 2.5-3.5 cm σε διάμετρο, με πέντε πέταλα. Τα φρούτα ωριμάζουν το φθινόπωρο και συνήθως έχουν διάμετρο 5-9 cm (και σπάνια μέχρι και 15 cm). Η μηλιά ήταν γνωστή από τους προϊστορικούς χρόνους, τόσο σε άγρια όσο και σε καλλιεργούμενη μορφή. Η καταγωγή της τοποθετείται στην περιοχή νότια του Καυκάσου. Το δέντρο καλλιεργείται από την αρχαιότητα στην Ασία και στην Ευρώπη. Η καλλιεργούμενη μηλιά αναφέρεται από το Θεόφραστο τον 3ο αι. π.Χ. Το γένος *malus*, εκτός της κοινής μηλιάς, συμπεριλαμβάνει και άλλα είδη, μεταξύ των οποίων και τα ακόλουθα: *Malus baccata* (Μ. η ραγοφόρος), *Malus fusca* (Μ.η φαιά), *Malus orientalis* (Μ. η ανατολική), *Malus prunifolia* (Μ. η προυμνόφυλλος), *Malus pumila* (Μ. η νανοφυής), *Malus sylvestris* (Μηλέα η δασική), *Malus spectabilis* (Μ. η έκλαμπρος). Με την ανακάλυψη του νέου κόσμου και την εγκατάσταση αποίκων πολλές ευρωπαϊκές ποικιλίες μεταφέρθηκαν στην Αμερική.

Η Μηλέα η οικιακή (*Malus domestica*), καθώς αναφέρεται, προήλθε από το είδος Μηλέα η χαμηλή ή Μηλέα η νανοφυής (*Malus pumila*), αλλά στην εξέλιξή της, όπως είναι παραδεχτό σήμερα, συνέβαλε το είδος Μηλέα η δασική (*Malus sylvestris*), καθώς και πολλά άλλα είδη. Σήμερα υπολογίζεται ότι υπάρχουν γύρω στις 7.5 χιλιάδες ποικιλίες μήλων (Pickersgill et al., 2009).

2.2.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά του μήλου (*Malus Domestica*)

Η μηλιά είναι δέντρο φυλλοβόλο, μεγάλου μεγέθους, πλαγιόκλαδο ή ορθόκλαδο και μακρόβιο.

Ρίζα: Το ριζικό σύστημα της μηλιάς αποτελείται από πολλές πλάγιες ρίζες και καταλαμβάνει έκταση διπλάσια από εκείνη που καταλαμβάνει η προβολή της κόμης του δέντρου. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ριζικού συστήματος βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους αλλά η ρίζα μπορεί να φθάσει σε βάθος μέχρι 3 μέτρων και πάνω.

Φύλλα: Τα φύλλα είναι απλά, κατ' εναλλαγή, ωοειδή, οδοντωτά, βραχύμίσχα, με την κάτω επιφάνεια χνουδωτή. Το μέγεθος και το πάχος των φύλλων επηρεάζονται από την ποικιλία, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το χρόνο εμφάνισής τους και τη ζωνρότητα του δέντρου. Ο μίσχος των φύλλων φέρει μερικές φορές κοντά στη βάση δύο μικρά παράφυλλα.

Οφθαλμοί: Οι οφθαλμοί είναι πεπλατυσμένοι, χνουδωτοί και εφάπτονται του βλαστού. Οι καρποφόροι οφθαλμοί είναι μικτοί (όταν ανοίγουν δίνουν βλάστηση μικρού μήκους 0,5 – 3 εκ., που φέρει πλάγια φύλλα και επάκρια άνθη) και ο καθένας περικλείει πέντε με έξι άνθη. Η διαφοροποίηση των οφθαλμών σε βλαστοφόρους και μικτούς αρχίζει τον Ιούλιο – Αύγουστο και ολοκληρώνεται την επόμενη άνοιξη πριν από την άνθηση.

Άνθη: Από κάθε μικτό οφθαλμό αναπτύσσονται περίπου πέντε άνθη σε ταξιανθία κορύμβου. Το κεντρικό άνθος καλείται βασιλικό, ανοίγει πρώτο και ακολουθείται από τα δύο άνθη της βάσης και εν συνεχεία από τα δύο ενδιάμεσα άνθη. Τα άνθη αποτελούνται από πέντε σέπαλα, πέντε πέταλα, είκοσι στήμονες με κίτρινους ανθήρες και έναν ύπερο αποτελούμενο από την ωοθήκη και πέντε στύλους που συμφύονται σε κοινή βάση. Τα άνθη είναι εντομόφιλα. Σε μερικές ποικιλίες όπου οι στήμονες είναι μακρύτεροι από τους στύλους, οι μέλισσες μπορούν να συλλέγουν γύρη χωρίς να γίνεται επικονίαση.

Καρπός: Ο καρπός της μηλιάς είναι ψευδής. Το βρώσιμο τμήμα αποτελείται από ιστούς που προέρχονται από την πάχυνση της βάσης του κάλυκα, της στεφάνης και των στημόνων. Έχει ποικίλο σχήμα, από σφαιρικό έως επίμηκες, σάρκα τραγανή ή αλευρώδη, εύχυμη, γλυκιά, όξινη ή υπόξινη και τα σπέρματα είναι καφέ απόχρωσης.

2.2.3. Παραγωγή του μήλου (*Malus Domestica*)

Η μηλιά είναι το πιο διαδεδομένο οπωροφόρο παγκοσμίως, αντιπροσωπεύει το 50% των φυλλοβόλων οπωροφόρων δέντρων, με παγκόσμια ετήσια παραγωγή περί τα 60 εκατομμύρια τόνους. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής μήλων παγκοσμίως αποτελείται από επιτραπέζιες ποικιλίες. Οι ποικιλίες πολλαπλής χρήσεως όμως αρχίζουν να γίνονται συνεχώς δημοφιλέστερες. Παλιότερα σε κάθε τόπο καλλιεργούνταν διαφορετικές ποικιλίες μήλων. Οι απαιτήσεις όμως για αυξημένη παραγωγή και υψηλή ποιότητα καρπών, συνέβαλαν στη δημιουργία και διάδοση νέων ποικιλιών που καλλιεργούνται σήμερα σε διάφορα μέρη με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες. Οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι η Golden Delicious και οι διάφορες κόκκινες ποικιλίες Delicious αμερικανικής προέλευσης, η Mutsu ιαπωνικής προέλευσης και η Granny Smith αυστραλιανής προέλευσης. Η καλλιέργεια της μηλιάς είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο. Μηλεώνες απαντώνται ακόμη και στη Σιβηρία όπου η θερμοκρασία κατά τους χειμερινούς μήνες μπορεί να πέσει στους -40 βαθμούς Κελσίου. Μέχρι το 1940 η παραγωγή μήλων στην Ελλάδα ήταν πολύ μικρή. Σήμερα η καλλιεργούμενη έκταση είναι περίπου 150.000 στρέμματα και η ετήσια παραγωγή ανέρχεται σε 350.000 τόνους, αποτελώντας τη δεύτερη σπουδαιότερη καλλιέργεια από τα φυλλοβόλα οπωροφόρα μετά τη ροδακινιά. Η καλλιέργεια της μηλιάς σε μορφή συστηματικών οπωρώνων εντοπίζεται κυρίως στην κεντρική και δυτική Μακεδονία, στη Θεσσαλία και στην Πελοπόννησο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση δέντρων μηλιάς βρίσκεται στην περιοχή του Βερμίου. Καλλιεργείται επίσης στους νομούς Ημαθίας, Πέλλας, Καστοριάς, Μαγνησίας, Λάρισας και Αρκαδίας (Wikipedia).

2.2.4. Ποικιλίες του μήλου (*Malus Domestica*)

Παγκοσμίως υπάρχουν περίπου 2000 ποικιλίες μήλων. Οι κυριότερες σύγχρονες ποικιλίες που προωθούνται στην αγορά είναι οι παρακάτω:

- Από τις πρώιμες ποικιλίες, η ποικιλία *Gala* και ιδιαίτερα οι κλώνοι *Gala Schniga*, *Anaglo*, *Brookfield Gala* στις πεδινές περιοχές.
- Από τις όψιμες ποικιλίες, η ποικιλία *Fuji* και η ποικιλία *Granny Smith* και Μούτσου που ευδοκimerεί σε ορεινές περιοχές.

- *Μπελφόρ*: ποικιλία μικρόκαρπου κόκκινου μήλου με σκληρή σάρκα, μακροχρόνιας διατήρησης εκτός ψυγείου που εισήχθη και στην Ελλάδα τη 10ετία του 1950.
- Από την ομάδα *Red Delicious* οι κλώνοι *Red Chief*, *Superchief*, *Red Kan*, *Scarlet Spur*, *Red Cap* σε ημιορεινές και ορεινές περιοχές.
- Από την ομάδα *Golden Delicious*, οι κλώνοι *Golden Reinders*, *Golden Smoothee* και *Golden B*.
- Από τις τριπλοειδείς ποικιλίες, οι ποικιλίες *Red Jonaprince*, *Jonagored*, *Jonagold*.
- Η ελληνική ποικιλία *Φιρίκι* συναντάται ως επί το πλείστον στις ορεινές και ημιορεινές περιοχές της χώρας. Πριν από 150-200 χρόνια εμφανίστηκε στο Πήλιο ένα μοναδικό στο είδος μήλο, μικρό στο μέγεθος και υπόξινο στη γεύση: το φιρίκι, το ήμερο και το άγριο (που δεν είναι εδωδιμο).

Στην Ελλάδα επικρατούν οι ποικιλίες της ομάδας *Red Delicious*, μεταξύ των οποίων είναι η *Golden Delicious* (μπανανόμηλα), *Red Chief*, *Gala*, *Fugi*, *Pink Lady*, *Granny Smith* κ.ά. (Φρουτονέα, 2005). Στην Ελλάδα υπάρχουν περιοχές όπου παράγονται μήλα με το ευρωπαϊκό σύστημα της Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) ή Προστατευμένης Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΓΕ). Αυτά είναι τα "Μήλα Ζαγοράς Πηλίου", τα "Μήλα Ντελίσσιους Πιλαφά Τριπόλεως" και τα "Μήλα Καστοριάς" (Κατάλογος των ΠΟΠ – ΠΓΕ προϊόντων, 2014)

Πίνακας 2. Παγκόσμια παραγωγή μήλων το 2008 (FAO)

Παγκόσμια παραγωγή μήλων το 2008		
Χώρα	Παραγωγή σε τόνους	Σημειώσεις
 Κίνα	27 507 000	F
 ΗΠΑ	4 237 730	
 Ιράν	2 660 000	F
 Τουρκία	2 266 437	
 Ρωσία	2 211 000	F
 Ιταλία	2 072 500	
 Ινδία	2 001 400	
 Γαλλία	1 800 000	F
 Χιλή	1 390 000	F
 Αργεντινή	1 300 000	F
Σύνολο	64 255 520	M
Κανένα γράμμα = Επίσημος αριθμός, F = Στοιχεία FAO, M = Μικτός (επίσημα, ημιεπίσημα στοιχεία ή/και εκτιμήσεις)		

2.2.5. Χημικό περιεχόμενο του μήλου (*Malus Domestica*)

Το μήλο αποτελείται από σάκχαρα (φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη), σορβιτόλη, οργανικά οξέα, νουκλεϊκά οξέα, μέταλλα, βιταμίνες και πολυφαινόλες (Demigné et al., 2002). Στον πίνακα 2 φαίνονται αναλυτικά τα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά αλλά και τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία του μήλου (USDA). Ωστόσο, οι περιεκτικότητες αυτές είναι ενδεικτικές και μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία ή το στάδιο ωριμότητας του φρούτου.

Πίνακας 3. Διατροφική αξία μήλου, ωμού, με τη φλούδα (USDA)

Διατροφική αξία ανά 100 g (3.5 oz)		Βιταμίνες		Μέταλλα	
Ενέργεια	218 kJ (52 kcal)	Βιταμίνη Α	3μg	Ασβέστιο	6 mg
Υδατάνθρακες	13.81 g	Β-καροτένιο	27μg	Σίδηρος	0.12 mg
Απλά σάκχαρα	10.39 g	λουτεΐνη ζεαξανθίνη	29μg	Μαγνήσιο	5 mg
Φυτικές ίνες	2.4 g	Θειαμίνη (B1)	0.017 mg	Φώσφορος	11 mg
Λίπος	0.17 g	Ριβοφλαβίνη (B2)	0.026 mg	Κάλιο	107 mg
Πρωτεΐνες	0.26 g	Νιασίνη (B3)	0.091 mg	Νάτριο	1 mg
		Παντοθενικό οξύ (B5)	0.061 mg	Ψευδάργυρος	0.04 mg
		Βιταμίνη B6	0.041 mg	Άλλα συστατικά	
		Φυλλικό οξύ	3 μg	Νερό	85.56 g
		Βιταμίνη C	4.6 mg		
		Βιταμίνη E	0.18 mg		
		Βιταμίνη K	2.2 μg		

2.2.5.1. Μακροθρεπτικά συστατικά του μήλου (*Malus Domestica*)

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των μήλων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται άμυλο, σάκχαρα, πηκτίνη κυτταρίνη και ημικυταρρίνη. Ανώριμα μήλα περιέχουν μια σχετικά υψηλή ποσότητα αμύλου (3-4%), αλλά καθώς ωριμάζει ο καρπός, το άμυλο μετατρέπεται σε απλά σάκχαρα μειώνοντάς το σημαντικά. Φρέσκα, ώριμα μήλα περιέχουν περίπου 15 % συνολικού υδατάνθρακες, εκ των οποίων το 10-13 % να είναι απλά

σάκχαρα. Τα πιο κοινά σάκχαρα είναι η φρουκτόζη (5-7%), σακχαρόζη (3-5%) και γλυκόζη (1-2%) (Lee et al., 1970).

Θεωρούνται επίσης και μια καλή πηγή φυτικών ινών, οι οποίες είναι γνωστές για μεγάλο ευρέως θεραπευτικών δράσεων. Συγκεκριμένα, μήλα με φλούδα περιέχουν 0.77% ίνες, οι οποίες είναι πιο αυξημένες από αυτές στο πορτοκάλι (0.34-0.50%), μπανάνα (0.50%), αχλάδια (0.60%), γκρέιπφρουτ (0.20%) και τα αχλάδια (0.64%) (Gebhardt et al., 1982). Η πηκτίνες είναι ένα ακόμα συστατικό το οποίο έχει δείξει ευεργετικά οφέλη στο πεπτικό σύστημα. Φαίνεται ότι περιέχονται σε ένα φάσμα 0.27-0.75%, ποσοστό μεγαλύτερο από τα λεμόνια, πορτοκάλια και ντομάτες. Ωστόσο, φαίνεται να διαφοροποιούνται σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την ωριμότητα αλλά και την ποικιλία του μήλου (Lee & Mattick, 1989).

Τα μήλα περιέχουν μια σχετικά μικρή ποσότητα πρωτεϊνών (λιγότερο από 0.3%) σε σχέση με πολλά φρούτα: 1.4% στα βερίκοκα, 1.03% στη μπανάνα, 1.00% στα κεράσια, 0.63% στο γκρέιπφρουτ και στα σταφύλια, 0.94% στα πορτοκάλια, 0.70% στα ροδάκινα, 0.39% στα αχλάδια (Gebhardt et al., 1982). Όπως είναι αναμενόμενο, και το περιεχόμενο σε αμινοξέα είναι επίσης χαμηλό. Τα κυρίαρχα αμινοξέα είναι το γλουταμικό και το ασπαρτικό οξύ σε φρέσκα μήλα, ακολουθούμενα από τη λυσίνη και τη λευκίνη. (Lee et al., 2012).

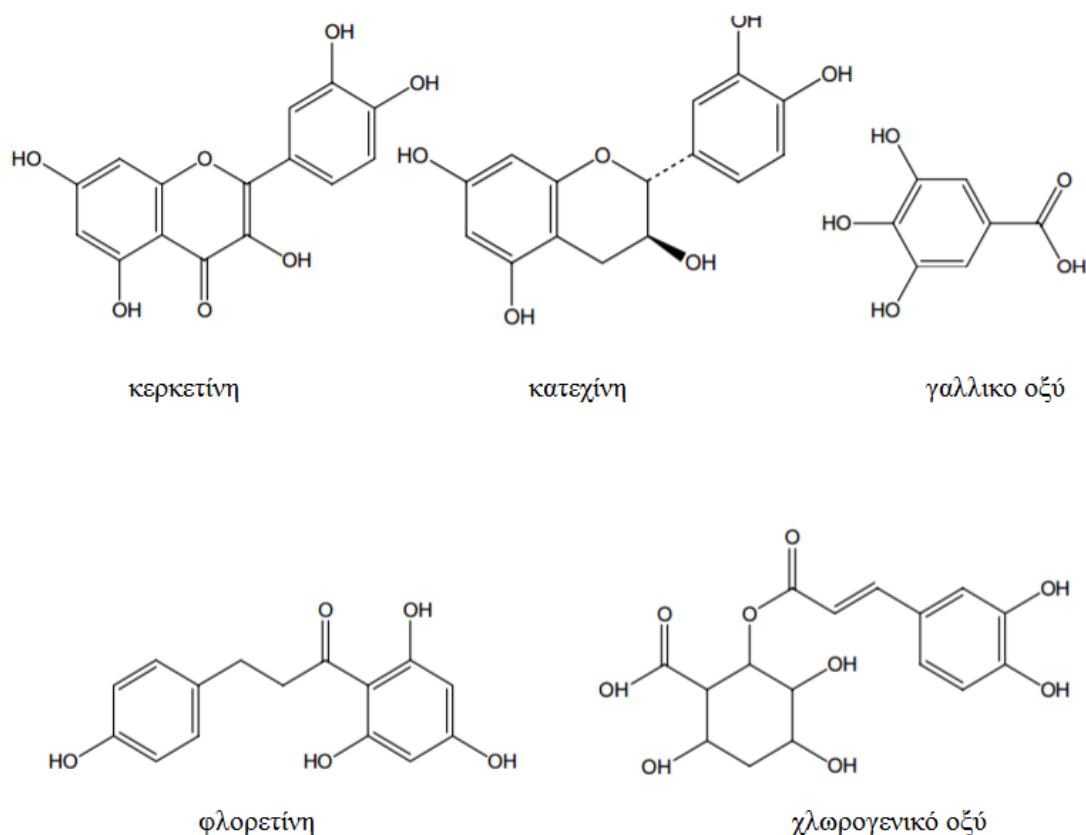
2.2.5.2. Μικροθρεπτικά συστατικά του μήλου (*Malus Domestica*)

Η περιεκτικότητα των φρέσκων μήλων σε βιταμίνες φαίνεται να έχει παραλλαγές σε σχέση με άλλα φρούτα. Η μέση περιεκτικότητα βιταμίνης C είναι περίπου 5 mg/100 g, η οποία είναι υψηλότερη από οποιαδήποτε βιταμίνη στα μήλα. Ωστόσο, η ποσότητα αυτή είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή που υπάρχει στο πορτοκάλι (45-50 mg / 100g), γκρέιπφρουτ (34-38 mg / 100g), βερίκοκα (10 mg / 100g) ή μπανάνες (9 mg / 100g). Το περιεχόμενο των άλλων βιταμινών είναι επίσης ασήμαντο σε σχέση με τις συνιστώμενες ημερήσιες προσλήψεις (RDA) (Lee et al., 2012). Σύμφωνα με αρκετές μελέτες σχετικά με το ασκορβικό οξύ και τα μήλα, βρέθηκε μεγάλη διακύμανση ανάμεσα σε δείγματα από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές όπως και εποχές συλλογής (Lee & Mattick, 1989). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι υπάρχουν διακυμάνσεις στις βιταμίνες μεταξύ φρέσκων μήλων με ή χωρίς φλούδα. Συγκεκριμένα, μήλα με

τη φλούδα έχουν μεγαλύτερα ποσά βιταμίνης C (5.7 με φλούδα/ 4.0 χωρίς φλούδα, mg/100g), φυλλικού οξέος (2.8 με φλούδα/ 0.4 χωρίς φλούδα, mg/100g) και βιταμίνη A (5.3 με φλούδα/ 4.4 χωρίς φλούδα, ισοδύναμα ρετινόλης) (Gebhardt et al., 1982).

Στα μήλα και στα υπο-προϊόντα του (χυμοί και μηλίτες), το φαινολικό περιεχόμενο καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την ποιότητα και την ποικιλομορφία του τροφίμου (Lea et al., 1990). Η συμβολή των πολυφαινολών στο ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο είναι σημαντική και η αφαίρεσή τους μπορεί να προκαλέσει μια σημαντική απώλεια αντιοξειδωτικών (Francilene et al., 2011). Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των ποιοτικών χαρακτηριστικών του χρώματος και της γεύσης, όπως η πικρή και στυφή γεύση των φρέσκων μήλων και των μεταποιημένων προϊόντων τους. Το περιεχόμενο των φαινολικών μειώνονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού, φτάνοντας σε χαμηλό επίπεδο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Awad et al., 2000).

Το μήλο περιέχει πέντε βασικές κατηγορίες πολυφαινολών: φλαβόνες, φαινολικά οξέα, διυδροχάλκονες, υδροξυ-κινναμικό οξύ και ανθοκυανίνες (Ceymann et al., 2012, Khanizadeh et al., 2008, Lamperi et al., 2008, Tsao et al., 2003, Vrhovs'ek et al., 2004, Wojdyło et al., 2008). Πολλές από τις φαινόλες συνδέονται συχνά με χαρακτηριστικές ομάδες σακχάρου (Merken et al., 2000). Συγκεκριμένα, τα σάκχαρα που εμπλέκονται είναι η γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη και αραβινόζη. Ο δισακχαρίτης ρουτινόζη έχει επίσης βρεθεί πως αποτελεί γλυκοζίτη. Το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, η κερκετίνη με 3 σάκχαρα (γαλακτοζίτης, γλυκοζίτης, ξυλοζίτης, αραβινοζίτης και ραμνοζίτης), η κατεχίνη και επικατεχίνη και τα διμερή τους, φλοριζίνη και κυανιδίνη, είναι οι κύριες πολυφαινόλες στο μήλο (McRae et al., 1990, Guyot et al., 1998, Mazza et al., 1992). Παρακάτω φαίνονται κάποιες δομές αντιοξειδωτικών ενώσεων μήλου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Δομή κάποιων αντιοξειδωτικών μήλου (Boyer, 2004)

Υπάρχουν πολλές έρευνες που μελετάνε τις επιμέρους κατηγορίες και την περιεκτικότητά τους στα μήλα. Τα κόκκινα μήλα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο από τα πράσινα, πιθανόν εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε ανθοκυανίνες (Bi X et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί πως ενώ τα μήλα περιέχουν βιταμίνη C (5.2 mg/100g), συνεισφέρει μόνο στο 0,4% του συνολικού αντιοξειδωτικού περιεχομένου (Eberhardt et al., 2000). Οι Sun et al. (2002) μέτρησαν το φαινολικό περιεχόμενο μεγάλου εύρους φρούτων και βρήκαν πως τα μήλα έχουν το δεύτερο μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικού περιεχομένου μετά τα cranberries. Οι Hertog et al. (1993) μέτρησαν πως τα μήλα ήταν μια από τις τρεις μεγαλύτερες πηγές φλαβονοειδών στην Ολλανδία μεταξύ των κρεμμυδιών και του τσαγιού. Το 22% των φαινολών προερχόμενες από φρούτα, προέρχονταν από μήλα, καθιστώντας τα τη μεγαλύτερη

πηγή στις ΗΠΑ (Vinson et al., 2001). Το συνολικό εξαγώγιμο φαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε πως ποικίλει ανάμεσα σε 110 και 357 mg/100 g φρέσκων μήλων (Podsedek et al., 2000, Liu et al., 2001).

2.3.Ευεργετική δράση του μήλου (Malus Domestica)

Είναι ευρέως γνωστό πως δίαιτα υψηλή σε φρούτα και λαχανικά μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης πολλών ασθενειών εξαιτίας των φυτοχημικών συστατικών που περιέχονται σε αυτά όπως οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή. Σύμφωνα με επιδημιολογικές έρευνες, φαίνεται πως τα μήλα παίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση πιθανότητας εμφάνισης ενός μεγάλου εύρους χρόνιων ασθενειών και στη διατήρηση ενός υγιεινού προτύπου ζωής. Συγκεκριμένα, η αυξημένη κατανάλωση μήλων συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης αρκετών μορφών καρκίνου όπως του προστάτη, του ήπατος, του παχέως εντέρου και του πνεύμονα, καρδιαγγειακών παθήσεων, άσθματος και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 σε σύγκριση με άλλα φρούτα και λαχανικά καθώς και άλλες πηγές φαινολικών ενώσεων. Η αυξημένη κατανάλωση μήλων συσχετίζεται επίσης και με καλύτερη λειτουργία πνευμόνων και απώλεια βάρους (Knekt et al., 1996, Eberhart et al., 2000, Le-Marchand et al., 2000, Xing et al., 2001).

Η γενική αντίληψη πως τα μήλα είναι θρεπτικά για την υγεία οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση των συστατικών που είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές ιδιότητές του. Η δράση αυτή μπορεί να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία αντιοξειδωτικών και συγκεκριμένα φαινολικών ενώσεων (Eberhart et al., 2000). Πολλές έρευνες έχουν καθορίσει τους μηχανισμούς με τους οποίους τα μήλα αποτρέπουν την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών. Αρχικά, η σημαντική αντιοξειδωτική δράση καταστέλλει την οξείδωση του DNA και των λιπών. Επίσης φαίνεται πως τα μήλα καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, το οποίο αποδίδεται στην ικανότητά τους να μειώνουν και την εμφάνιση πολλών μορφών καρκίνου. Τέλος φαίνεται πως παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό των λιπών καθώς μειώνουν τη χοληστερόλη σε ανθρώπους (Boyer et al., 2004).

2.4. Υποπροϊόντα μήλου με βιοδραστικό ενδιαφέρον

Πολλές μελέτες δείχνουν πως το μεγαλύτερο μέρος των αντιοξειδωτικών και συγκεκριμένα των φαινολικών ενώσεων περιέχονται στη φλούδα των μήλων παρά στη σάρκα. Συγκεκριμένα, οι φλούδες των μήλων περιέχουν μέχρι και 6 φορές περισσότερα φλαβονοειδή από ότι η σάρκα, καθώς και τα εκχυλίσματα αυτής σε σχέση με τη σάρκα (Tsao et al., 2005). Το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο μήλων ήταν υψηλότερο στην περίπτωση που αυτά περιείχαν τη φλούδα (Eberhardt et al., 2000). Ορισμένες φλαβονόλες, και ειδικότερα οι κερκετίνες βρίσκονται αποκλειστικά στις φλούδες του μήλου (Boyer & Liu, 2005, Rupasinghe et al., 2010) και έχουν μελετηθεί εκτενώς για την ισχυρή βιοδραστικότητά τους. Τα τριτερπένια, γνωστά για την αντικαρκινική τους δράση, αποτελούν, επίσης, σημαντικά συστατικά της φλούδας μήλου, με το ουρσολικό οξύ να ανιχνεύεται σε αφθονία (He & Liu, 2008).

Έρευνες μελετούν το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο της φλούδας μήλων. Οι Awad et al. (2000) μέτρησαν σε φλούδες δύο διαφορετικών ποικιλιών μήλου (Jonagold και Elstar) την ποσότητα σε φλαβονοειδή και χλωρογενικό οξύ, σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RP-HPLC). Οι Wolf et al. (2003) μελέτησαν ολικές ανθοκυανίνες με τη μέθοδο pH, ολικά φλαβονοειδή με χρωματομετρική μέθοδο, ολικές πολυφαινόλες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο με τη μέθοδο TOSC σε 4 ποικιλίες μήλων (Rome Beauty, Idared, Cortland, and Golden Delicious) σε δείγματα που περιείχαν μόνο φλούδες, μόνο σάρκα, σάρκα και φλούδες. Όλες οι παράμετροι που μετρήθηκαν βρέθηκαν στατιστικά υψηλότερες στα δείγματα που αποτελούνταν μόνο από φλούδες. Οι Giomaro et al. (2014) μελέτησαν το πολυφαινολικό προφίλ σε φλούδα και σε σάρκα ποικιλίας μήλων (Pelingo) σε περιοχές της Ιταλίας. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν σε μεθανόλη και νερό. Μετρήθηκαν ολικές ανθοκυανίνες, ολικές κατεχίνες, ολικές φλαβονόλες, ολικές πολυφαινόλες, χλωρογενικό οξύ, γλυκοζίτες κερκετίνης κ.α. . Οι μέθοδοι ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: μέθοδος του pH, Prussian Blue method, HPLC, τεστ λιποοξυγενάσης και ORAC. Κάποια από τα αποτελέσματα που βρέθηκαν ήταν πως η φλούδα περιείχε σημαντικά αυξημένες ποσότητες πολυφαινολών, όπως οι ολικές ανθοκυανίνες και ολικές κατεχίνες, σε σχέση με τη σάρκα. Οι Francilene et al. (2011) μελέτησαν το πολυφαινολικό προφίλ και το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε φλούδα και

σε σάρκα 11 ποικιλιών μήλων σε περιοχές της Βραζιλίας. Βρέθηκε πως η φλούδα περιείχε σημαντικά αυξημένες πολυφαινολικό και αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε σχέση με τη σάρκα.

Πολλές ακόμα έρευνες μελέτησαν την επίδραση των αντιοξειδωτικών της φλούδας μήλου στην υγεία. Συγκεκριμένα, οι Surangi et al. μελέτησαν την επίδραση κερκετίνης και τριτερπενίων από εκχύλισμα φλούδας μήλου στη μείωση της ολικής χοληστερόλης ορού (2012) και στην οξείδωση της LDL-χοληστερόλης (2013). Οι Nileeka et al. (2012) μελέτησαν την επίδραση των φλαβονοειδών στην καταστολή του ενζύμου ACE υπεύθυνο για τη ρύθμιση της υπέρτασης. Οι Dolores et al. (2013) μελέτησαν την επίδραση τριτερπενίων από φλούδες μήλου στα επίπεδα παραγωγής κυτοκινών υπεύθυνα για τη δημιουργία φλεγμονωδών νόσων του εντέρου. Οι Mccan et al. (2007) μελέτησαν την ευεργετική επίδραση φαινολικών ενώσεων από απόβλητα μήλων στα στάδια της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο.

Τέλος, κάποιες έρευνες μελετούν το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των σπόρων μήλων αλλά και τη χρήση τους στη βιομηχανία. Οι Ying Xu et al. (2016) μελέτησαν, εκτός των άλλων, σπόρους εφτά διαφορετικών ποικιλιών μήλου της βορειοδυτικής Κίνας. Βρέθηκε πως οι σπόροι είχαν το μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο σε σχέση με τις φλούδες ή τη σάρκα με κύριο φαινολικό συστατικό, σύμφωνα με την HPLC, τη φλοριτζίνη. Κατέληξαν πως τα εκχυλίσματα πολυφαινολών από σπόρους μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά στη βιομηχανία ως καλή πηγή αντιοξειδωτικών. Οι Fromm et al. (2012) μελέτησαν την πιθανότητα χρήσης φαινολικών εκχυλισμάτων από σπόρους μήλων στην ανάκτηση του φυσικού χρώματος αντιοξειδωτικών παρασκευασμάτων. Το μοντέλο πρότυπο ήταν το διάλλειμα φλοριτζίνης με το οποίο συγκρίθηκαν διαφορετικά μοντέλα εκχύλισης. Φάνηκε πως τα εκχυλίσματα από τους σπόρους είχαν συγκρίσιμα ακόμα και καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση και στις ιδιότητες των χρωστικών ουσιών.

3. «ΠΡΑΣΙΝΟΣ» ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1.Εισαγωγή

Η Πράσινη χημεία, λέγεται επίσης βιώσιμη χημεία, είναι μια φιλοσοφία χημικής έρευνας και μηχανικής που ενθαρρύνει τη σχεδίαση προϊόντων και διεργασιών που ελαχιστοποιούν τη χρήση και τη δημιουργία επικίνδυνων ουσιών, ενώ η Χημεία περιβάλλοντος είναι η χημεία του φυσικού περιβάλλοντος και των χημικών ρύπων στη φύση, η πράσινη χημεία επιδιώκει τη μείωση της επίδρασης της χημείας στο περιβάλλον αποτρέποντας τη μόλυνση στις πηγές της και χρησιμοποιώντας λιγότερους φυσικούς πόρους. Ως φιλοσοφία, η πράσινη χημεία εφαρμόζεται στην οργανική χημεία, στην ανόργανη χημεία, στη βιοχημεία, στην αναλυτική χημεία, στη φυσικοχημεία και ακόμα στη χημική μηχανική. Αν και η πράσινη χημεία φαίνεται να εστιάζει σε βιομηχανικές εφαρμογές, εφαρμόζεται σε οποιαδήποτε χημεία. Η χημεία αναφέρεται συχνά ως ένας τρόπος χημικής σύνθεσης που είναι συνεπής με τους σκοπούς της πράσινης χημείας. Σκοπός είναι η ελαχιστοποίηση του κινδύνου και η μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητας οποιασδήποτε χημικής επιλογής.

Οι Paul Anastas, που δούλεψε τότε στην Υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ, και ο John C. Warner ανέπτυξαν 12 αρχές της πράσινης χημείας, που βοηθούν στην επεξήγηση τι σημαίνει ο ορισμός στην πράξη. Οι αρχές που καλύπτουν τέτοιες έννοιες είναι:

- η σχεδίαση διεργασιών για τη μεγιστοποίηση της ποσότητας ακατέργαστου υλικού που καταλήγει στο προϊόν
- τη χρήση ασφαλών, φιλικών προς το περιβάλλον ουσιών, που περιλαμβάνουν διαλύτες, όπου είναι δυνατόν
- τη σχεδίαση ενεργειακά αποτελεσματικών διεργασιών
- την καλύτερη μορφή των διαθέσιμων αποβλήτων

Οι 12 αρχές είναι οι εξής:

1. Είναι καλύτερη η αποτροπή αποβλήτων από την επεξεργασία τους ή τον καθαρισμό τους μετά τον σχηματισμό τους
2. Οι μέθοδοι σύνθεσης πρέπει να σχεδιαστούν ώστε να μεγιστοποιήσουν την ενσωμάτωση όλων των χρησιμοποιούμενων υλικών στη διεργασία προς το τελικό προϊόν
3. Όπου είναι εφικτό, οι μεθοδολογίες σύνθεσης πρέπει να σχεδιαστούν ώστε να χρησιμοποιούν και να παράγουν ουσίες που έχουν λίγη ή καθόλου τοξικότητα στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον
4. Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται ώστε να διατηρούν αποτελεσματικότητα της λειτουργίας τους, ενώ μειώνουν την τοξικότητα
5. Η χρήση βοηθητικών ουσιών (π.χ. διαλύτες, παράγοντες διαχωρισμού κλπ.) πρέπει να μην γίνεται όπου είναι εφικτό και να είναι αβλαβείς όταν χρησιμοποιούνται
6. Πρέπει να αναγνωρίζονται και να ελαχιστοποιούνται οι ενεργειακές απαιτήσεις λαμβάνοντας υπόψη τα περιβαλλοντικά και οικονομικά αποτελέσματα. Οι μέθοδοι σύνθεσης πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος
7. Ένα ακατέργαστο υλικό ή πρώτη ύλη πρέπει να είναι ανανεώσιμο αντί να εξαντλείται όπου είναι τεχνικά και οικονομικά εφικτό
8. Μείωση παραγώγων – Πρέπει να αποφεύγεται αναίτια δημιουργία παραγώγων (ομάδα προστασίας, προστασία/αποπροστασία, προσωρινή τροποποίηση), όπου είναι εφικτό.
9. Τα καταλυτικά αντιδραστήρια (όσο το δυνατό πιο επιλεκτικά) είναι ανώτερα από τα στοιχειομετρικά αντιδραστήρια
10. Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε μετά το τέλος της λειτουργίας τους να μην παραμένουν στο περιβάλλον και να μην διασπώνται σε επιβλαβή προϊόντα αποσύνθεσης
11. Οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να αναπτυχθούν παραπέρα για να επιτρέπουν την παρακολούθηση και τον έλεγχο σε πραγματικό χρόνο κατά τη διεργασία πριν το σχηματισμό επικίνδυνων ουσιών
12. Οι ουσίες και οι χρησιμοποιούμενες μορφές τους σε μια χημική διεργασία πρέπει να επιλέγονται ώστε να ελαχιστοποιούνται οι δυνητικοί κίνδυνοι για χημικά ατυχήματα, συμπεριλαμβανομένων των εκλύσεων, εκρήξεων και πυρκαγιών (Anastas et al., 2010)

Έχουν γίνει προσπάθειες όχι μόνο για ποσοτικοποίηση του πράσινου μιας χημικής διεργασίας, αλλά επίσης να συσχετίζεται με άλλες μεταβλητές όπως απόδοση, την αξία των συστατικών της αντίδρασης, την ασφάλεια στον χειρισμό χημικών, τις απαιτήσεις υλικών, την ενεργειακή χρήση και την ευκολία επεξεργασίας και καθαρισμού του προϊόντος. Σε μια ποσοτική μελέτη των Van Aken et al. (2006) η αναγωγή του νιτροβενζολίου σε ανιλίνη δέχεται 64 σημεία από τα 100 της βαθμολογίας ως μια αποδεκτή γενικά σύνθεση, ενώ η σύνθεση ενός αμιδίου χρησιμοποιώντας HMDS περιγράφεται ως επαρκής μόνο σε 32 σημεία.

Η πράσινη χημεία εμφανίζεται με αυξανόμενους ρυθμούς ως ένα ισχυρό εργαλείο που οι ερευνητές πρέπει να χρησιμοποιήσουν για να αξιολογήσουν την περιβαλλοντική επίδρασή της νανοτεχνολογίας. Καθώς τα νανοϋλικά αναπτύσσονται, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις καθώς και οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και των προϊόντων αυτών καθ'αυτών και των διεργασιών παραγωγής τους πρέπει να εξεταστούν για να επιβεβαιώσουν τη μακροχρόνια οικονομική τους βιωσιμότητα (Karm et al., 2008).

3.2. «Πράσινη» εκχύλιση-τεχνικές

Η πράσινη εκχύλιση είναι η ανακάλυψη και η εφεύρεση χημικών προϊόντων, δημιουργία μη επικινδύνων ουσιών και σχεδιασμός νέων διαδικασιών εκχύλισης οι οποίες μειώνουν την κατανάλωση ενέργειας, επιτρέπουν τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών και ανανεώσιμων φυσικών προϊόντων και εξασφαλίζουν ασφαλή και υψηλής ποιότητας/ποσότητας εκχυλίσματα (Chemat et al., 2012).

Σε μεγάλο αριθμό κλάδων της παραγωγής αλλά και των υπηρεσιών, χρησιμοποιούνται σήμερα σημαντικές ποσότητες διαλυτών, δηλαδή υγρών χημικών ενώσεων ή μιγμάτων αυτών, που επιτυγχάνουν τη διάλυση ουσιών αδιάλυτων στο νερό. Παρά την ευρεία εφαρμογή τους οι οργανικοί (πετροχημικώς παραγόμενοι) διαλύτες συνδέονται με οικονομικά και περιβαλλοντικά θέματα, καθώς επίσης με θέματα υγιεινής και ασφάλειας. Οι εναλλακτικές λύσεις που είναι σήμερα διαθέσιμες αφορούν την εφαρμογή διεργασιών παραγωγής χωρίς την παρουσία – χρήση διαλυτών ή την αποτελεσματικότερη ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση των ήδη

υπαρχόντων διαλυτών ή την αντικατάστασή τους με άλλους λιγότερο τοξικούς, π.χ. με τους «πράσινους» διαλύτες.

Παρά την ευρεία εφαρμογή τους οι οργανικοί πετροχημικώς παραγόμενοι διαλύτες συνδέονται με ποικίλα θέματα οικονομικά, περιβαλλοντικά, υγιεινής και ασφάλειας, εφόσον οι διαλύτες αποτελούν σημαντικό μέρος του προβλήματος της εκπομπής πτητικών οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα (Volatile Organic Compounds, VOCs). Είναι, λοιπόν, ευνόητο ότι η εύρεση εναλλακτικών λύσεων για τον περιορισμό ή την αντικατάσταση της χρήσης των πετροχημικών διαλυτών, όχι μόνο θα δώσει μια οικολογικά (περιβαλλοντικά) αποδεκτή λύση, αλλά θα ανακουφίσει και τη βιομηχανία διαλυτών από ένα σημαντικό έξοδο.

Οι εναλλακτικές λύσεις που είναι σήμερα διαθέσιμες αφορούν την εφαρμογή διεργασιών παραγωγής χωρίς την παρουσία – χρήση διαλυτών ή την αποτελεσματικότερη ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση των ήδη υπαρχόντων διαλυτών ή την αντικατάστασή τους με άλλους λιγότερο τοξικούς, π.χ. με τους «πράσινους» διαλύτες. Οι «πράσινοι» διαλύτες που χρησιμοποιούνται σήμερα με επιτυχία είναι κυρίως αυτοί, που προέρχονται από τον συνδυασμό οργανικών ενώσεων με το φθόριο, τα ιονικά (ή ιοντικά) υγρά (ionic liquids), το υπερκρίσιμο CO₂, το υπερκρίσιμο νερό, καθώς και οι φυσικοί διαλύτες, που προέρχονται ή παράγονται από τη βιομάζα.

Η βιομάζα αποτελείται από τρία κυρίως συστατικά: την *κυτταρίνη* (σε ποσοστό μέχρι και 50% της συνολικής μάζας), την *ημι-κυτταρίνη* και τη *λιγνίνη*. Τα δευτερεύοντα συστατικά της βιομάζας είναι, κυρίως, πρωτεΐνες, τέφρα, άμυλο, άλγη και άλλες μη-υδατανθρακικές ενώσεις. Οι σημαντικότερες κατηγορίες βιο-βασισμένων προϊόντων περιλαμβάνουν:

- **Προϊόντα βιο-βασισμένα σε σάκχαρα και άμυλο**, που παράγονται με ζύμωση και διάφορες θερμο-χημικές διαδικασίες, τα οποία περιλαμβάνουν αλκοόλες, οξέα, άμυλο, κόμμι ξανθάνης κτλ.
- **Προϊόντα βιο-βασισμένα σε λάδια και λιπίδια**, που περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα, ρητίνες, γλυκερόλη κτλ.

- **Χημικές ουσίες κόμμεων και ξύλου**, που περιλαμβάνουν ρητίνες, την πίσσα, τα λιπαρά οξέα και άλλες χημικές ουσίες που προέρχονται από τα δέντρα.
- **Τα παράγωγα, οι ίνες και τα πλαστικά κυτταρίνης**, που περιλαμβάνουν τα προϊόντα που παράγονται από την κυτταρίνη.
- **Τα βιομηχανικά ένζυμα** χρησιμοποιούνται ως *βιοκαταλύτες* για ποικίλες βιοχημικές αντιδράσεις στην παραγωγή του αμύλου και των σακχάρων, των αλκοολών και των ελαίων.

Η χρήση της βιομάζας μειώνει, αλλά και σε πολλές περιπτώσεις σταθεροποιεί, τις εκπομπές του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα. Μια χημική βιομηχανία χρησιμοποιώντας ένα σημαντικό ποσοστό ανανεώσιμων υλικών είναι ασφαλής, όσον αφορά την τροφοδοσία της, διότι οι πρώτες ύλες της είναι τοπικά διαθέσιμες. Η χρήση της βιομάζας, όμως, συνεπάγεται ταυτόχρονα αυξημένο κόστος, απαιτήσεις σε μεγάλη έκταση αρόγιμης γης και μη-άμεση κερδοφορία από τη χρήση της.

Η γλυκερόλη είναι ένα υποπροϊόν που παράγεται από την *trans*-εστεροποίηση φυτικών ελαίων. Είναι πολύ συνηθισμένη στη βιομηχανία καλλυντικών ως διαλύτης για τη εκχύλιση των βοτάνων και μπαχαρικών. Παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, μεταξύ των οποίων ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, θρεπτικό συστατικό σε ζυμοτεχνικές βιομηχανίες καθώς και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (νιτρογλυκερίνη), στο ηλεκτρονικό τσιγάρο ως υγρό - βάση αναπλήρωσης φίλτρων, εντός της οποίας προστίθενται αρώματα και νικοτίνη. (Chemat et al., 2012, Wiki)

Σύμφωνα με τις αρχές της πράσινης χημείας, η γλυκερόλη είναι ένα πρότυπο παράδειγμα πράσινου διαλύτη. Στην πραγματικότητα, προτείνεται από τους Jerome et al. (2008) πως η γλυκερόλη είναι το «οργανικό» νερό, καθώς είναι άφθονη, βιοδιασπώμενη, φθηνή, μη τοξική, πολύ πολική, μη αναμίξιμη με υδρογονάνθρακες, ικανή να σχηματίσει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και είναι σε θέση να διαλύσει ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Επιπλέον, σε σύγκριση με το νερό, έχει υψηλότερο σημείο βρασμού, χαμηλότερη τάση ατμών

και διαλύει οργανικές ενώσεις μη αναμίξιμες με το νερό (Diaz-Alvarez et al., 2014). Τέλος, δείχνει παρόμοιες ιδιότητες με ένα ιοντικό υγρό και έχει υψηλό δυναμικό για να χρησιμεύσει ως πράσινος διαλύτης για οργανικές συνθέσεις. Ιοντικά υγρά εφαρμόζονται σε πράσινη εκχύλιση φυσικών προϊόντων για την αυξημένη εκχυλιστική τους ικανότητα, υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα, και ως μη εύφλεκτοι διαλύτες (Wolson et al., 2006)

Η εκχύλιση υποπροϊόντων φυτών μπορεί να γίνει με πολλές μεθόδους εκχύλισης. Μη-συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ή τεχνικές «πράσινης» εκχύλισης, ακολουθώντας τα πρότυπα του Environmental Protection Agency of the USA (http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html), θεωρούνται αυτές οι οποίες είναι φιλικές προς το περιβάλλον εξαιτίας της μειωμένης χρήσης συνθετικών και οργανικών χημικών, μειωμένου χρόνου παρασκευής και καλύτερη ποιότητα του εκχυλισμένου προϊόντος. Αυτές οι τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 50 χρόνια και περιλαμβάνουν τις παρακάτω: υπέρηχοι (ultrasound), παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (pulsed electric field), πέψη ενζύμου (enzyme digestion), εξώθηση (extrusion), φούρνο μικροκυμάτων (microwave heating), ωμική θέρμανση (ohmic heating), υπερκρίσιμα υγρά (supercritical fluids) και επιταχυνόμενοι διαλύτες (accelerated solvents) (Azmir et al., 2013)

3.3. Μελέτες σχετικές με το περιεχόμενο των φυτικών υποπροϊόντων

Υπάρχει μια μεγάλη πληθώρα ερευνών στη βιβλιογραφία που μελετούν την περιεκτικότητα των φυτικών υποπροϊόντων σε αντιοξειδωτικές ουσίες με στόχο την μελλοντική αξιοποίηση τους. Παρακάτω περιγράφονται κάποιες από αυτές.

Οι Tlili et al. (2010) μελέτησαν το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο κάπαρης (*Capparis spinosa*) και το σύγκριναν με άλλα φρούτα. Συγκεκριμένα, φάνηκε πως τα φύλλα και τα άνθη είχαν σημαντικά υψηλά ποσά συνολικού φαινολικού περιεχομένου (403 και 643 mg/dL) σε σχέση με το mango, 208 mg/dl (Ribeiro et al., 2007), bilberry, 525 mg/dL (Prior et al., 2010) και raspberry, 517 mg/dL (Wada et al., 2002). Μετρήθηκαν επίσης και οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή και η βιταμίνη C.

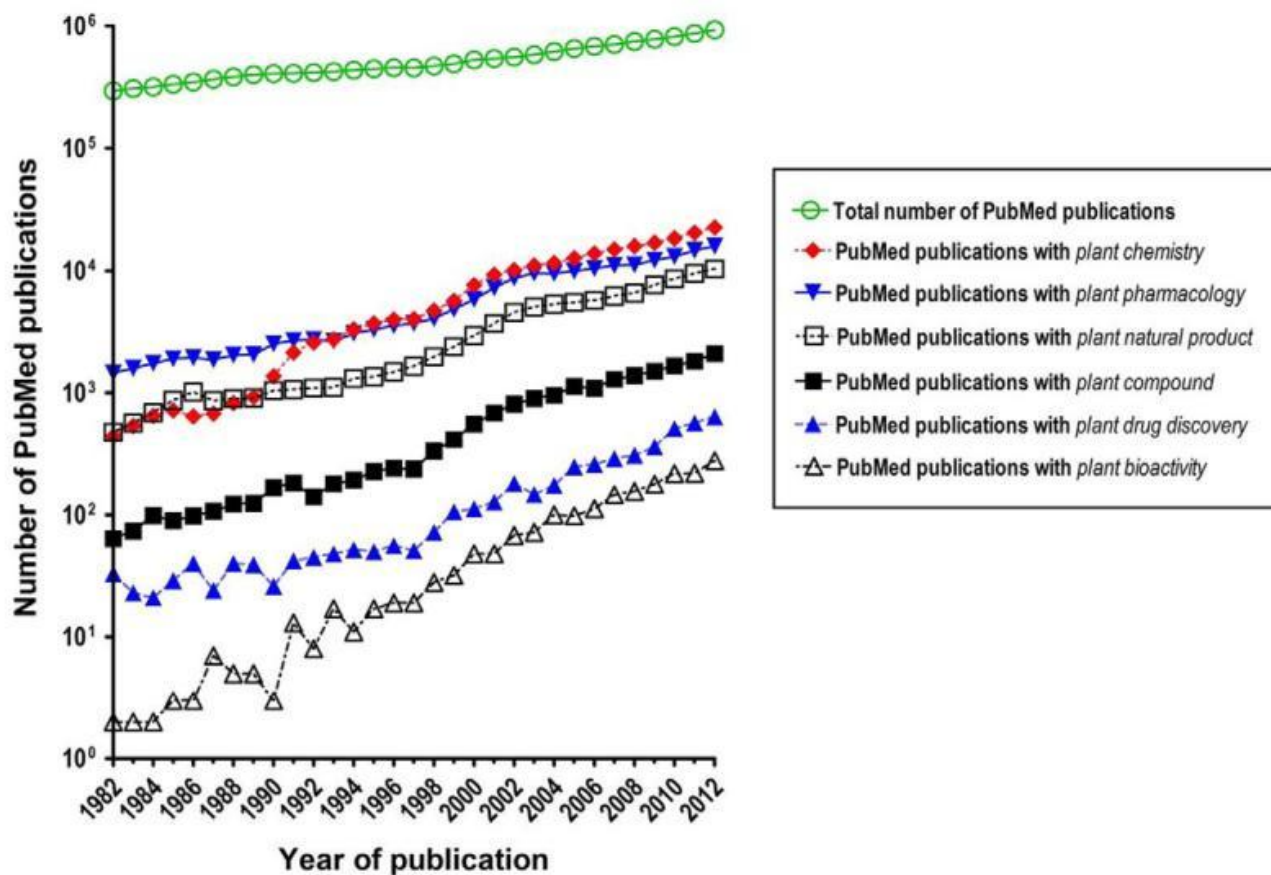
Οι Park et al. (2007) μελέτησαν την πιθανή εκμετάλλευση καρπών και φλουδών κρεμμυδιών. Τα υποπροϊόντα εκχυλίστηκαν σε διαλύματα αιθανόλης. Ο στόχος ήταν να εκτιμηθεί η ευεργετική επίδραση στην υπεροξειδωση των λιπών και στην καταστροφή του DNA σε ποντίκια.

Οι Boggia et al. (2016) μελέτησαν την πιθανή εκμετάλλευση καρπών και φλουδών ροδιού, απόβλητα τα οποία είναι βρώσιμα αλλά πετιούνται και θεωρούνται άχρηστα μετά από την εκχύμωση του φρούτου. Τα υπο-προϊόντα εκχυλίστηκαν με υπερήχους και μικροκύματα. Όσον αφορά τη βιομηχανία τροφίμων, ο στόχος ήταν να εμβαπτίσουν φλούδες μήλου με το εκχύλισμα που πάρθηκε, ενώ όσον αφορά τη βιομηχανία καλλυντικών, ο στόχος ήταν να εμπλουτίσουν gel προσώπου με το εκχύλισμα.

Οι Nowsheri et al. (2015) συνέλεξαν πλήθος ερευνών με στόχο τη διερεύνηση των συστατικών, της βιοδιαθεσιμότητας, των ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία και την πιθανή εκμετάλλευση των σπόρων σταφυλιών/υποπροϊόντων αυτών. Οι ιδιότητες που έχουν στις ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία βρέθηκαν να είναι αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιμικροβιακές, νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις. Έτσι, εκτός των άλλων αποτελεσμάτων, τα φυσικά εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων ως αντικατάσταση των χημικώς παραγόμενων συνθετικών αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ουσιών.

Οι Akyol et al. (2016) συνέλεξαν πλήθος ερευνών με στόχο τη διερεύνηση του συνολικού φαινολικού και αντιοξειδωτικού περιεχομένου και των ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία καθώς και την πιθανή εκμετάλλευση της πατάτας και της φλούδας της. Παρατηρήθηκε πως η πατάτα περιέχει ένα μεγάλο εύρος φαινολικών συστατικών. Αν και περιέχει μικρή ποσότητα αντιοξειδωτικών σε σχέση με άλλα φυτά, φαίνεται πως η αυξημένη κατανάλωσή της παγκοσμίως προάγει τη συνολική ημερήσια πρόσληψη πολυφαινόλων και αντιοξειδωτικών ουσιών.

Ένας μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών σκευασμάτων έχει εμπνευστεί ή δημιουργηθεί από φυτικά προϊόντα. Κάποια αντιπροσωπευτικά παραδείγματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 7. Αριθμός δημοσιευμένων ερευνών για τα φυτικά προϊόντα και τις πιθανές χρήσεις τους από την βάση δεδομένων PubMed (<http://webtools.mf.uni-lj.si/public/medsum.html>)

Ένα μεγάλο μέρος των φυτικών προϊόντων χρησιμοποιούνται ως αναλγητικά. Ο φλοιός του δέντρου της ιτιάς είναι γνωστό από την αρχαιότητα πως έχει ιδιότητες ανακούφισης από τον πόνο. Αυτό οφείλεται στην παρουσία της φυσικά υπαρκτής ουσίας σαλικίνης η οποία υδρολύεται στη συνέχεια σε ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Ένα συνθετικό παράγωγο του ακετυλοσαλικυλικού οξέος είναι η γνωστή ασπιρίνη. Επίσης, ένας σημαντικός αριθμός αντιμολυσματικών φαρμάκων βασίζονται σε φυτικά προϊόντα, όπως είναι η πενικιλίνη. (Atanasov et al., 2015)

ΣΚΟΠΟΣ

Οι φλούδες του μήλου, υπο-προϊόντα των μήλων, θεωρούνται μια φθηνή και πλούσια πηγή πολυφαινολών η οποία μπορεί να εκχυλιστεί και να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη προϊόντων που προάγουν την υγεία. «Πράσινες» τεχνικές εκχύλισης χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάκτηση συστατικών. Η γλυκερόλη θεωρείται ιδανική περίπτωση «πράσινου», μη-συμβατικού διαλύτη για την εκχύλιση πολυφαινολών καθώς είναι μη-τοξική, βιοδιασπώμενη και έχει ψηλό σημείο βρασμού. Για την ενίσχυση της παραλαβής των πολυφαινολών χρησιμοποιούνται και οι κυκλοδεξτρίνες. Είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ενθυλάκωση συστατικών στο εσωτερικό τους, δημιουργώντας σύμπλοκα εγκλεισμού, με στόχο την προστασία από αντιδράσεις οξείδωσης και την αύξηση της διαλυτότητάς τους.

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτελεί ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη λειτουργικών εκχυλισμάτων και συμπλόκων από υπο-προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, χρησιμοποιώντας «πράσινους διαλύτες» και επιχειρώντας ενθυλάκωση σε φορέα για τη μεγαλύτερη σταθερότητα των συμπλόκων.

Συγκεκριμένα, αντικείμενο είναι η βελτιστοποίηση της διαδικασίας της εκχύλισης για την επιτυχή παραλαβή πολυφαινολών από 7 ποικιλίες μήλου της Ελλάδας, χρησιμοποιώντας πράσινους διαλύτες, νερό/γλυκερόλη/β-κυκλοδεξτρίνη σε 16 διαφορετικούς συνδυασμούς αλλάζοντας ταυτόχρονα και τη θερμοκρασία της εκχύλισης. Η βελτιστοποίηση βασίστηκε στον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, η αντιοξειδωτική ικανότητα, το περιεχόμενο σε ολικά φλαβονοειδή και η αναγωγική ικανότητα.

Επιπρόσθετος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της γλυκερόλης και των κυκλοδεξτρίνων στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και τελικά στην επιτυχή παραλαβή των πολυφαινολών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΛΟΥΔΑΣ ΜΗΛΟΥ ΣΕ Β-HD-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ

1.1. Παραλαβή ξηρών δειγμάτων φλούδας μήλων

Για την ενθυλάκωση συστατικών της φλούδας μήλου σε β-HD-κυκλοδεξτρίνη παραλήφθηκαν ποσότητες 7 ποικιλιών μήλων (Golden Delicious, Pink Lady, Jonathan, Red Chief, Fuji, Granny Smith, Φιρίκι) από την περιοχή της Λάρισας.

Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα

- Μήλα 7 ποικιλιών

Όργανα

- Ουροσυλλέκτες
- Λυοφιλιωποιητής (Aaosi)
- Πολυκόφτης Multi IZZY plus 500

Τα μήλα ξεφλουδίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε ουροσυλλέκτες`1 στους -40°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε λυοφιλίωση για την απομάκρυνση της υγρασίας. Ο λυοφυλιωτής (Aaosi) λειτουργούσε με πίεση για 5 ημέρες. Τα ξηρά δείγματα κονιοποιήθηκαν με τη χρήση Πολυκόφτη Multi IZZY plus 500 και τοποθετήθηκαν εκ νέου στους -40°C.

1.2. Εκχυλίσαις δειγμάτων φλούδας μήλου

Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα

- Ξηρό δείγμα φλούδας μήλου
- β-Hydroxypropyl-κυκλοδεξτρίνη (Sigma Aldrich, H107)
- Γλυκερόλη

- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Σπάτουλα
- Πλάκα ανάδευσης με θερμοστάτη
- Μαγνητικοί αναδευτήρας
- Θερμόμετρο
- Ηθμοί διήθησης υδατικών διαλυμάτων (616)
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Γυάλινα χωνία
- Κωνικές φιάλες χωρητικότητας 100 ml
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες με πώμα

Αναλυτική πορεία

Η κάθε ποικιλία μήλου υποβλήθηκε σε μια σειρά 16 εκχυλίσεων διαφορετικών αναλογιών β-Hydroxypropyl-κυκλοδεξτρίνης, γλυκερόλης, απιονισμένου νερού σε διαφορετικές θερμοκρασίες, σύμφωνα με τον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Πειραματικές τιμές των μεταβλητών των εκχυλίσεων

	β-Hydroxypropyl- κυκλοδεξτρίνη (C _{CD}) (%w/v)	Γλυκερόλη (C _{gl}) (%w/v)	Θερμοκρασία (T) (°C)
1	1	0	40
2	1	0	80
3	1	60	40
4	1	60	80
5	13	0	40
6	13	0	80
7	13	60	40
8	13	60	80
9	1	30	60
10	13	30	60
11	7	0	60
12	7	60	60
13	7	0	40
14	7	30	80
15	7	30	60
16	7	30	60

Ποσότητα ξηρού δείγματος φλούδας μήλου (περίπου 0,5 g), ζυγίστηκε σε κωνική φιάλη και αναμίχθηκε με 25 ml κατάλληλων αναλογιών νερού, γλυκερόλης, β-Hydroxypropyl-κυκλοδεξτρίνης. Το ξηρό δείγμα φλούδας μήλου υποβλήθηκε σε ανάδευση υπό θέρμανση, στις 600 rpm για 120 min. Με το πέρας της εκχύλισης, τα δείγματα διηθηθήκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πόμα και αποθηκεύθηκαν στους -40°C για περαιτέρω ανάλυση.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

2.1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FCR) ή το αντιδραστήριο φαινόλης ή αντιδραστήριο Folin-Denis, όπως ονομάζεται επίσης η μέθοδος ισοδυναμίας γαλλικού οξέος (GAE), είναι ένα μίγμα φωσφορομολυβδαινίου και φωσφοβολφραμίου χρησιμοποιείται για τον *in vitro* προσδιορισμό των φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών (Singleton et al., 1999). Το αντιδραστήριο δεν μετρά μόνο το φαινολικό περιεχόμενο αλλά αντιδρά με κάθε αναγωγική ουσία. Ως εκ τούτου, μετρά τη συνολική αναγωγική ικανότητα του δείγματος, και όχι μόνο φαινολικές ενώσεις (Grossi et al., 2015). Επειδή μετρά αντιοξειδωτικό δυναμικό *in vitro*, το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση τροφίμων και συμπληρωμάτων ως μία απλή και γρήγορη ποιοτική μέθοδος στη βιομηχανία τροφίμων.

Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) (CHEMLAB)
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher)
- Απεσταγμένο νερό
- Γαλλικό οξύ ως πρότυπη ουσία (Gallic acid, GA)

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
- Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
- Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
- Κυκλοαναδευτήρας Vortex (Selectra)

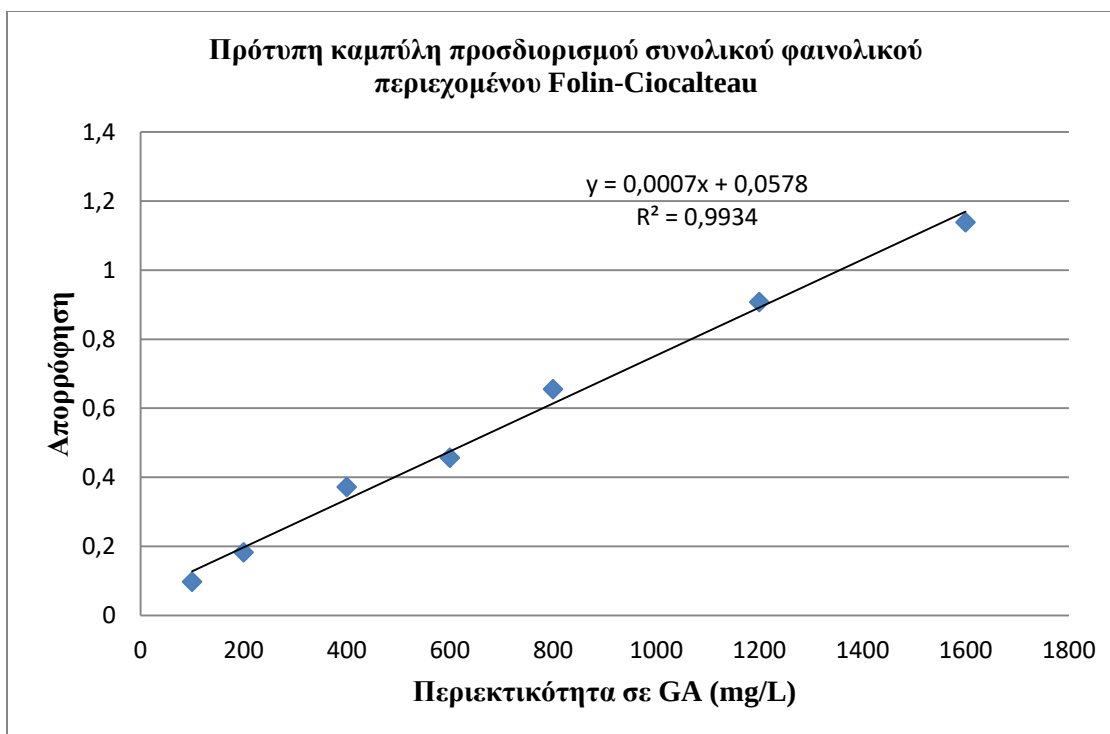
- Φωτόμετρο ELISA (ELISAreader) SUNRISE TECAN

Αναλυτική πορεία

Σε ένα eppendorf τοποθετούνται 790 μL απεσταγμένο νερό 10 μL εκχυλίσματος κατάλληλα αραιωμένο και ακολούθως 50 μL αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu. Ακολουθεί ανάδευση και μετά από 1 min προστίθενται 150 μL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 20% w/v). Το μείγμα ανακινείται πάλι και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 120 min. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο δείγμα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος και εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Το γαλλικό οξύ διαλύεται σε EtOH).

Παρασκευή προτύπων Gallic acid για κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Από μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος παρασκευάζεται, με αραιώση, μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 1600 $\mu\text{g/mL}$ ή mg/L (0,08 g Gallic Acid σε 50 ml EtOH). Από το μητρικό διάλυμα παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 100, 200, 400, 600, 800 και 1200 mg/L . Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό του πολυφαινολικού περιεχομένου των αραιωμένων διαλυμάτων του γαλλικού οξέος. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 750 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς. (Σχήμα 8).

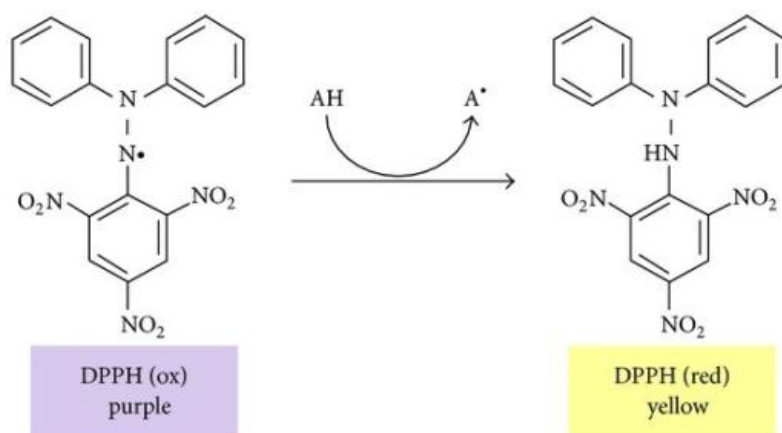


Σχήμα 8. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Gallic acid_GAE) mg/L

2.2. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH*)

Το DPPH είναι μια σύντηξη της οργανικής χημικής ένωσης 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο. Είναι μία σκουρόχρωμη κρυσταλλική σκόνη που αποτελείται από σταθερά μόρια ελεύθερων ριζών. Το DPPH έχει δύο κύριες ερευνητικές εφαρμογές εργαστηριακά: χρησιμοποιείται στις χημικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες σε απλές δοκιμές αντιοξειδωτικών και ως πρότυπο της θέσης και της έντασης των σημάτων των ηλεκτρονίων παραμαγνητικού συντονισμού (Om , Tej, 2009). Το DPPH είναι μια πολύ γνωστή ρίζα και μια παγίδα «σαρωτής» για άλλες ρίζες. Ως εκ τούτου , μείωση του ρυθμού της χημικής αντίδρασης κατά την προσθήκη του DPPH χρησιμοποιείται ως δείκτης της φύσης της ρίζας της αντίδρασης. Λόγω της ισχυρής ζώνης απορρόφησης επικεντρωμένη περίπου στα 520 nm , η ρίζα DPPH έχει ένα βαθύ βιολετί χρώμα σε διάλυμα, και γίνεται άχρωμο ή υποκίτρινο όταν εξουδετερωθεί.

Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει την οπτική παρακολούθηση της αντίδρασης, και ο αριθμός των αρχικών ριζών μπορεί να μετρηθεί από την αλλαγή της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm ή από το σήμα EPR του DPPH (Alger, 1997).



Εικόνα 6. Μηχανισμός δράσης DPPH

Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Trolox (Fluca)
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Aldrich)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher)

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
- Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
- Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μ L), με τα αντίστοιχα tips
- Κυκλοαναδευτήρας Vortex (Selectra)
- Φωτόμετρο ELISA (ELISAreader) SUNRISE TECAN

Αναλυτική πορεία

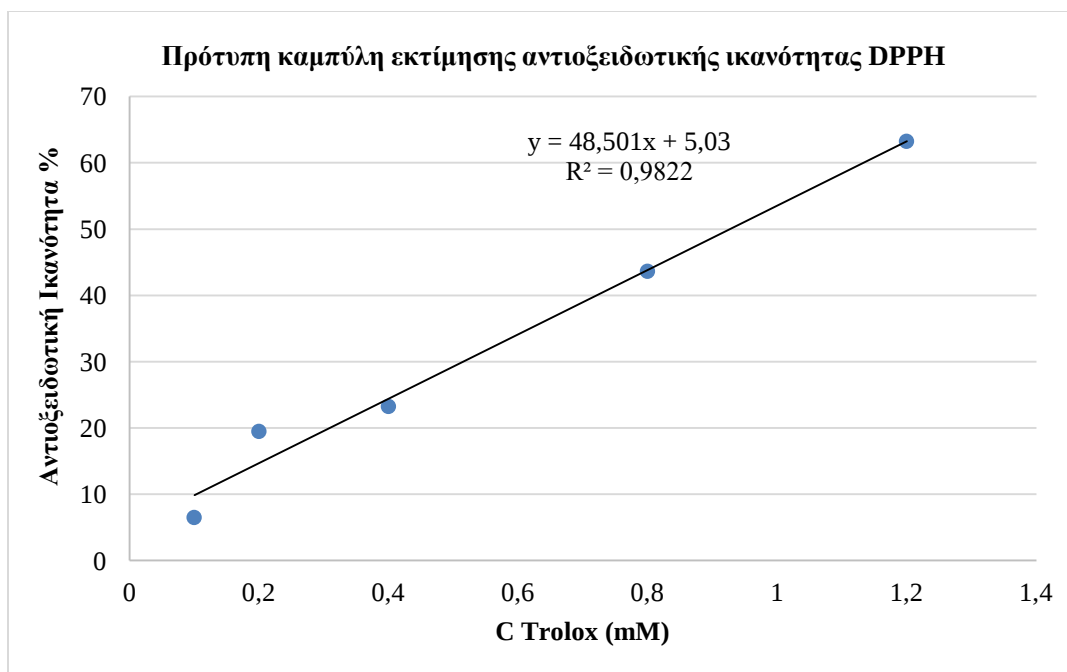
Πριν την έναρξη της διαδικασίας παρασκευάζεται διάλυμα DPPH σε MeOH (100 μ M), ζυγίζονται 0,0099 g σκόνης DPPH και διαλύεται σε 250 ml MeOH. Για την παρασκευή των διαλυμάτων, τοποθετούνται σε ένα erppendorf 25 μ l δείγματος κατάλληλα διαλυμένο και ακολουθεί προσθήκη 975 μ l διαλύματος DPPH (100 μ M σε MeOH) και ανάδευση στο vortex. Το δείγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30 min στο σκοτάδι. Τοποθετείται τα δείγματα σε κυψελίδες και φωτομετρούμε στα 515 nm. Οι τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων προσαρμόζονται στον παρακάτω τύπο και προκύπτει η % μείωση των ριζών DPPH, δηλαδή το ποσοστό των ριζών που δεσμεύτηκαν (ανάλογο της βιταμίνης E):

$$\%DPPH_{ΜΕΙΩΣΗ} + \%ΔA_{515} = [(A_{DPPH} - A_{δείγματος}) / A_{DPPH}] * 100$$

Παράλληλα κατασκευάζετε καμπύλη αναφοράς Trolox (ανάλογο της Βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox.

Παρασκευή προτύπων Trolox για κατασκευή καμπύλης αναφοράς (1,6 mM)

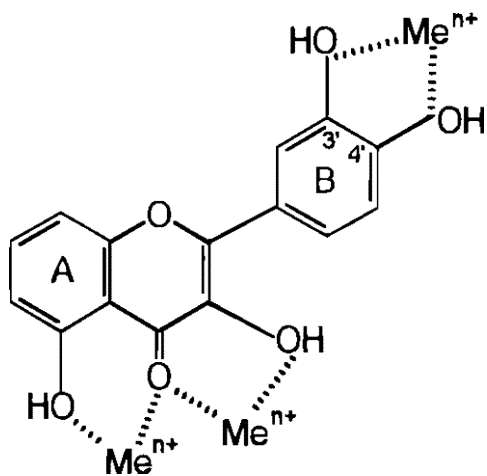
Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται τα πρότυπα Trolox σε MeOH (μεθανόλη), ξεκινώντας από συγκέντρωση 1,6 mM και πηγαίνοντας διαδοχικά, με κατάλληλες αραιώσεις στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (1,2 mM, 0,8 mM, 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM). Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Για τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 515 nm υπολογίζεται η % ΔA_{515} σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο. Οι τιμές % ΔA_{515} και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων Trolox χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τα ισοδύναμα Trolox (mM)

2.3. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

Για την ανάπτυξη μεθόδων για την εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται σε ένα φυτικό εκχύλισμα κατέληξαν στη βελτιστοποίηση πολλών πρωτοκόλλων που στηρίζονται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης μεταξύ μετάλλων και φλαβονοειδών. Τα έγχρωμα προϊόντα της συμπλοκοποίησης μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Naczki and Shahidi, 2006). Παρόλο που συνιστώνται τέτοιου τύπου χρωματομετρικές δοκιμές, η εκλεκτικότητά τους θεωρείται αμφισβητήσιμη στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα (Harborne, 1989, Voirin et al, 1990). Σε ένα φλαβονοειδές τα πιθανά κέντρα συμπλοκοποίησης είναι οι κατεχολικές ομάδες δακτυλίου B και οι 3- 5- υδροξυ 4-καρβονυλο ομάδες των δακτυλίων A και C.



Εικόνα 7. Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών-μετάλλων (Pietta, 2000)

Στην περίπτωση υποστρωμάτων με ταυτόχρονη παρουσία φλαβονοειδών και άλλων ενώσεων που έχουν παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά με αυτά των φλαβονοειδών (κατεχολικές ομάδες) υπάρχει κίνδυνος λανθασμένων εκτιμήσεων (συμπροσδιορισμός). Βιβλιογραφικά, η εκτίμηση των δοκιμών έγκειται στην απουσία ή αρουσία NaNO_2 και την ύπαρξη ή όχι οξέος. Παλαιότερη προσέγγιση- συμπλοκοποίηση απουσία NaNO_2 - ο σχηματισμός του συμπλόκου πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον, που πιθανώς αποτρέπει τη συμμετοχή κατεχολικών ομάδων στη συμπλοκοποίηση.

Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher)
- Απιονισμένο νερό
- Πρότυπη κερκετίνη
- Διάλυμα οξικού οξέος 5%, AcAc 5% (5 ml οξικό οξύ σε 100 ml MeOH)
- Διάλυμα χλωριούχου αργιλίου 2%, AlCl_3 2% (2 g AlCl_3 σε 100 mL (95ml MeOH/ 5 οξικό οξύ)

Όργανα

- Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
- Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
- Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μ L), με τα αντίστοιχα tips
- Κυκλοαναδευτήρας Vortex (Selectra)
- Φωτόμετρο ELISA (ELISAreader) SUNRISE TECAN

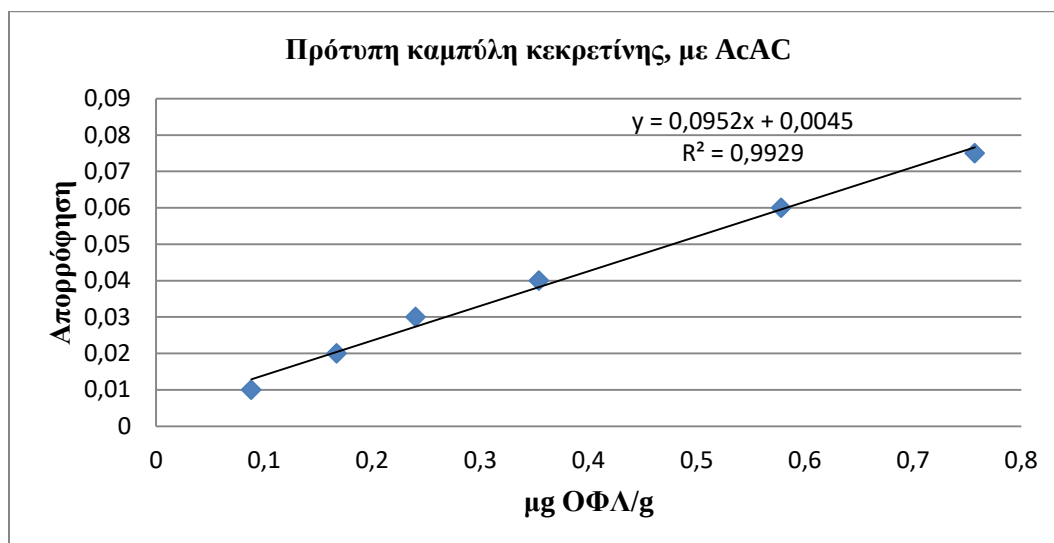
Αναλυτική πορεία

Σε 0.5ml (ή 1 mL) μεθανολικού διαλύματος κατάλληλης αραιώσης (συνήθως αραιώση 1:10) εκχυλίσματος ή προτύπου σε κατάλληλη συγκέντρωση προστίθεται διαδοχικά 50 (ή 100) μ L διαλύματος AlCl_3 (2% AlCl_3 σε μίγμα μεθανόλη/οξικό οξύ, 95/5, v/v) και 700 μ l ή 1,4 mL μεθανολικού διαλύματος οξικού οξέος 5%. Η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου στα 415 nm μετράται ως προς διάλυμα αναφοράς μετά την παρέλευση χρόνου 30 min. Διόρθωση των τιμών απορρόφησης πραγματοποιείται με αφαίρεση της αρχικής απορρόφησης (415 nm) αντίστοιχου διαλύματος στο περιβάλλον της αντίδρασης απουσία του αντιδραστηρίου. Τα αποτελέσματα (μέση τιμή δύο μετρήσεων) εκφράζονται ως $\mu\text{g OΦΛ/g}$ εκχυλίσματος μέσω κατάλληλης καμπύλης αναφοράς κερκετίνης. Το ίδιο πρωτόκολλο απουσία οξέος μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση του συνόλου των φαινολικών ενώσεων που έχουν δύο ορθο – υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B, οι οποίες απουσία οξέος επίσης συμπλοκοποιούνται με το AlCl_3 .

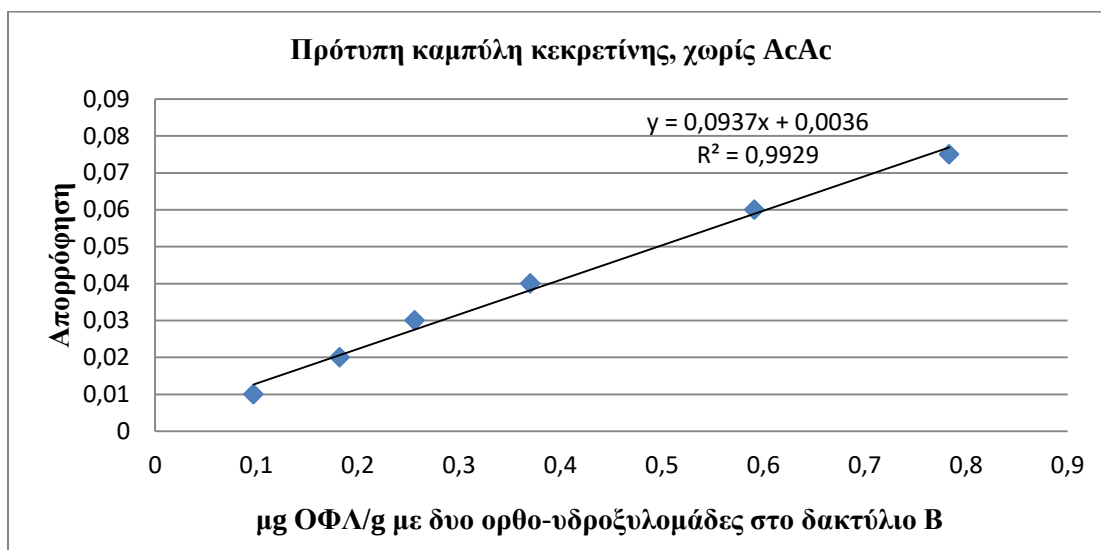
Παρασκευή προτύπων κερκετίνης για κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Από μητρικό διάλυμα κερκετίνης παρασκευάζεται, με αραιώση, μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 0,6 mM σε MeOH. Από το μητρικό διάλυμα παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών των αραιωμένων διαλυμάτων της κερκετίνης. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 415 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό

πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Οι καμπύλες που φαίνονται παρακάτω κατασκευάστηκαν με AcAc (Σχήμα 10) και χωρίς AcAc (Σχήμα 11). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg ολικών φλαβονοειδών/g δείγματος.



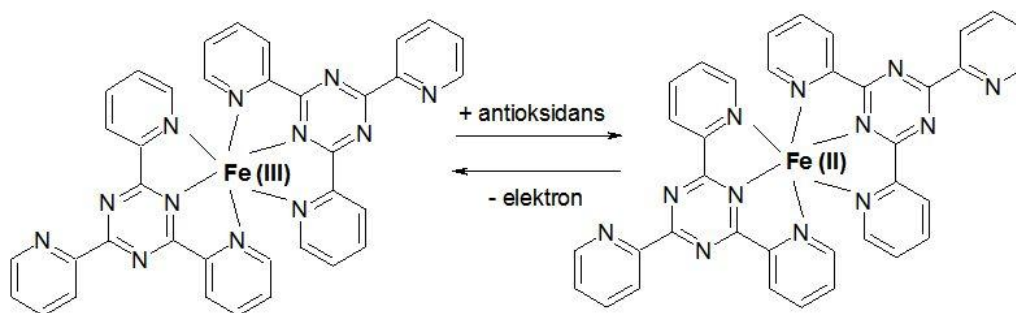
Σχήμα 10. Πρότυπη καμπύλη κεκερετίνης, με AcAc (μg ΟΦΛ/g)



Σχήμα 11. Πρότυπη καμπύλη κεκερετίνης, χωρίς AcAc (μg ΟΦΛ/g με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B)

2.4. Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

Η μέθοδος FRAP ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transfer-ET assays). Στις περισσότερες από αυτές τις μεθόδους, το αντιοξειδωτικό αντιδρά με ένα φθορίζον ή έγχρωμο αντιδραστήριο (οξειδωτικό αντιδραστήριο) και προσδιορίζεται η ικανότητα του αντιοξειδωτικού να προκαλέσει αναγωγή. Το προϊόν της αναγωγής του οξειδωτικού αντιδραστήριου έχει διαφορετικό χρώμα και ο βαθμός μεταβολής του χρώματος (αύξηση ή ελάττωση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος) συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Η αρχή της μεθόδου FRAP βασίζεται στην αναγωγή του ιόντος $Fe(III)$ προς $Fe(II)$ παρουσία του αντιοξειδωτικού, το οποίο δρα ως δότης ηλεκτρονίου. Μία συνθετική χρωστική, η 2,4,6-τριπυριδυλ-S-τριαζίνη (2, 4, 6-tripyridyl-s- triazine, TPTZ) χρησιμοποιείται ως δείκτης της παρουσίας ιόντων $Fe(II)$ καθώς το σύμπλοκο TPTZ- $Fe(III)$ είναι άχρωμο ενώ το σύμπλοκο TPTZ- $Fe(II)$ έχει χαρακτηριστικό μπλε χρώμα και απορροφά στα 620nm.



Εικόνα 8. Αρχή μεθόδου FRAP

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται τελικά η συνολική αναγωγική ικανότητα του αντιοξειδωτικού που εξετάζεται (δηλαδή η ικανότητά του να δρα ως δότης ηλεκτρονίου) (Benzie & Strain, 1996, Moon & Shibamoto, 2009).

Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl_3 , 3mM Σε 5mM HCL) (Merck)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCL, 12 N) (Sigma-aldrich)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας (Fisher)
- TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine, 2, 4, 6- τριπυριδυλο-s-τριαζίνη, 1 mM σε 0.05 M HCl) (Alfa Acsar)
- Απιονισμένο νερό
- Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, AA) (Merck)

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius BP 221S)
- Φιαλίδια erpendorf, χωρητικότητας 1.5 mL
- Πολυστυρενικά τρυβλία 96 βοθρίων
- Υδατόλουτρο (Memmert)
- Αυτόματες επαναλαμβανόμενες πιπέττες (10-1000 μL), με τα αντίστοιχα tips
- Κυκλοαναδευτήρας Vortex (Selectra)
- Φωτόμετρο ELISA (ELISAreader) SUNRISE TECAN

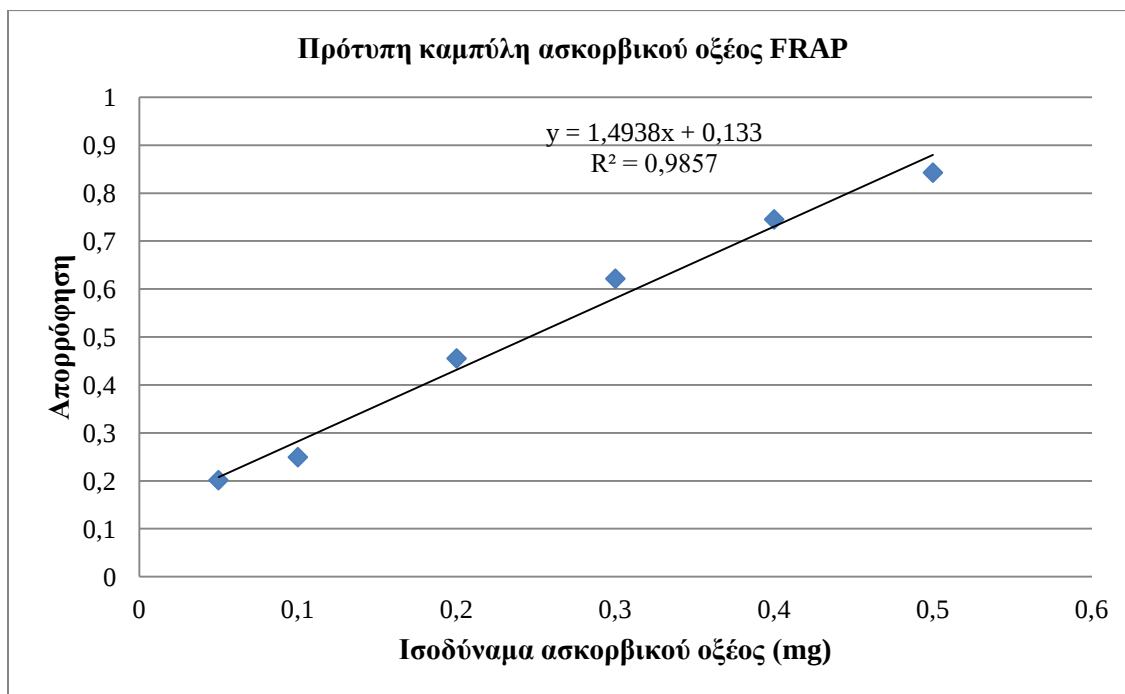
Αναλυτική πορεία

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται 50 μL αραιωμένου δείγματος και 50 μL FeCl_3 ή απιονισμένου νερού, για την παρασκευή του λευκού δείγματος. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και επώάζεται για 30 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C. Ακολούθως, προστίθενται 900 μL διαλύματος TPTZ, το μίγμα αναταράσσεται σε αναδευτήρα vortex και επώάζεται για 10 min, σε συνθήκες σκότους (Arpous et al., 2002). Μετά την πάροδο των 10 min, με τη χρήση ρυθμιζόμενης πιπέττας, 200 μL του μίγματος μεταφέρονται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων και το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται σε φωτόμετρο ELISA, στα 620 nm ως προς το λευκό δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος

(ascorbic acid equivalents, AAE), χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος.

Παρασκευή προτύπων ασκορβικού οξέος για κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 και 0.5 mM από μητρικό διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 1 mM σε μεθανόλη. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και οι μετρήσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος της μορφής $y = f(x)$, όπου στον άξονα των y αποδίδονται οι τιμές της απορρόφησης στα 620 nm και στον άξονα των x αποδίδονται οι διαφορετικές τιμές ποσοτήτων ασκορβικού οξέος σε mg.



Σχήμα 12. Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος (Ascorbic acid, AA) mg

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθόδων προσδιορισμού για τις 7 ποικιλίες μήλων (A:Golden Delicious, B:Pink Lady, C:Jonathan, D:Red Chief, E:Fuji, F:Granny Smith, G:Φιρίκι) υποβαλλόμενα στους 16 διαφορετικούς συνδυασμούς γλυκερόλης, β-κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασίας.

1.1. Αξιολόγηση ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου, χρησιμοποιώντας τη φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu στα 7 δείγματα μήλου τα οποία εκχυλίστηκαν στους 16 συνδυασμούς γλυκερόλης, β-κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασίας. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 και εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/g ξηρής φλούδας μήλου).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος/g ξηρής φλούδας μήλου

A	mg gallic acid/g dry matter	B	mg gallic acid/g dry matter	C	mg gallic acid/g dry matter	D	mg gallic acid/g dry matter	E	mg gallic acid/g dry matter	F	mg gallic acid/g dry matter	G	mg gallic acid/g dry matter
A1	5,479	B1	15,888	C1	0,0111	D1	0,171	E1	6,356	F1	3,572	G1	1,786
A2	4,100	B2	4,079	C2	0,027	D2	6,9526	E2	1,371	F2	6,481	G2	1,275
A3	5,494	B3	5,017	C3	15,262	D3	25,194	E3	2,892	F3	9,009	G3	1,954
A4	8,548	B4	8,366	C4	16,069	D4	45,486	E4	7,734	F4	11,44	G4	5,751
A5	4,034	B5	4,062	C5	14,434	D5	11,625	E5	9,123	F5	8,805	G5	4,072
A6	5,437	B6	4,086	C6	17,439	D6	25,624	E6	3,797	F6	5,145	G6	6,533
A7	7,362	B7	11,162	C7	16,805	D7	12,596	E7	8,559	F7	8,259	G7	7,671
A8	8,439	B8	13,103	C8	9,4652	D8	24,367	E8	13,17	F8	7,284	G8	5,785
A9	8,944	B9	7,068	C9	18,316	D9	22,015	E9	7,982	F9	3,352	G9	4,512

A10	7,990	B10	7,365	C10	16,186	D10	32,269	E10	5,311	F10	14,80	G10	6,802
A11	13,873	B11	19,475	C11	13,130	D11	26,794	E11	3,207	F11	10,66	G11	3,667
A12	11,171	B12	9,862	C12	18,573	D12	31,237	E12	6,204	F12	8,803	G12	6,996
A13	9,798	B13	4,199	C13	13,952	D13	38,122	E13	6,490	F13	6,534	G13	6,113
A14	15,345	B14	8,5785	C14	22,519	D14	18,166	E14	13,02	F14	8,615	G14	8,056
A15	14,508	B15	6,182	C15	19,694	D15	27,917	E15	6,576	F15	4,520	G15	2,226
A16	15,563	B16	6,469	C16	21,010	D16	27,091	E16	8,956	F16	5,653	G16	1,534

1.2. Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της αντιοξειδωτικής δράσης, χρησιμοποιώντας τη φωτομετρική μέθοδο DPPH στα 7 δείγματα μήλου τα οποία εκχυλίστηκαν στον 16 συνδυασμούς γλυκερόλης, β-κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασίας. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 και εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (mg Trolox/g ξηρής φλούδας μήλου).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων της αντιοξειδωτικής δράσης εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg Trolox /g ξηρής φλούδας μήλου

A	mg trolox/ g dry matter	B	mg trolox/ g dry matter	C	mg trolox/ g dry matter	D	mg trolox/g dry matter	E	mg trolox/g dry matter	F	mg trolox/g dry matter	G	mg trolox/g dry matter
A1	1,7724	B1	1,2584	C1	2,4940	D1	4,2685	E1	1,1627	F1	2,1046	G1	2,3452
A2	1,6217	B2	2,1079	C2	3,5861	D2	6,6493	E2	1,7234	F2	2,2442	G2	1,6452
A3	2,119	B3	2,1623	C3	4,9613	D3	9,7765	E3	2,4062	F3	2,3446	G3	1,4222
A4	2,5123	B4	2,4075	C4	6,5483	D4	14,4787	E4	2,5137	F4	2,9759	G4	2,7648
A5	1,9054	B5	1,6474	C5	4,9704	D5	8,4275	E5	1,9133	F5	1,7970	G5	3,0286
A6	3,7710	B6	2,0057	C6	5,7184	D6	13,2802	E6	2,0825	F6	1,4015	G6	2,7611
A7	1,1269	B7	2,2523	C7	5,8035	D7	9,1709	E7	2,6085	F7	1,3324	G7	2,8041
A8	1,7877	B8	2,9702	C8	8,3876	D8	11,4459	E8	2,8682	F8	3,0132	G8	2,5869
A9	1,3260	B9	2,1592	C9	6,4249	D9	10,2644	E9	2,0027	F9	3,4391	G9	3,3907
A10	2,4721	B10	2,6063	C10	6,0616	D10	10,0354	E10	2,1631	F10	2,5074	G10	2,3695

A11	1,9235	B11	0,6982	C11	0,4308	D11	7,9490	E11	1,8070	F11	2,1683	G11	2,6418
A12	2,9807	B12	2,7133	C12	6,4074	D12	9,8781	E12	2,4243	F12	2,4863	G12	3,9193
A13	1,6215	B13	2,2252	C13	6,0804	D13	9,5878	E13	2,0020	F13	2,8444	G13	3,9090
A14	2,2488	B14	2,5933	C14	8,1907	D14	11,4045	E14	3,2323	F14	2,5121	G14	2,6803
A15	2,3873	B15	2,1182	C15	6,8974	D15	9,1725	E15	2,6204	F15	2,6336	G15	2,7422
A16	2,2789	B16	1,9054	C16	6,9310	D16	9,7879	E16	2,6693	F16	2,6731	G16	2,7280

1.3. Αξιολόγηση της αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της αναγωγικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP στα 7 δείγματα μήλου τα οποία εκχυλίστηκαν στον 16 συνδυασμούς γλυκερόλης, β-κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασίας. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 και εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (mg Trolox/g ξηρής φλούδας μήλου).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μετρήσεων της αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg ασκορβικού οξέος/g ξηρής φλούδας μήλου

A	mg ascorbic acid/g dry matter	B	mg ascorbic acid/g dry matter	C	mg ascorbic acid/g dry matter	D	mg ascorbic acid/g dry matter	E	mg ascorbic acid/g dry matter	F	mg ascorbic acid/g dry matter	G	mg ascorbic acid/g dry matter
A1	0,04675	B1	0,02367	C1	0,02892	D1	0,13132	E1	0,01751	F1	0,03392	G1	0,02397
A2	0,04863	B2	0,03686	C2	0,04482	D2	0,19703	E2	0,02847	F2	0,04377	G2	0,03081
A3	0,05140	B3	0,03331	C3	0,06971	D3	0,21980	E3	0,03815	F3	0,04811	G3	0,02657
A4	0,05947	B4	0,04686	C4	0,07283	D4	0,27273	E4	0,05067	F4	0,05568	G4	0,02188
A5	0,04020	B5	0,02307	C5	0,05796	D5	0,20047	E5	0,03244	F5	0,04851	G5	0,05934
A6	0,05099	B6	0,03350	C6	0,05824	D6	0,21607	E6	0,03557	F6	0,04467	G6	0,02302
A7	0,03512	B7	0,03834	C7	0,06018	D7	0,21402	E7	0,03878	F7	0,04390	G7	0,02396
A8	0,03867	B8	0,05565	C8	0,06099	D8	0,21895	E8	0,05023	F8	0,04296	G8	0,03073
A9	0,05100	B9	0,07470	C9	0,06871	D9	0,26364	E9	0,03331	F9	0,04424	G9	0,03090
A10	0,08444	B10	0,04409	C10	0,05495	D10	0,21627	E10	0,04084	F10	0,04144	G10	0,02924
A11	0,14162	B11	0,04643	C11	0,02334	D11	0,17506	E11	0,03083	F11	0,03793	G11	0,01321
A12	0,05352	B12	0,05241	C12	0,06457	D12	0,20511	E12	0,04026	F12	0,04692	G12	0,03663

A13	0,03530	B13	0,05097	C13	0,06447	D13	0,19572	E13	0,04611	F13	0,03749	G13	0,02591
A14	0,04760	B14	0,04849	C14	0,06400	D14	0,19826	E14	0,05643	F14	0,04672	G14	0,03979
A15	0,04730	B15	0,04245	C15	0,06371	D15	0,18684	E15	0,04979	F15	0,04389	G15	0,01251
A16	0,04886	B16	0,04310	C16	0,06455	D16	0,18686	E16	0,04460	F16	0,01329	G16	0,02791

1.4. Αξιολόγηση ολικών φλαβονοειδών

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των ολικών φλαβονοειδών στα 7 δείγματα μήλου τα οποία εκχυλίστηκαν στου 16 συνδυασμούς γλυκερόλης, β-κυκλοδεξτρίνης και θερμοκρασίας. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 και εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox (mg Trolox/g ξηρής φλούδας μήλου).

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μετρήσεων των ολικών φλαβονοειδών εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης/g ξηρής φλούδας μήλου

A	mg querqetin acid/g dry matter	B	mg querqetin acid/g dry matter	C	mg querqeti n acid/g dry matter	D	mg querqetin acid/g dry matter	E	mg querqet in acid/g dry matter	F	mg querqeti n acid/g dry matter	G	mg querqeti n acid/g dry matter
A1	0,15191	B1	0,02606	C1	0,02959	D1	0,03365	E1	0,02082	F1	0,06199	G1	0,05304
A2	0,18033	B2	0,06833	C2	0,04457	D2	0,02808	E2	0,01465	F2	0,05806	G2	0,03706
A3	0,14693	B3	0,03162	C3	0,05250	D3	0,04436	E3	0,01992	F3	0,05405	G3	0,04019
A4	0,23209	B4	0,03491	C4	0,08273	D4	0,16579	E4	0,03808	F4	0,10129	G4	0,03531
A5	0,14630	B5	0,00850	C5	0,03544	D5	0,03905	E5	0,01161	F5	0,04478	G5	0,04887
A6	0,34948	B6	0,02509	C6	0,05501	D6	0,07010	E6	0,02138	F6	0,06795	G6	0,02349
A7	0,14002	B7	0,03353	C7	0,05347	D7	0,06175	E7	0,02049	F7	0,06504	G7	0,03359
A8	0,19408	B8	0,04067	C8	0,10222	D8	0,13471	E8	0,03946	F8	0,08094	G8	0,03240
A9	0,31389	B9	0,04870	C9	0,15840	D9	0,15006	E9	0,03673	F9	0,07439	G9	0,04305
A10	0,15380	B10	0,05041	C10	0,06466	D10	0,07525	E10	0,03458	F10	0,04793	G10	0,03052
A11	0,17228	B11	0,02616	C11	0,09581	D11	0,06327	E11	0,01466	F11	0,07493	G11	0,06450
A12	1,11985	B12	0,06859	C12	0,14595	D12	0,05601	E12	0,07248	F12	0,14569	G12	0,03738
A13	0,14517	B13	0,07372	C13	0,08195	D13	0,06079	E13	0,02596	F13	0,05723	G13	0,10244

A14	0,35008	B14	0,06563	C14	0,08875	D14	0,08869	E14	0,07160	F14	0,07784	G14	0,03767
A15	0,17288	B15	0,06655	C15	0,06709	D15	0,06222	E15	0,07501	F15	0,02916	G15	0,02111
A16	0,17862	B16	0,06767	C16	0,07192	D16	0,06706	E16	0,07595	F16	0,02311	G16	0,02306

***Πίνακας 9.** Αποτελέσματα μετρήσεων των ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B εκφρασμένα σε ισοδύναμα mg κερκετίνης /g ξηρής φλούδας μήλου*

A	mg querqeti n acid/g dry matter	B	mg querqeti n acid/g dry matter	C	mg querqet in acid/g dry matter	D	mg querqeti n acid/g dry matter	E	mg querqeti n acid/g dry matter	F	mg querqeti n acid/g dry matter	G	mg querqeti n acid/g dry matter
A1	0,17176	B1	0,02732	C1	0,03847	D1	0,04644	E1	0,02481	F1	0,05906	G1	0,02700
A2	0,05401	B2	0,10041	C2	0,06546	D2	0,04452	E2	0,03699	F2	0,05521	G2	0,05160
A3	0,02659	B3	0,03416	C3	0,05447	D3	0,05339	E3	0,02360	F3	0,04238	G3	0,03714
A4	0,05812	B4	0,03189	C4	0,10012	D4	0,11310	E4	0,01187	F4	0,09574	G4	0,03749
A5	0,03571	B5	0,00837	C5	0,05157	D5	0,05256	E5	0,02541	F5	0,05513	G5	0,04017
A6	0,09096	B6	0,04058	C6	0,04441	D6	0,09691	E6	0,02618	F6	0,05808	G6	0,06705
A7	0,04239	B7	0,02885	C7	0,06134	D7	0,07391	E7	0,04622	F7	0,07189	G7	0,02014
A8	0,06680	B8	0,05309	C8	0,12661	D8	0,11582	E8	0,03336	F8	0,07796	G8	0,04514
A9	0,08381	B9	0,05595	C9	0,12046	D9	0,20236	E9	0,04019	F9	0,06962	G9	0,03397
A10	0,05085	B10	0,05423	C10	0,08748	D10	0,12331	E10	0,02031	F10	0,04858	G10	0,04882
A11	0,09055	B11	0,04649	C11	0,02785	D11	0,07376	E11	0,08685	F11	0,08661	G11	0,07601
A12	0,19440	B12	0,06646	C12	0,10747	D12	0,08155	E12	0,03196	F12	0,14272	G12	0,06212
A13	0,04815	B13	0,07066	C13	0,08971	D13	0,08707	E13	0,12215	F13	0,06678	G13	0,06000
A14	0,10968	B14	0,08510	C14	0,11490	D14	0,11455	E14	0,0566	F14	0,03540	G14	0,03593
A15	0,06790	B15	0,07001	C15	0,09203	D15	0,09515	E15	0,05106	F15	0,08395	G15	0,08375
A16	0,06558	B16	0,07291	C16	0,09213	D16	0,09807	E16	0,08953	F16	0,09219	G16	0,07064

2. Βελτιστοποίηση της εκχύλισης

Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε αξιολογώντας την επιρροή τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (Συγκέντρωση β-HD-CD και glycerol και θερμοκρασίας).

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν, αναλύθηκαν με πολλαπλή παλινδρόμηση και έπειτα αφαιρέθηκαν οι μη στατιστικά σημαντικοί παράγοντες ($p > 0,05$). Η στατιστική σημαντικότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε από το συντελεστή πολλαπλής συσχέτισης (R^2), ο οποίος ήταν πάνω από 0,87 ($p < 0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων που μετρήθηκαν και αυτών που προβλέφθηκαν, αλλά και πως το μοντέλο μπορεί να προβλέψει τις επιθυμητές πειραματικές συνθήκες με μεγάλη αξιοπιστία. Οι τιμές από τις ανεξάρτητες μεταβλητές (C:C_{cd}, R:C_{gl}, T) όπως επίσης και οι τιμές που προέκυψαν απ την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, απεικονίζονται στους Πίνακες 4-9.

Παρακάτω παραθέτονται η πολωνυμικές εξισώσεις και η τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση όλων των παραμέτρων για τις πράσινες εκχυλίσσεις των Jonathan και Red Chief, καθώς αποκρίθηκαν ολοκληρωμένα στον πειραματικό σχεδιασμό Box-Buhnen.

Πίνακας 10. Πολωνυμική εξίσωση για την παράμετρο TFn (ολικά φλαβονοειδή)

Response	Polynomial equation	R^2	p
<i>TFn</i>			
Jonathan	$0.098 + 0.022R + 0.016T + 0.012RT - 0.033R^2 + 0.001T^2$	0.87	0.0429
Red Chief	$0.102 + 0.012R + 0.017T + 0.007RT - 0.027R^2 - 0.004T^2$	0.92	0.0309

Πίνακας 11. Πολυωνυμική εξίσωση για την παράμετρο DPPH (ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο)

Response	Polynomial equation	R ²	p
DPPH			
Jonathan	$6.80 + 0.69C + 1.10R + 0.81T - 0.24CR + 0.08CT + 0.29RT - 0.51C^2 - 1.39R^2 + 0.39T^2$	0.93	0.0203
Red Chief	$9.73 + 1.41R + 1.60T - 1.80CR$	0.92	0.0105

Πίνακας 11. Πολυωνυμική εξίσωση για την παράμετρο TP (ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο)

Response	Polynomial equation	R ²	p
TP			
Jonathan	$20.20 + 2.47C + 3.11R - 4.61CR - 2.87C^2 - 4.27R^2$	0.87	0.0434
Red Chief	$26.03 + 0.67C + 6.77R + 6.42T - 7.98CR - 0.17CT + 1.41RT + 1.86C^2 + 3.73R^2 - 12.80T^2$	0.92	0.0278

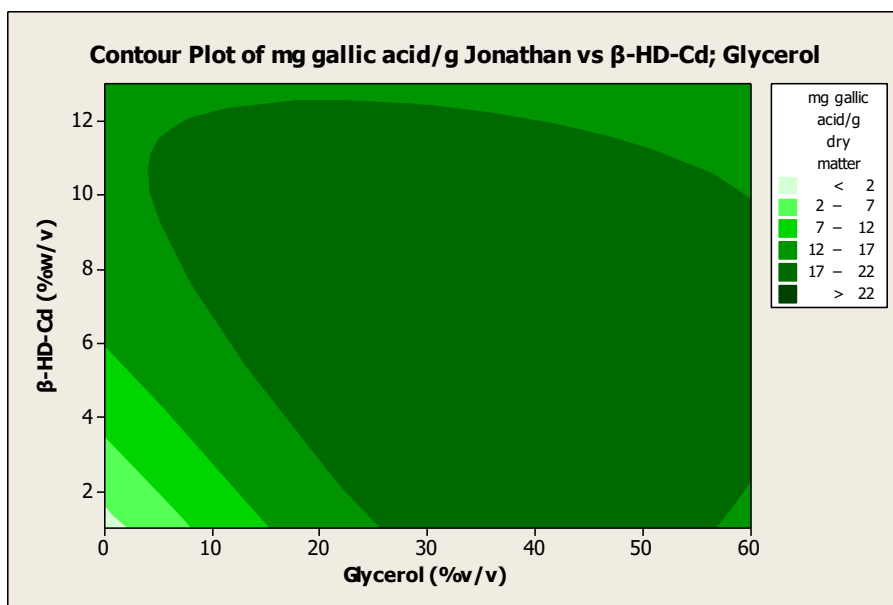
Οι πολυωνυμικές εξισώσεις της Ytp (total polyphenol yield) παραμέτρου έδειξαν πως υπάρχει ξεκάθαρη θετική επίδραση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης και της γλυκερόλης αλλά και της θερμοκρασίας σε όλες τις περιπτώσεις.

Όσον αφορά τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τον προσδιορισμό ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο, φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ C_{gl} με T, ενώ το τετράγωνο της C_{gl} είχε αρνητική επίδραση και στις δυο περιπτώσεις των παραμέτρων που μετρήθηκαν σε αντίθεση με της T που στην περίπτωση της Jonathan η επίδραση ήταν θετική.

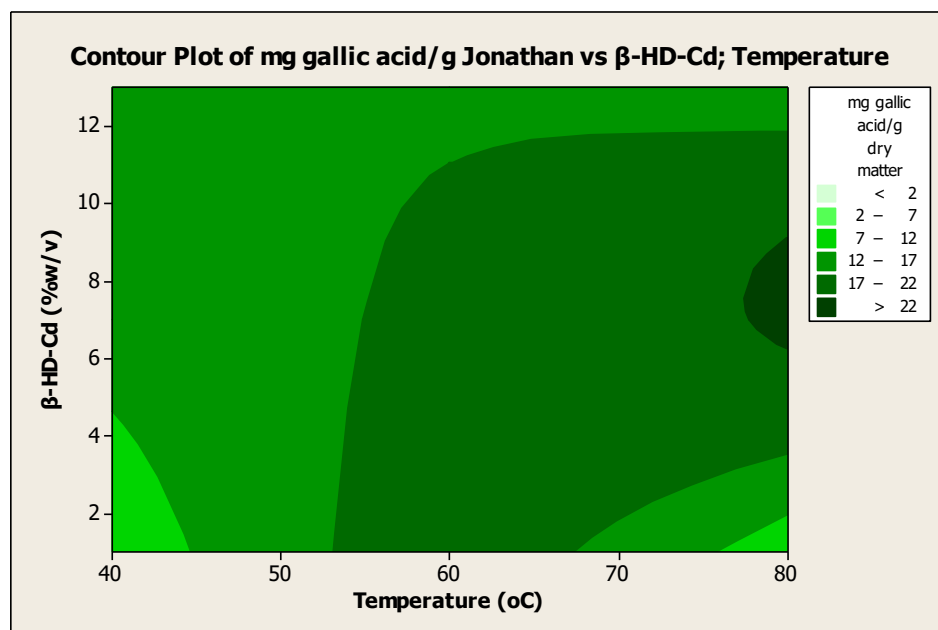
Στην μέθοδο DPPH παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ C_{CD} με C_{gl} ενώ στην Jonathan θετική συσχέτιση είχαν η C_{gl} με την T και η C_{CD} με την T. Τα τετράγωνα C_{CD} και C_{gl} είχαν αρνητική επίδραση ενώ της T είχε θετική.

Τέλος, στην μέθοδο προσδιορισμού ολικών φλαβονοειδών αρνητική ήταν η συσχέτιση της C_{CD} με την C_{gl} και για τις δύο ποικιλίες καθώς και της C_{CD} με την T για την Red Chief, ενώ αντίθετα η συσχέτιση ήταν αρνητική μεταξύ C_{gl} και T. Τα τετράγωνα είχαν αρνητική επίδραση για τις C_{CD} και C_{gl} για την Jonathan και θετική για την Red Chief ενώ αρνητική παρατηρήθηκε η T για την Red Chief.

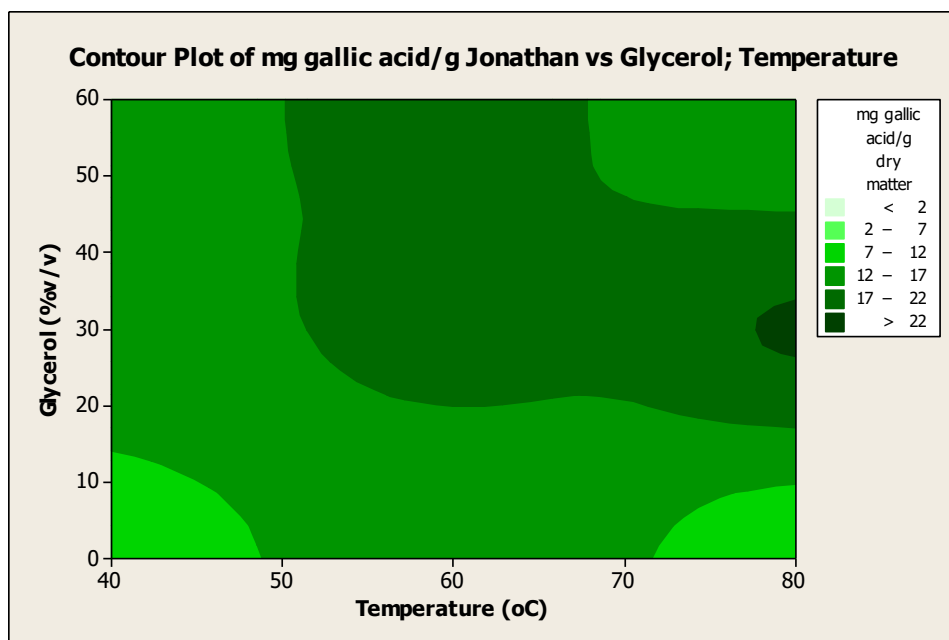
Παρακάτω παραθέτεται η τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση όλων των παραμέτρων για τις πράσινες εκχυλίσσεις των Jonathan και Red Chief, καθώς αποκρίθηκαν ολοκληρωμένα στον πειραματικό σχεδιασμό Box-Buhnen.



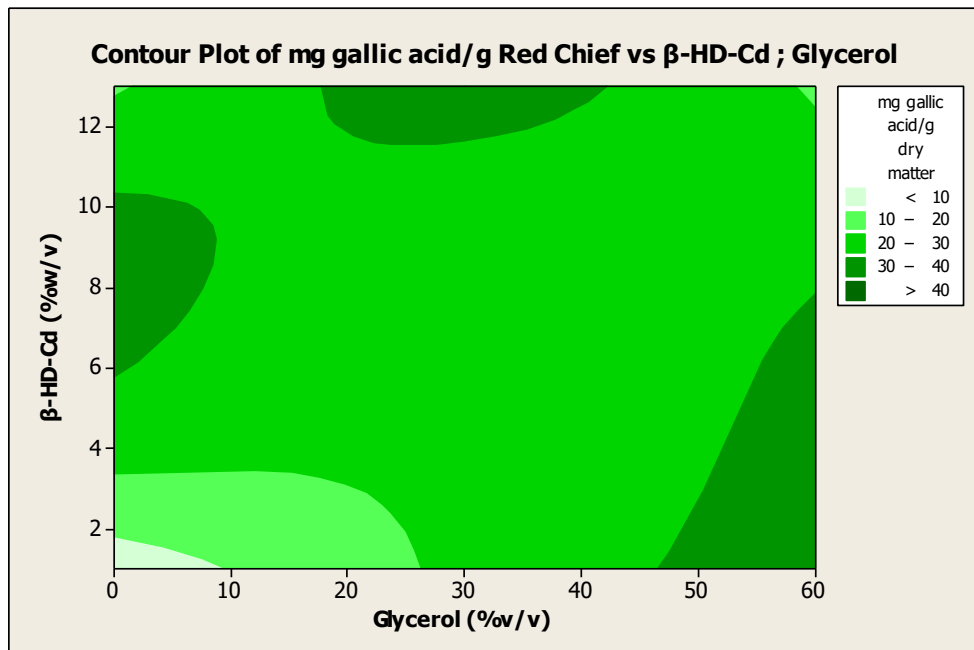
Σχήμα 13. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan



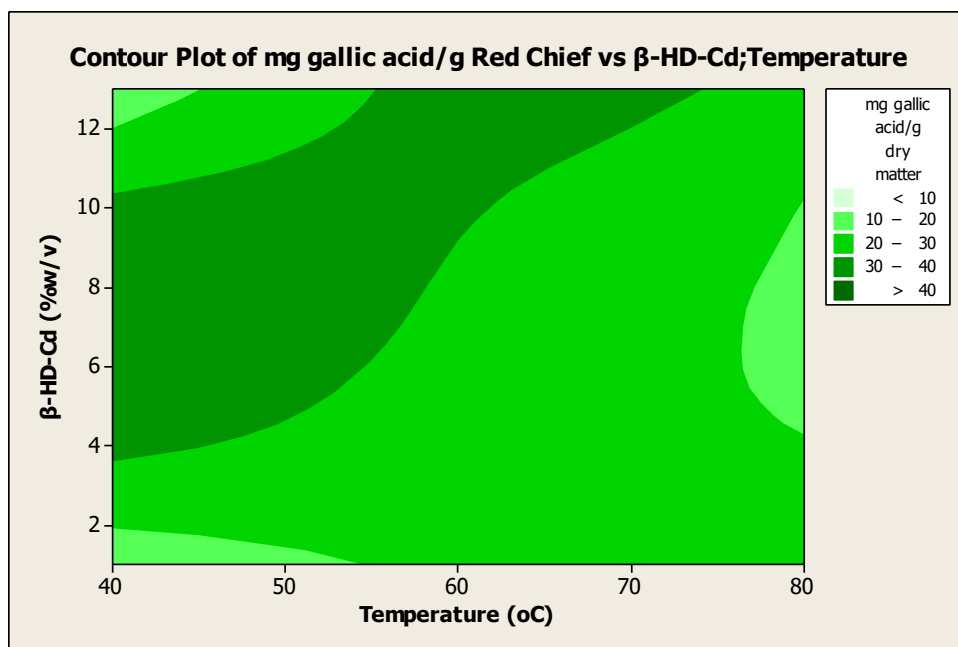
Σχήμα 14. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan



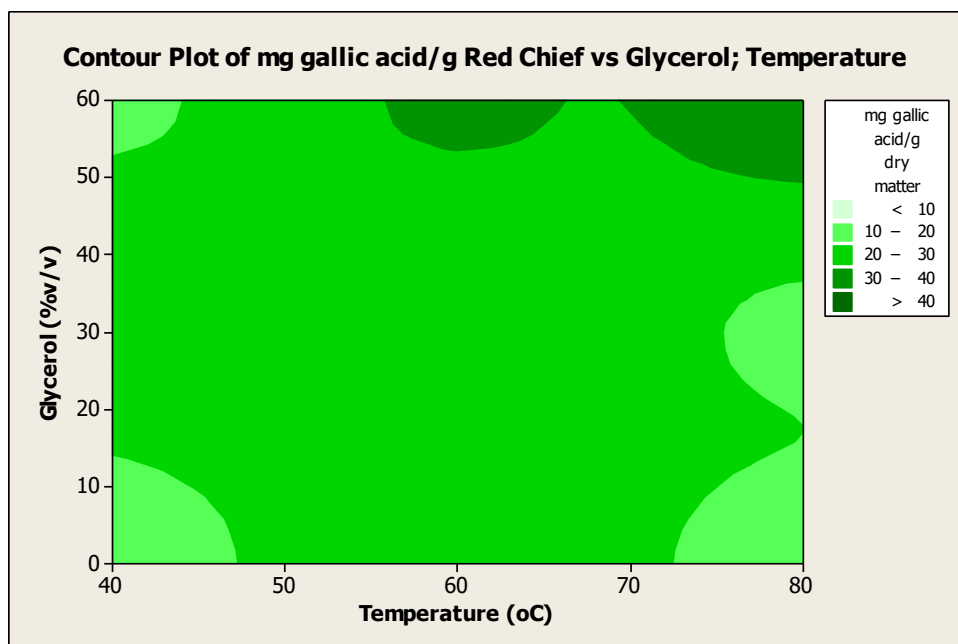
Σχήμα 15. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Jonathan



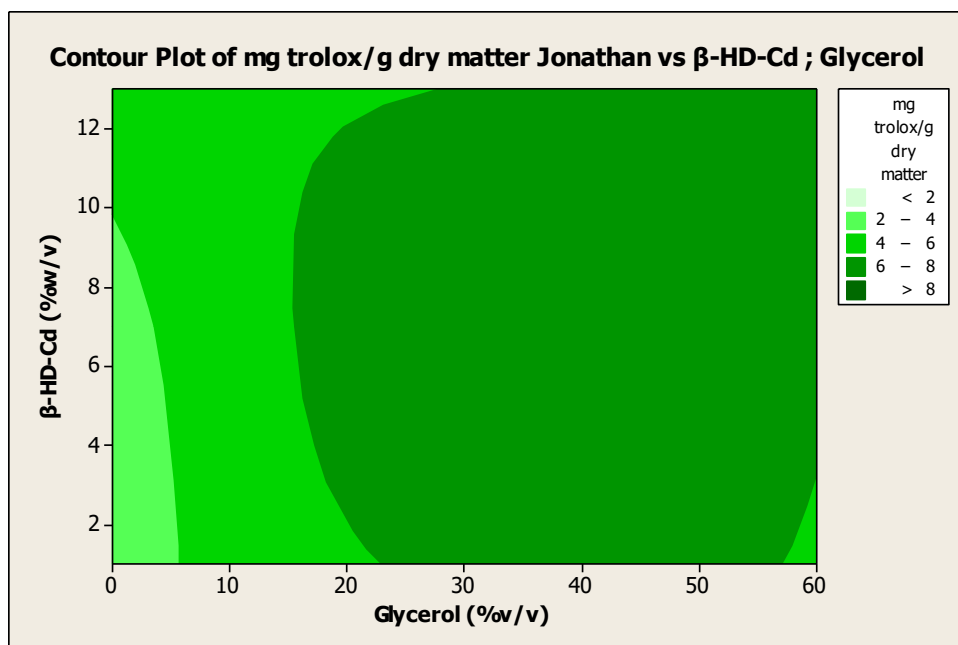
Σχήμα 16. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chief



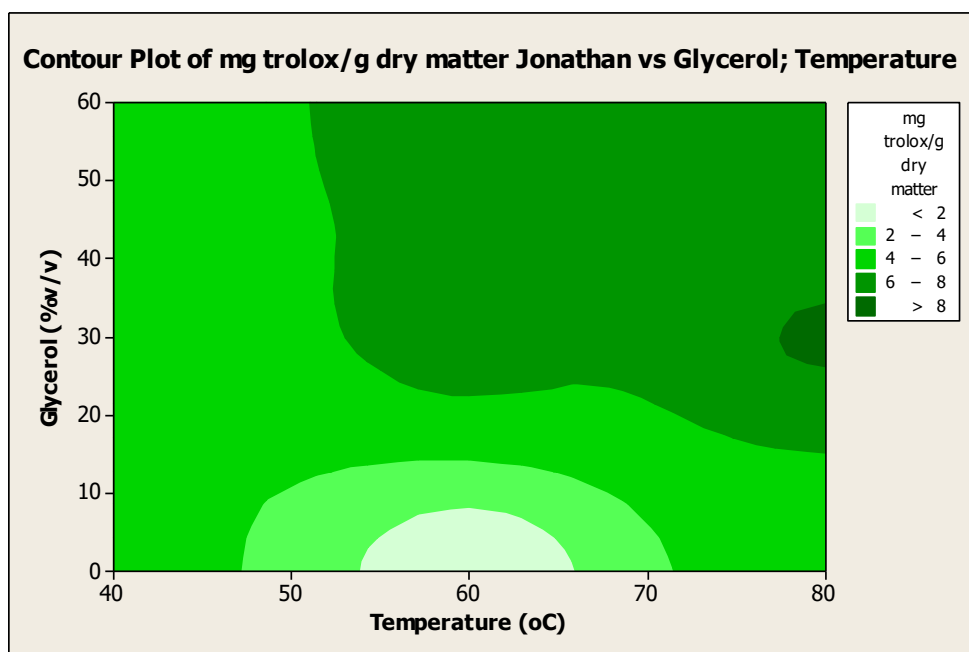
Σχήμα 17. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chief



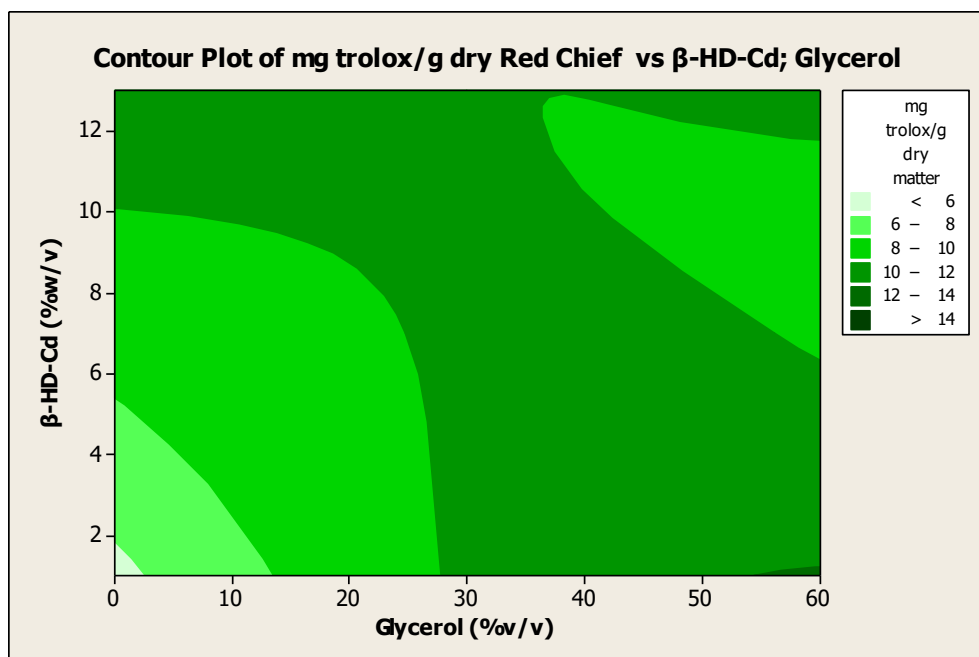
Σχήμα 18. Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στο ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο για την ποικιλία Red Chief



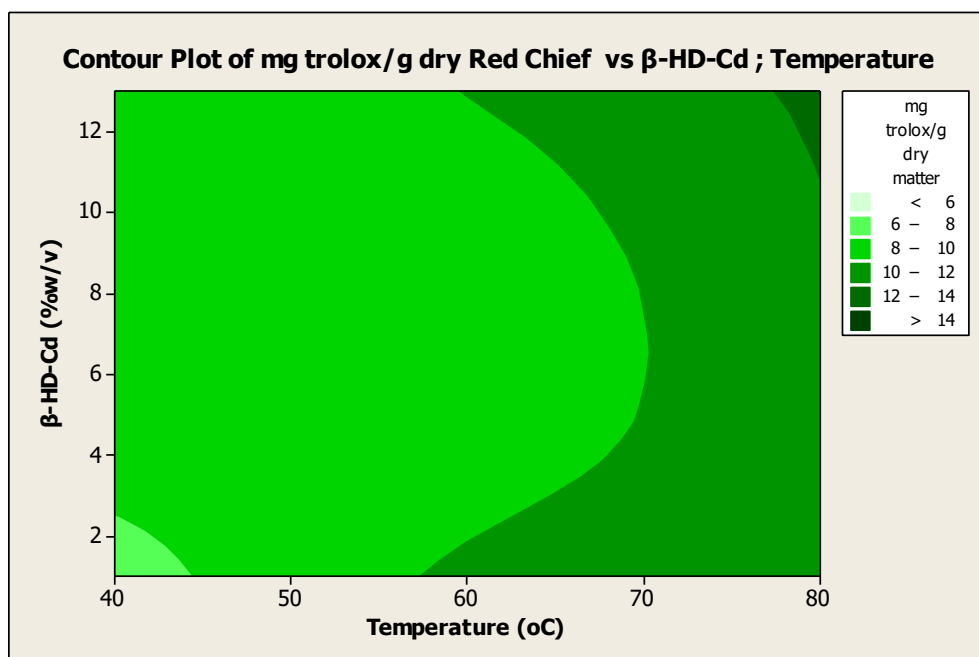
Σχήμα 19 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Jonathan



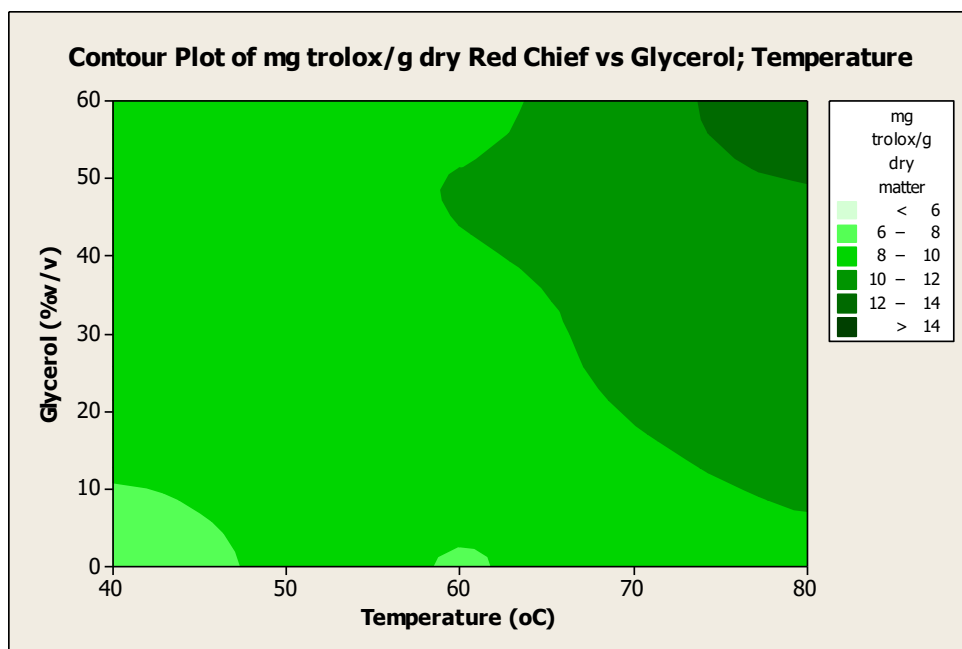
Σχήμα 20 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Jonathan



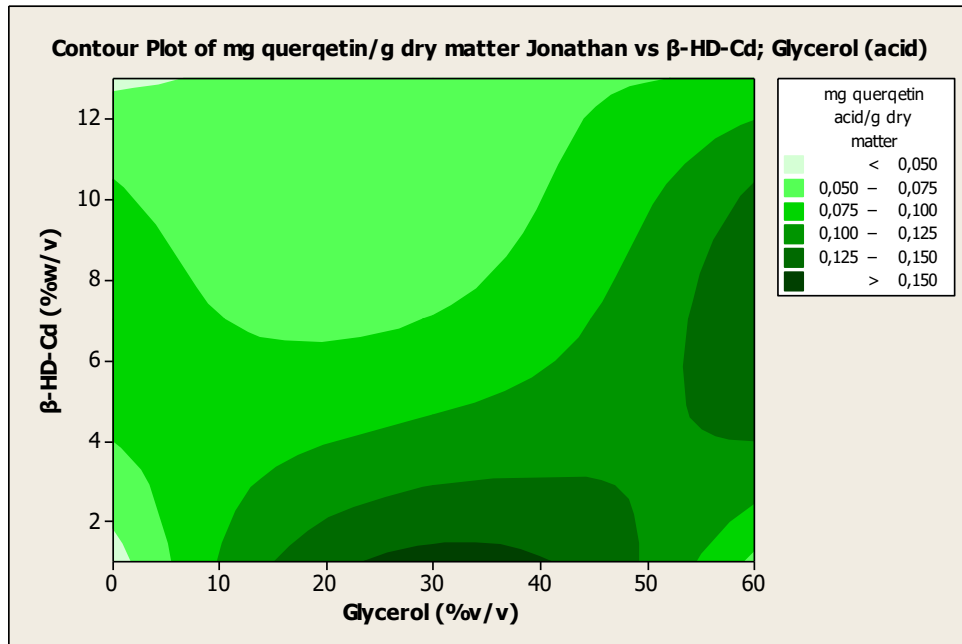
Σχήμα 21 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chief



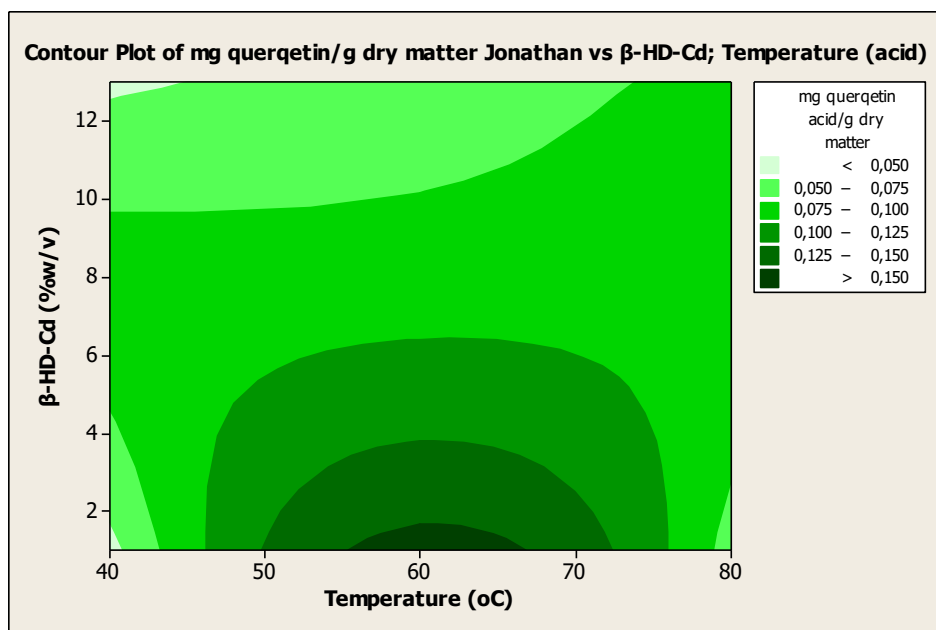
Σχήμα 22 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chief



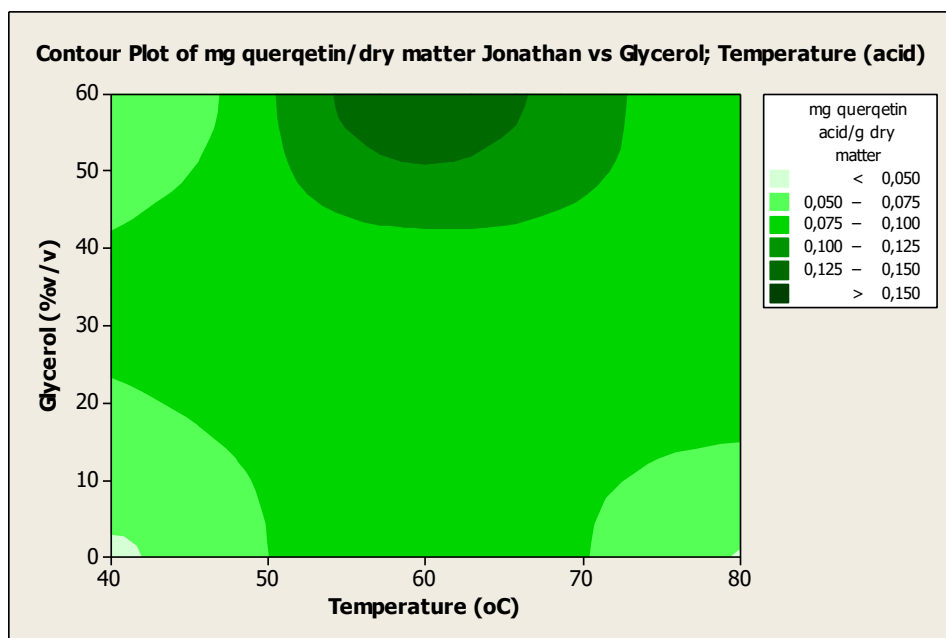
Σχήμα 23 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα για την ποικιλία Red Chief



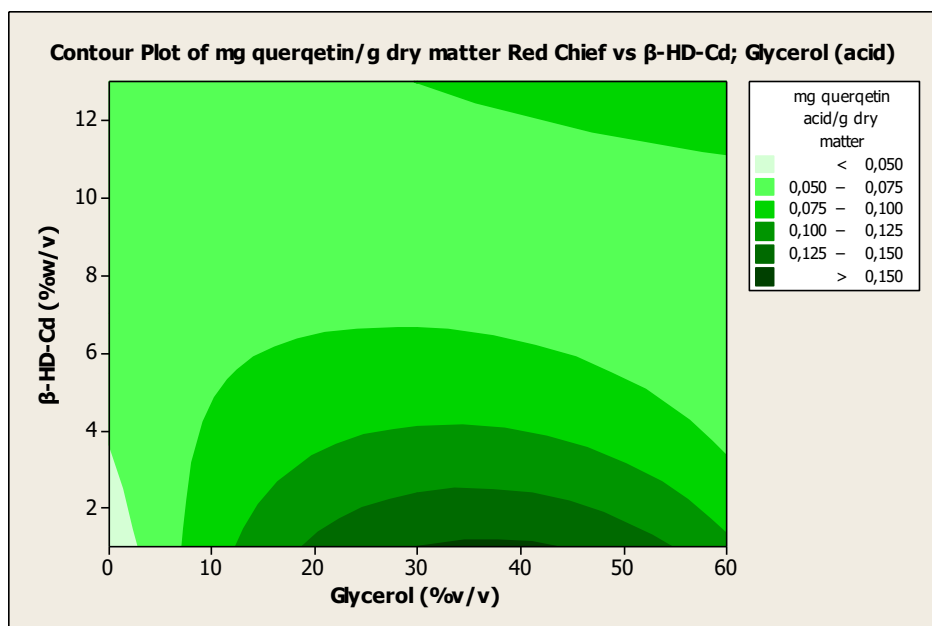
Σχήμα 24 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathan



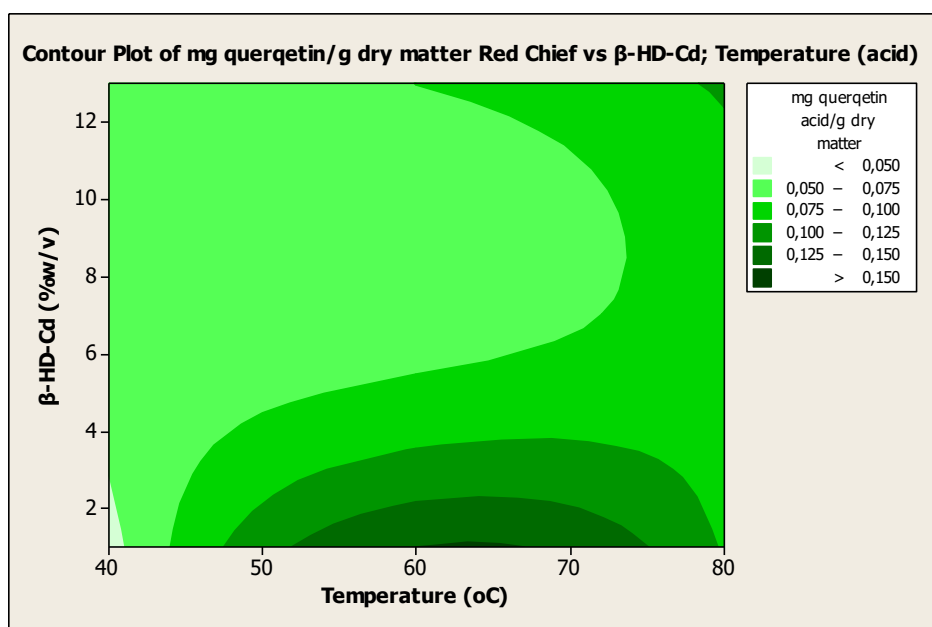
Σχήμα 25 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathan



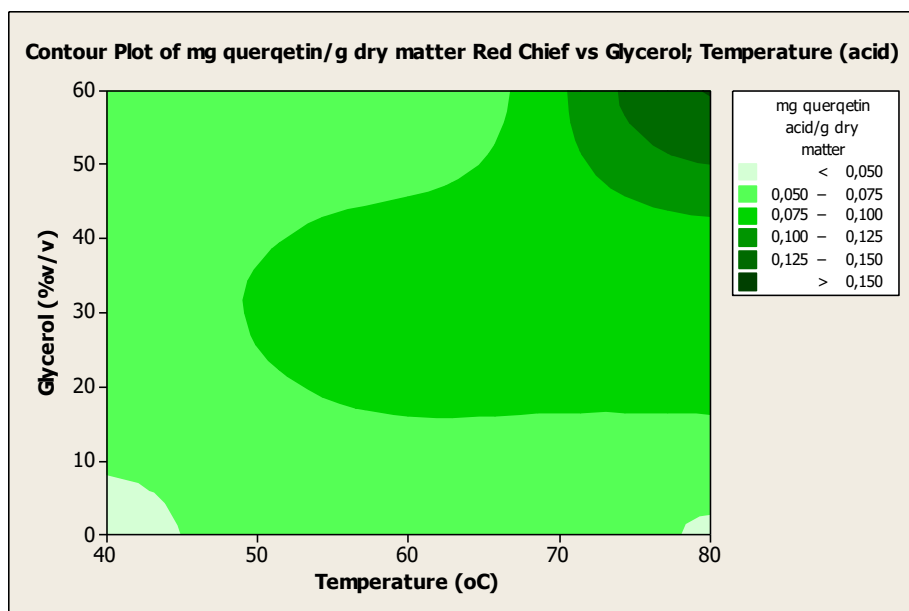
Σχήμα 26 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Jonathan



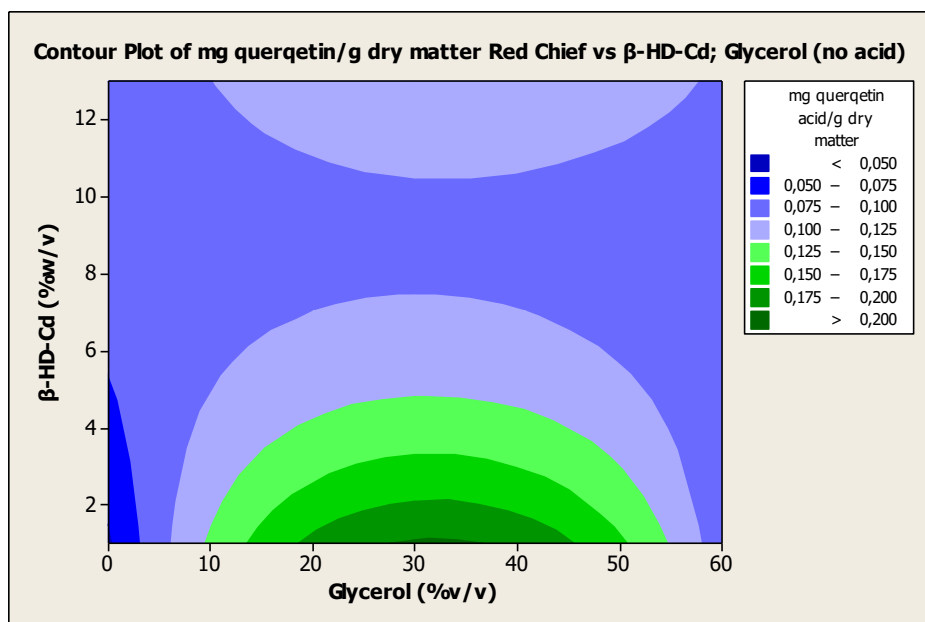
Σχήμα 27 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief



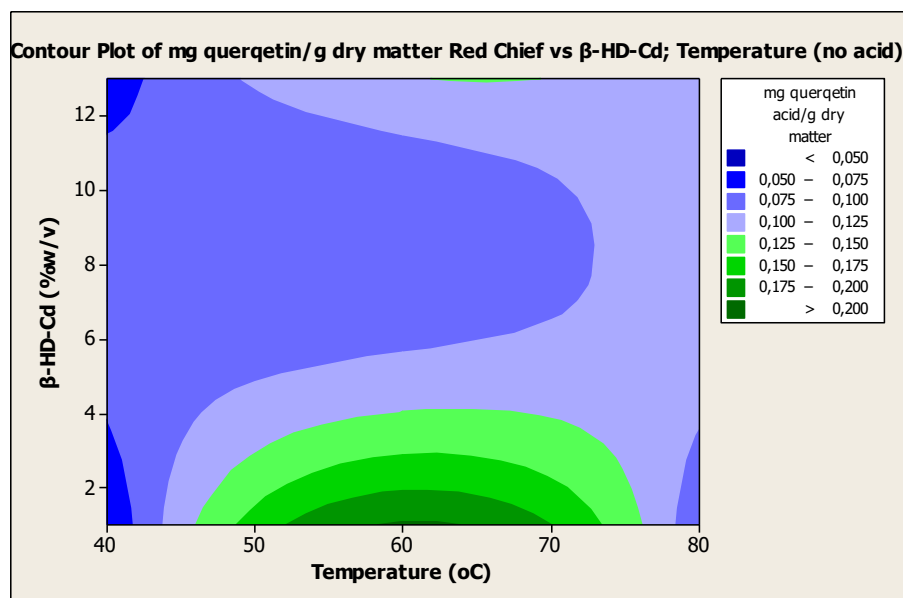
Σχήμα 28 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief



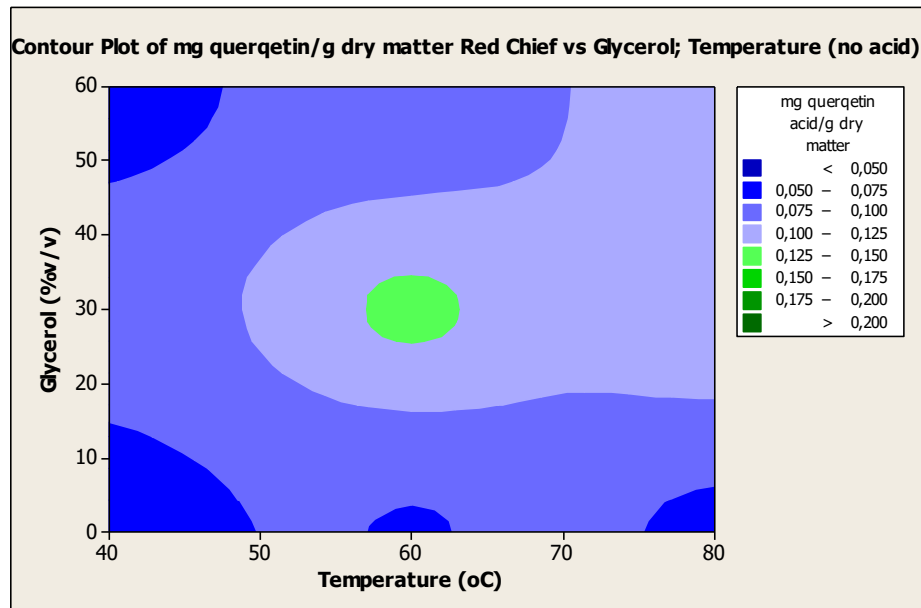
Σχήμα 29 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών για την ποικιλία Red Chief



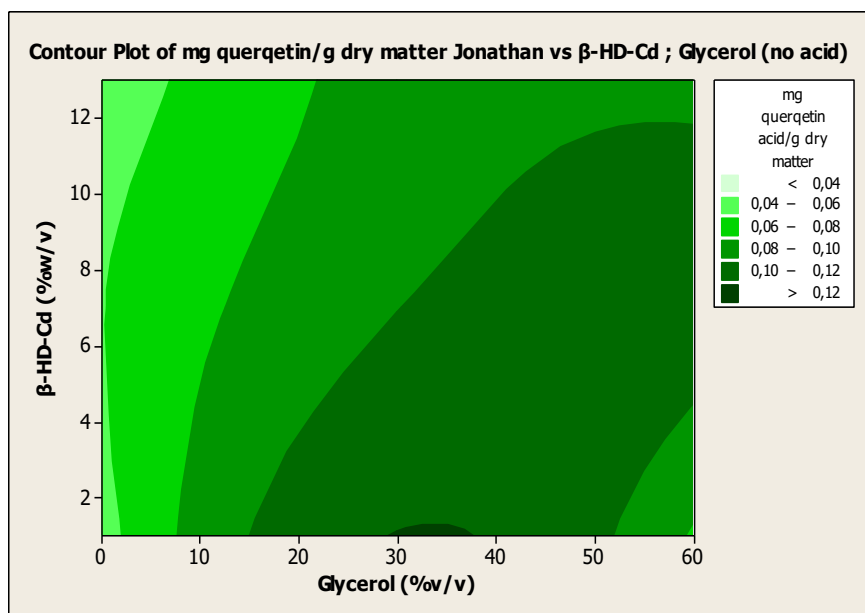
Σχήμα 30 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief



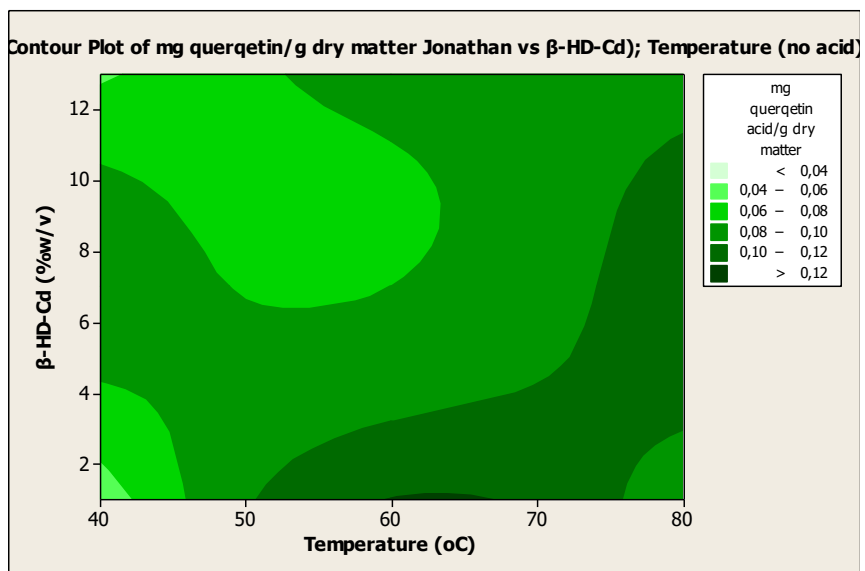
Σχήμα 31 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief



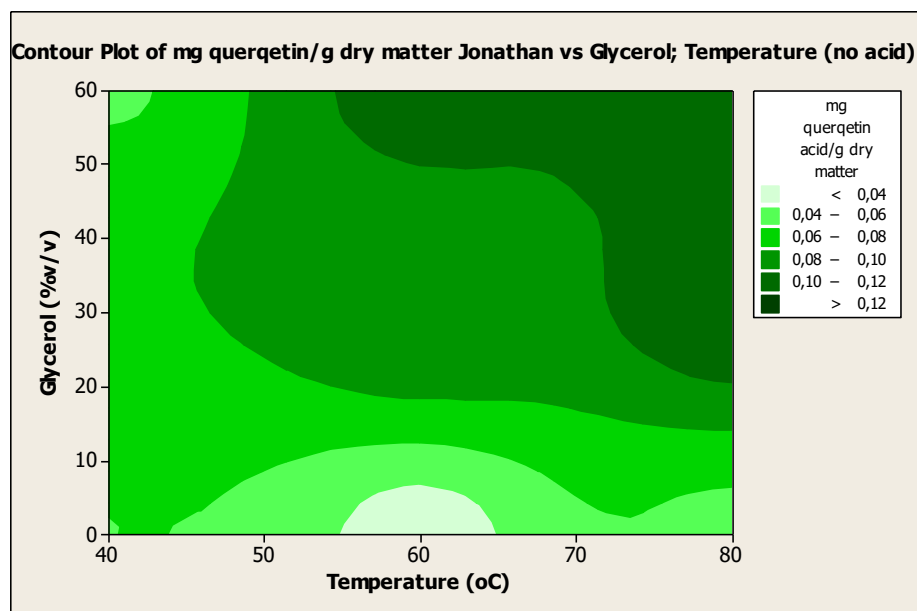
Σχήμα 32 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Red Chief



Σχήμα 33 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και C_{gl} στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan



Σχήμα 34 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{CD} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan



Σχήμα 35 Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επίδρασης των ανεξάρτητων των ανεξάρτητων παραμέτρων C_{gl} και T στα επίπεδα ολικών φλαβονοειδών με δυο ορθο-υδροξυλομάδες στο δακτύλιο B για την ποικιλία Jonathan

Ωστόσο, παρατηρήθηκαν διαφορετικά μοτίβα το οποίο αποδίδεται στη συνέργεια ή/και στον ανταγωνισμό μεταξύ των συστατικών που περιέχονται στις φλούδες (Makris et al., 2007, Karvella et al., 2012). Φαίνεται ότι η μεγιστοποίηση των επιπέδων Y_{tr} παρατηρήθηκε όταν το ποσοστό γλυκερόλης ήταν μεταξύ 40-60%, ενώ η συγκέντρωση κυκλοδεξτρίνων και η θερμοκρασία έδειξαν βέλτιστες τιμές για την εκχύλιση των πολυφαινολών στο 7% (w/v) και 80 °C, αντίστοιχα (Σχήματα 13-35). Όσον αφορά την επίδραση της γλυκερόλης, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε παρόμοια αποτελέσματα, στην οποία κατά την αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης στο διαλύτη της εκχύλισης, αυξανόταν ταυτόχρονα το πολυφαινολικό περιεχόμενο ακόμα και μέχρι το μέγιστο ποσοστό γλυκερόλης της τάξεως του 90% (w/v) (Shehata et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη εξαιτίας της ταυτόχρονης χρήσης κυκλοδεξτρίνης, γλυκερόλη δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60%, καθώς το μίγμα διαλύτη γινόταν εξαιρετικά παχύρευστο και το ποσό των κυκλοδεξτρίνων γινόταν μη διαλυτό. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η γλυκερόλη μπορεί να είναι αποδοτική ως ένας εναλλακτικός πράσινος διαλύτης για την

εκχύλιση των πολυφαινολών με μεγαλύτερη απόδοση από το νερό όταν η μεθανόλη ή η αιθανόλη θα πρέπει να αποφευχθούν.

Η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης είναι επίσης κρίσιμης σημασίας στη διαδικασία της εκχύλισης καθώς το σύνολο των συστατικών που μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με τη κυκλοδεξτρίνη με αποτέλεσμα να επηρεάσουν θετικά την εκχύλιση, που όμως δεν μπορούν να υπολογιστούν θεωρητικά. Συστατικά του εκχυλίσματος μήλου μπορεί να ανταγωνίζονται ή να προωθούν το σχηματισμό συμπλέγματος μεταξύ κυκλοδεξτρίνων και συστατικών της φλούδας μήλου. Στην παρούσα μελέτη η HP-β-CD επιλέχθηκε ούτως ώστε να μελετηθεί η επίδραση της κυκλοδεξτρίνης, καθώς η HP-β-CD, η πιο κοινή κυκλοδεξτρίνη που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα, μπορεί να διαλυθεί στο νερό μέχρι την οριακή συγκέντρωση των 16 mM.

Τα μαθηματικά μοντέλα επιτρέπουν τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών και τις μέγιστες προβλεπόμενες τιμές των Y_{tp} . Οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορίστηκαν με $C_{CD}=7-13\%$, $C_{gl}=30-60\%$ και $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Υπο αυτές τις συνθήκες, οι μέγιστες τιμές που υπολογίστηκαν ήταν αυτές των εκχυλίσεων 8 και 14 όπως φαίνονται στα Σχήματα 13-35. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την εκχύλιση 8 το πολυφαινολικό περιεχόμενο ήταν ίσο με 9,465 και 24,361 mg gallic acid/g dry matter, τα ολικά φλαβονοειδή ίσα με 0,1022 και 0,1347 mg querqetin/g dry matter, το ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο ίσο με 8,38 και 11,45 mg gallic acid/g dry matter και η αναγωγική ικανότητα 0,060 και 0,218 mg ascorbic acid/g dry matter για τις ποικιλίες Jonathan και Red Chief, αντίστοιχα. Επιπλέον, όσον αφορά την εκχύλιση 14 το πολυφαινολικό περιεχόμενο ήταν ίσο με 22,515 και 18,166 mg gallic acid/g dry matter, τα ολικά φλαβονοειδή ίσα με 0,088 και 0,088 mg querqetin/g dry matter, το ολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο ίσο με 8,194 και 11,403 mg gallic acid/g dry matter και η αναγωγική ικανότητα 0,064 και 0,198 mg ascorbic acid/g dry matter για τις ποικιλίες Jonathan και Red Chief, αντίστοιχα.

Το Y_{tp} είναι σημαντικά αυξημένο από αυτά που παρατηρήθηκαν από εκχυλίσματα φύλλων ελιάς που πάρθηκαν με συνδυασμούς νερό/γλυκερόλη χωρίς την προσθήκη κυκλοδεξτρίνων στο διαλύτη (Apostolakis et al., 2014). Οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορισμού της παρούσας εργασίας ήρθαν σε συμφωνία με αυτές που προέκυψαν από τους Moutzinos et al.

(2016) που χρησιμοποίησαν παρόμοια πειραματική μέθοδο για την εκχύλιση πολυφαινολών από φύλλα ελιάς.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία μπορεί να περιγραφεί ως εκχύλιση και ταυτόχρονα ενθυλάκωση πολυφαινολών από φλούδες μήλου. Ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ πολυφαινολών και κυκλοδεξτρίνων, γνωστός και ως μοριακή ενθυλάκωση, προσφέρει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές εκχυλίσσεις, όπως αυξημένη διαλυτότητα στο νερό, προστασία από οξείδωση και προστασία από αποσύνθεση που προκαλείται από φως και θέρμανση. Ο σχηματισμός συμπλεγμάτων έχει εφαρμοστεί επίσης σε απομονωμένα και μεμονωμένα μόρια. Συμπερασματικά, η προσθήκη κυκλοδεξτρίνων στην εκχύλιση μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης, πιθανότατα εξαιτίας του σχηματισμένου συμπλόκου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αναμφίβολα, η εκμετάλλευση των φυτικών υπο-προϊόντων από τη βιομηχανία μπορεί να προσφέρει μια εξαιρετική λύση στην παραλαβή και τη χρήση των φυτικών πολυφαινολών ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Παραδοσιακές, συμβατικές τεχνικές εκχύλισης φαίνεται να είναι επίπονες και μη φιλικές προς το περιβάλλον εξαιτίας της μεγάλης κατανάλωσης χρόνου, ενέργειας και οργανικών διαλυτών σε σύγκριση με εναλλακτικές, μη συμβατικές τεχνικές. Συνεπώς το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανάπτυξη νέων, εναλλακτικών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών για την παραλαβή των πολυφαινολών από φυτικά υπο-προϊόντα.

Στην παρούσα εργασία μελετάται μια νέα προσέγγιση για την επιτυχή παραλαβή των πολυφαινολών από φυτικά υπο-προϊόντα. Η χρήση πράσινων διαλυτών, όπως είναι η γλυκερόλη και οι κυκλοδεξτρίνες, φαίνεται να ενισχύουν την ενίσχυση της εκχύλισης και την παραλαβή των πολυφαινολών. Συνεπώς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ελκυστικών και ασφαλών προϊόντων ή τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής για την αύξηση του αντιοξειδωτικού ή αντιμικροβιακού περιεχομένου της καθημερινής διαίτας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas S., Chang Da Wei , K. Hayat & Zhang Xiaoming (2012). Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review, *School of Food Science and Technology*, China

Adi Wolfson, Christina Dlugy, Yoram Shotland (2006). Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities, *Environmental Chemistry Letters*

Ai, Yongfeng, "Structures, properties, and digestibility of resistant starch" (2013). *Graduate Theses and Dissertations*.

Akyol, H., Riciputi, Y., Capanoglu, E., Caboni, M. F., & Verardo, V. (2016). Phenolic Compounds in the Potato and Its Byproducts: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 835.

Amalia C. Diamanti, Panagiotis E. Igoumenidis, Ioannis Mourtzinis, Konstantina Yannakopoulou, Vaios T. Karathanos, (2017) Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins, *Food Chemistry*, Volume 214, 1 January, Pages 61-66

Anastas P, Eghbali N. (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chem Soc Rev.* Jan;39(1):301-12.

Anilkumar G. Gaonkar, Niraj Vasisht, Atul R. Khare, Robert Sobel (2014) Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide

Año G, Esquisabel A, Pastor M, Talavera A, Cedré B, Fernández S, Sifontes S, Aranguren Y, Falero G, García L, Solís RL, Pedraz JL (2011). A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholerae*. *Vaccine*. Aug 5;29(34):5758-64.

Arnous A, Makris DP, Kefalas P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J Food Compos Anal.* 15:655–665.

Apostolakis A, Grigorakis S, Makris DP (2014) Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures. *Sep Purif Technol* 128:89–95

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, et al. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances.*;33(8):1582-1614.

Awad. A.; de Jager, A.; van Westing, L. M. (2000) Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Sci. Hortic.*, 83, 249-263.

Azmir a J., I.S.M. Zaidul a , M.M. Rahman a , K.M. Sharif a , A. Mohamed a , F. Sahena b , M.H.A. Jahurul b , K. Ghafoor c , N.A.N. Norulaini d , A.K.M. Omar b (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review

Bencezdi D. and Blake A. (1999). Encapsulation and the controlled release of flavours, *Leatherhead Food RA Ind. J.*, 36-48

Bender, M. L., and M. Komiyama (1978): Cyclodextrin Chemistry-Reactivity and Structure, *Concepts in Organic Chemistry*

Benzie IFF, Strain JJ (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76

Bertolini AC, Siani AC, Grosso CR. (2001) Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying. *J Agric Food Chem.* Feb;49(2):780-5.

Bi X, Zhang J, Chen C, Zhang D, Li P, Ma F. (2014) Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food Chem.*;152:205-9.

Boggia R, Turrini F, Villa C, Lacapra C, Zunin P, Parodi B. (2016) Green Extraction from Pomegranate Marcs for the Production of Functional Foods and Cosmetics. *Donno D, ed. Pharmaceuticals*.

Boyer J, Liu RH. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J*.

Calabrò, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Raneri, D., Stancanelli, R., Ficarra, P., et al. (2004). Effects of alpha- and beta-cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2), 365–377

Celik, S. E., Ozyürek, M., Tufan, A. N., Güc, İ., & Apak, R. (2011). Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(5), 1615–1624.

Ceymann, M., Arrigoni, E., Scharrer, H., Nising, A.B., Hurrell, R.F., (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J. Food Compos. Anal.* 26, 128–135

Chakraborty, S., Basu, S., Lahiri, A., & Basak, S. (2010). Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of chrysin: A spectroscopic and molecular modeling approach. *Journal of Molecular Structure*, 977(1–3), 180–188.

Chatterjee, S. and Judeh, Z. M. A. (2016). Microencapsulation of fish oil. *Lipid Technology*, 28: 13–15.

Chemat F, Vian MA, Cravotto G. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*.

Clas, S.D.; Dalton, C. R.; Hancock B.C. (1999). Differential scanning calorimetry: Applications in drug development. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2, 311-320.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043.

Crupi V., Majolino D., Venuti V., Guella G., Mancini I., Rossi B., Verrocchio P., Viliani G., Stancanelli R. (2010). Temperature effect on the vibrational dynamics of cyclodextrin inclusion complexes: Investigation by FT-IR-ATR spectroscopy and numerical simulation. *J. Phys. Chem. A.* ;114:6811–6817.

Dandawate, P. R., Vyas, A., Ahmad, A., Banerjee, S., Deshpande, J., Swamy, K. V., et al. (2012). Inclusion complex of novel curcumin analogue CDF and -cyclodextrin (1:2) and its enhanced in vivo anticancer activity against pancreatic cancer. *Pharmaceutical Research*, 29(7), 1775–1786.

David B. Haytowitz and Seema Bhagwat. (2010). USDA Database for the Oxygen Radical absorbance Capacity (ORAC). Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC) *Agricultural Research Service (ARS) U.S. Department of Agriculture (USDA)*

Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 20(1), 1–6+

Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9): 1033-1046.

Desai K.G.H., H.J. (2005). Park Recent developments in microencapsulation of food ingredients *Drying Technology*, 23 pp. 1361–1394

Diaz-Alvarez, Alba E.; Francos, Javier; Croche, Pascale; Cadierno, Victorio (2014). Recent Advances in the Use of Glycerol as Green Solvent for Synthetic Organic Chemistry,

Dolores Mueller, Sven Triebel, Olga Rudakovski, Elke Richling (2013). Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD), *Food Chemistry*, Volume 139, Issues 1–4, 15 Pages 339-

Dodziuk H. (2006) .. Cyclodextrins and their complexes. Chemistry, analytical methods and application. Wiley-VCH, Weinheim

Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y.; Liu, R. H. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903-904.

Fang Z, Bhandari B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chem.* Dec 1;129(3):1139-47.

Fang, Z. & Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10): 510-523

Fatouros, D.G., Gortzi, O., Klepetsanis, P., Antimisiaris, S.G., Stuart, M.C.A., Brisson A. & Ioannou, P.V., (2001). Preparation and properties of arsonolipid containing liposomes, *Chemistry & Physics of Lipids*, 109, 75-89

Fatouros, D.G.; Hatzidimitriou, K.; Antimisiaris, S.G. (2001) Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: comparison of membrane integrity and drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13, 287-296.

Fernandes Carlos (2014) Influence of Hydroxypropyl--Cyclodextrin on the Photostability of Fungicide Pyrimethanil, *International Journal of Photoenergy (ONL)*

Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Graciele Da Silva Campelo Borges, Cristiane Copetti, Patricia Faria Di Pietro, Eduardo da Costa Nunes, Roseane Fett, (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil, *Scientia Horticulturae*, Volume 128, Issue 3, 11 April, Pages 261-266

Fromm, M., Bayha, S., Carle, R., Kammerer, D.R., (2012). Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1232–1242.

Fundueanu G, Constantin M, Esposito E, Cortesi R, Nastruzzi C, Menegatti E. (2005). Cellulose acetate butyrate microcapsules containing dextran ion-exchange resins as self-propelled drug release system. *Biomaterials*. Jul;26(20):4337-47.

Gebhardt, S.E. and R. Cutrufelli, and R.H. Matthews. (1982). Composition of foods. *Agric. Handbook 8-9. U.S. Department of Agriculture*, Washington, DC.

Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr*. May;50(3):213-24. Review.

Giomaro G, Karioti A, Bilia AR, et al. (2014). Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal*.;8:45.

Gouin S. (2004), Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies. *Trends in Food Science and Technology* 15, 330 – 347

Gregoriadis G, Florence AT. . (1993). Liposomes in drug delivery. *Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. Drugs* Jan;45(1):15-28.

Gropper S. Sareen, Jack L. Smith , James L. Groff (2007) Διατροφή και μεταβολισμός. *IATPIKES EKAΘΣΕΙΣ Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΑΗΣ*

Gu, Y.; Barrault, J.; Jérôme, F. (2007- 2012). Glycerol as an efficient promoting medium for organic reactions. *Adv. Synth. Catal.*, 2008, 350,

Guenzler, H., & Gremlich, H.U. (2002). IR Spectroscopy An introduction. *Germany: Wiley-VCH*.

Guignon, B.; Duquenoy, A.; Dumoulin, E.D. (2002). Fluid bed encapsulation of particles: Principles and practice. *Drying Technol.*, 20, 419–447.

Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanonerm, P.; Drilleau, J. F. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (Malus domestica var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1698-1705.

Hafner A, Dürriegl M, Pepić I, Filipović-Grčić J. (2011). Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*.;59(9):1117-23

Harborne. J. B. (1989). Methods in plants biochemistry, *I: Plant phenolics*. Academic Press, London

Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, 20, 21-29.

Huber, G. M., & Rupasinghe, H. P. V. (2009). Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. *Journal of Food Science*, 74, 693–699.

Jamileh M. Lakkis, (2016). Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, *2nd Edition* (Book online)

Javaid Ashraf Newshehri, Zulfiqar Ali Bhat, Mohammad Yaseen Shah, (2015). Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts, *Food Research International*, Volume 77, Part 3, November, Pages 333-348

Jessy Shaji, Sneha Iyer (2012). Double-loaded liposomes encapsulating Quercetin and Quercetin beta-cyclodextrin complexes: Preparation, characterization and evaluation, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 218-226

Kalogeropoulos N, Konteles S, Mourtzinou I, Troullidou E, Chiou A, Karathanos VT. (2009). Encapsulation of complex extracts in beta-cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. *J Microencapsul.* Nov;26(7):603-13.

Kalogeropoulos Nick ^{a,*,}, Konstantina Yannakopoulou^b, Aristeia Gioxi^a, Antonia Chiou^a, Dimitris P. Makris. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract ^c

Karn B (2008) The road to green nanotechnology. *J Ind Ecol* 12(3):263–266.

Karvela E, Makris DP, Karathanos VT (2012) Implementation of response surface methodology to assess the antiradical behaviour in mixtures of ascorbic acid and α -tocopherol with grape (*Vitis vinifera*) stem extracts. *Food Chem* 132:351–359

Karger, Barry L. (1997). "HPLC: Early and Recent Perspectives". *Journal of Chemical Education*

Kashif Ameer, Hafiz Muhammad Shahbaz, and Joong-Ho Kwon . (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* · January

Kelly Simon-Brown, Kevin Mis Solval, Aranee Chotiko, Luis Alfaro, Vondel Reyes, Chen Liu, Bennett Dzandu, Emmanuel Kyereh, Andrea Goldson Barnaby, Ian Thompson, Zhimin Xu, Subramaniam Sathivel, (2016). Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 70, July, Pages 119-125

Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T., Rupasinghe, H.P.V., (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J. Food Compos. Anal.* 21, 396–401.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. Med. J.*, 312, 478-81.

Knezevic Z, D Gosaki, M Hraste, I Jalsenjak (1998). Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid *Journal of Microencapsulation*, 15 pp. 237–252

Kokkinou, A.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M.; Mentzafos, D. (2001). Structure of the complex of β -cyclodextrin with β -naphthoxyacetic acid in the solid state and in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, 332, 85-94.

Krishnaswamy, K., Orsat, V., & Thangavel, K. (2012). Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 255–264

Lamperi, L., Chiuminatto, U., Cincinelli, A., Galvan, P., Giordani, E., Lepri, L., Del Bubba, M., (2008). Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6536–6546.

Lea, A.G.H., Arnold, G.M., (1978). The phenolics of ciders : bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 478-483.

Lee Chang Y., (2012). Common Nutrients and Nutraceutical Quality of Apples *Department of Food Science Cornell University*

Lee, C.Y. and L.R. Mattick. (1989). Composition and nutritive value of apple products, *In: D. Downing. (ed.). Processed Apple Products*. Van Nostrand Reinhold, New York pp. 303-322.

Lee, C.Y. and R.S. Shallenberger, and M.T. Vittum. (1970). Free sugars in fruits and vegetables. *N.Y. Food Life Sci. Bull.* 1: 1-12.

Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D.O., Lee, H.J., Lee, C.Y., (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (22), 6516– 6520.

Le-Marchand, L.; Murphy, S. P.; Hankin, J. H.; Wilkens, L. R.; Kolonel, L. N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 154-160.

Liu, R. H.; Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y. (2001). Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. *N. Y. Fruit Q.*, 9, 15-17.

Loftsson, T.; Brewster, M.E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, 85, 1017-1025

Loftsson, T.; Masson, M. (2001). Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, 225, 15-30.

Lontos, AE; Soukatzidis, FA; Demosthenous, DA; Baldoukas, AK; (2008). Effect of extrusion parameters and die geometry on the produced billet quality using finite element method, "*Proceedings of the 3rd international conference on manufacturing engineering (ICMEN)*", Chalkidiki, Greece", 215-28,

LOUKAS, YANNIS, L.; VRAKA, VASSILIA; GREGORIADIS, GREGORY, (1998). Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: A novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *International Journal of Pharmaceutics* (Amsterdam) 162(1-2): 137-142

LOUKAS, YANNIS, L.; VRAKA, VASSILIA; GREGORIADIS, GREGORY, (1998). Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: A novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *International Journal of Pharmaceutics* (Amsterdam) 162(1-2): 137-142

Lu, Z., Chen, R., Fu, R., Xiong, J., & Hu, Y. (2011). Cytotoxicity and inhibition of lipid peroxidation activity of resveratrol/cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 73(1–4), 313–320

Luengo E, Álvarez I, Raso J. . (2014). Improving Carotenoid Extraction from Tomato Waste by Pulsed Electric Fields. *Frontiers in Nutrition*;1:12.

M.J. McCann, C.I.R. Gill, G. O' Brien, J.R. Rao, W.C. McRoberts, P. Hughes, R. McEntee, I.R. Rowland (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 45, Issue 7, July, Pages 1224-1230

Madene A, Jacquot M., I Scher J., Desobry S.; (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 4, pp 11-21

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P., (2005). Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 298, pp. 55–67

Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Comp Anal* 20:125–132

Marco Grossi, Giuseppe Di Lecce, Marco Arru, Tullia Gallina Toschi, Bruno Riccò, (2015). An opto-electronic system for in-situ determination of peroxide value and total phenol content in olive oil, *Journal of Food Engineering*, Volume 146, February, Pages 1-7, ISSN 0260-8774

Mark, S. and Alger, M. (1997) Polymer science dictionary. *Springer*. p. 152

Matouskova P, Marova I, Bokrova J, Benesova P. (2016). Effect of Encapsulation on Antimicrobial Activity of ¹Herbal Extracts with Lysozyme. *Food Technology and Biotechnology*.;54(3):304-316.

Matthias Fromm, Helene M. Loos, Sandra Bayha, Reinhold Carle, Dietmar R. Kammerer, (2013). Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds, *Food Chemistry*, Volume 136, Issues 3–4, 1–15, Pages 1277-1287

Mazza, G.; Velioglu, Y. S. (1992). Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples. *Food Chem.*, 43, 113-117.

Mazza, G.; Velioglu, Y. S. (1992). Anthocyanins and other phenolic compounds in fruits of red-flesh apples. *Food Chem.*, 43, 113-117.

McCormack B, Gregoriadis G. (1994). Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: A novel concept in drug delivery. *Int J Pharm*;112:249-58.

McCormack B, Gregoriadis G. (1994). Entrapment of cyclodextrin-drug complexes into liposomes: Potential advantages in drug delivery. *J Drug Target*;2:449-54.

McRae, K. B.; Lidster, P. D.; De Marco, A. C.; Dick, A. J. (1990). Comparison of the polyphenol profiles of the apple fruit cultivars by correspondence analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 50, 329- 342.

Meier, M.; Luiz, M.; Szpoganicz, B.; Soldi, V. (2001). Thermal analysis behavior of β - and γ - cyclodextrin inclusion complexes with capric and caprylic acid. *Thermochim. Acta.*, 375, 153-160.

Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, ~ E. (2010). Effect of HP--cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*, 118(3), 769–773.

Mercader-Ros, M. T., Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J. A., Fortea, M. I., Martínez-Cachá, A., & Núñez-Delicado, ~ E. (2010). Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4675–4680.

Merken, H. M.; Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 577-599.

Moon, J., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655-1666.

Mourtzinis I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. (2007). Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *J Agric Food Chem*.

Mourtzinis I, Anastasopoulou E, Petrou A, Grigorakis S, Makris D, Biliaderis CG. (2016). Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. *J Food Sci Technol*. Nov;53(11):3939-3947.

Mourtzis, N.; Cordoyiannis, G.; Nounesis, G.; Yannakopoulou, K. (2003). Single and double threading of Congo Red into γ -cyclodextrin. Solution structures and thermodynamic parameters of 1:1 and 2:2 adducts, as obtained from NMR spectroscopy and microcalorimetry. *Supramol. Chem.*, 15, 639-649.

Mudgil D, Barak S, Khatkar BS. (2012). X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *Int J Biol Macromol.* May 1;50(4):1035-9

Naczki M., Shahidi F., (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, , 41, 1523–1542

Nathalia D. Aceval Arriola, Patrícia Mattos de Medeiros, Elane Schwinden Prudencio, Carmen Maria Olivera Müller, Renata Dias de Mello Castanho Amboni (2016). Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content, *Food Bioscience*, Volume 13, 1, Pages 32-4

Nedovica Viktor *, Ana Kalusevica, Verica Manojlovicb, Steva Levica, Branko Bugarskib (2011). An overview of encapsulation technologies for food Applications *Procedia Food Science* 1 1806 – 1815

Neng, L., Zhang, J., Yang, J., Zhang, F., Lopez, I. A., Dong, M., & Shi, X. (2015). Structural changes in the blood-labyrinth barrier of aged C57BL/6 mice. *Cell and Tissue Research*, 361(3), 685–696

Nguyen, T. A., Liu, B., Zhao, J., Thomas, D. S., & Hook, J. M. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*, 136(1), 186–192

Nileeka Balasuriya, H.P. Vasantha Rupasinghe (2012). Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract, *Food Chemistry*, Volume 135, Issue 4, 15 December, Pages 2320-2325

Nilsson D., Cox M., Lehninger (2007). Βασικές Αρχές Βιοχημείας., *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*,

Ozogul Yesim, İlknur Yuvka, Yılmaz Ucar, Mustafa Durmus, Ali Rıza Kösker, Mustafa Öz, Fatih Ozogul, (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 75, January, Pages 677-684

Paramera, E.I., Konteles, S.J., & Karathanos, V.T. (2011). Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food Chemistry*, 125(3): 913-922.

Park J, Kim J, Kim MK. (2007). Onion flesh and onion peel enhance antioxidant status in aged rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. Feb;53(1):21-9.

Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* Jun;100(6):1171-85.

Pasrija D., P.N. Ezhilarasi, D. Indrani, C. Anandharamakrishnan, (2015). Microencapsulation of green tea polyphenols and its effect on incorporated bread quality, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 64, Issue 1, November, Pages 289-296

Pickersgill, B. (2009). Guide to Cultivated Plants. By Elzebroek T. and Wind K.. Wallingford, UK: CAB International (2008), pp. 540

Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym.* Jan 30;101:121-35.

Pinto, Luciana, M.A.; Marcelo B. de Jesusa; Eneida de Paulaa; Antonio C.S.; Linob. Joel B. Alderete; Helio A. Duarted; Yuji Takahata. (2004). Elucidation of inclusion compounds between β -cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. *J. Mol. Struct.*, 678, 63–66.

Pisoschi AM, Cheregi MC, Danet AF. (2009). Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*.

Podsadek, A.; Wilska-Jeska, J.; Anders, B.; Markowski, J. (2000). Compositional characterisation of some apple varieties. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 268-272.

Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G, Mainland CM (1998) Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and 264 Plant Foods Hum Nutr (2010) 65:260–265 anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 46:2686–2693

Ramírez-Ambrosi, M., Caldera, F., Trotta, F. et al. (2014) Phenom Macrocycl Chem Encapsulation of apple polyphenols in β -CD nanosponges *J Incl* 80: 85.

Reineccius, G.A. (1988). Spray drying of food flavours. In: Flavour encapsulation, Reineccius G.A. and Risch S.J. Eds, Washington: ACS. pp. 55–66.

Rekharsky, M.; Inoue, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. (1998). *Chem. Rev.*, 98, 1875-1917.

Ribeiro SMR, deQueiroz JH, deQueiroz MELR, Campos FM, Santana HMP (2007) Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. *Plant Foods Hum Nutr* 62:13–17

Risch SJ (1995): Encapsulation: overview of uses and techniques. In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredient, eds SJ Risch & GA Reineccius, pp. 1±7. *ACS Symposium Series 590*. Washington, DC: *American Chemical Society*.

Robert P, Fredes C. (2015). The encapsulation of anthocyanins from berry-type fruits. Trends in foods. *Molecules*. Apr 3;20(4):5875-88.. Review.

Roos, Y.H. (1995). Phase Transitions in Foods, *Academic Press*, New York ..

Rupasinghe HP, Erkan N, Yasmin A. (2010). Antioxidant protection of eicosapentaenoic acid and fish oil oxidation by polyphenolic-enriched apple skin extract. *J Agric Food Chem*.

- Salem, I., & Duzgunes, N., (2003). Efficancies of cyclodextrin- complexed and liposome- encapsulated clarithromycin against Mycobacterium auium complex infection in human macrophages, *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 403- 414.
- Sapino, S.,Carlotti,M. E.,Caron, G., Ugazio, E., & Cavalli,R.(2008). Insilicodesign,photostability and biological properties of the complex resveratrol/hydroxypropyl- -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63(1/2), 171–180.
- Satvir Sekhon-Loodu, Sumudu N. Warnakulasuriya, H.P. Vasantha Rupasinghe, Fereidoon Shahidi, (2013). Antioxidant ability of fractionated apple peel phenolics to inhibit fish oil oxidation, *Food Chemistry*, Volume 140, Issues 1–2, 1–15 Pages 189-196
- Schneider HJ, Hacket F, Rüdiger V, Ikeda H. NMR (1998). Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem Rev.* Jul 30;98(5):1755-1786
- Schrooyen P.M.M., R. van der Meer, C.G. De Kruif (2001). Microencapsulation: its application in nutrition *Proceedings of the Nutrition Society*, 60 pp. 475–479
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*
- Sharma Om P., Tej K. Bhat, (2009)DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, Volume 113, Issue 4, 15 April, Pages 1202-1205, ISSN 0308-8146,
- Shehata E, Grigorakis S, Loupassaki S, Makris DP (2015) Extraction optimization using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two Artemisia species. *Sep Purif Technol* 149:462–469
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (1998). Principles of instrumental analysis. *Philadelphia: Saunders College Pub.*
- Sparks, R. E., & Jacobs, I. C. (1999). Selection of coating and microencapsulation processes. *Controlled Release and Delivery Systems of Pesticides.*, 3–29
- Sri, K. V., Kondaiah, a., Ratna, J. V., & Annapurna, A. (2007). Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33(3), 245–253
- Stuart B., (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. *ATTS-Analytical Techniques in the Sciences Series*. ISBN: 978-0-470-85428-0,

Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H., (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25), 7449–7454.

Surangi H. Thilakarathna, H.P. Vasantha Rupasinghe, Paul W. Needs, (2013). Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation, *Food Chemistry*, Volume 138, Issue 1, 1 May, Pages 463-470

Surangi H. Thilakarathna, Yanwen Wang, H.P. Vasantha Rupasinghe, Khadija Ghanam, (2012). Apple peel flavonoid- and triterpene-enriched extracts differentially affect cholesterol homeostasis in hamsters, *Journal of Functional Foods*, Volume 4, Issue 4, October, Pages 963-971

Szente, L.; Szejtli, J. (2004). Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Tech.*, 15, 137142.

Tavares, G.D., Viana, C.M., Araujo, J., Ramaldes, G.A., Carvalho, W., Pesquero, J.L., Vilela, J., Andrade, M., Oliveira, M., (2006). Development and physico- chemical characterization of cyclodextrin- DNA complexes loaded liposomes, *Chemical Physics Letters*, 429, 507-512.

Tlili N, Elfalleh W, Saadaoui E, Khaldi A, Triki S, Nasri N. (2011). The caper (Capparis L.): ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*.

Tlili N, Khaldi A, Triki S, Munné-Bosch S. (2010). Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (Capparis spinosa). *Plant Foods Hum Nutr*.

Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4989–4995

Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51, 6347–6353.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference 28 slightly revised May (2016)

Van Aken, Koen, Lucjan Strekowski, and Luc Patiny. (2006). “EcoScale, a Semi-Quantitative Tool to Select an Organic Preparation Based on Economical and Ecological Parameters.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 2

Velasco, J.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H. (2004). Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.*, 85, 623-632.

Vinson, J. A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5315-5321.

VOIRIN, S. G.; BAUMES, R. L.; BITTEUR, S. M.; GÜNATA, Y. Z.; BAYONOVE, C. L.; (1990). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1373-1378.

Vrhovšek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F., (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6532–6538.

Wada L, Ou B (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem* 50:3495–3500

Weber PC, Salemme FR. (2003). Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Curr Opin Struct Biol.* Feb;13(1):115-21.

Wolfe K, Wu X, Liu RH. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.* Jan 29;51(3):609-14.

Xing, N.; Chen, Y.; Mitchell, S. H.; Young, C. Y. F. (2001). Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 22, 4094-14

Yannakopoulou, K.; Mentzafos, D.; Mavridis, I. M.; Dandika, K. (1996). Chiral recognition of (R)- ()-1,7-dioxaspiro-[5.5]undecane by hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)- α -cyclodextrin *Angew. Chem. Int. Ed.*, 35, 2480-2482.

Ying Xu, Mingtao Fan, Junjian Ran, Tingjing Zhang, Huiye Sun, Mei Dong, Zhe Zhang, Haiyan Zheng, (2016). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 23, Issue 3, May, Pages 379-388

Yuliani, S.; Torley, J.P.; D'Arcy, B.; Nicholson, T.; Bhandari, B. (2006). Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food. Res. Int.*, 39, 318-331.

Zeller B.L., Saleeb F.Z., and Ludescher R.D, (1998). Trends in Development of Porous Carbohydrate Food Ingredients for Use in Flavor Encapsulation, *Trends in Food Science & Technology* 9(11-12):389-394

Zhang, M., Li, J., Zhang, L., & Chao, J. (2009). Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1891–1895

Zheltikov, A. (2006), Understanding NMR Spectroscopy, James Keeler, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2005, pp. 459, paperback, ISBN: 0470017872. *J. Raman Spectrosc*

Zuidam NJ, Crommelin DJ. (1995). Chemical hydrolysis of phospholipids. *J Pharm Sci.* Sep;84(9):1113-9.

A. Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη(2003). *Βιοχημεία τροφίμων*.

Οι νέες ποικιλίες μήλων στην Ελλάδα. Περιοδικό "Φρουτονέα", (2005) .Άρθρο "101 προϊόντα κατοχύρωσαν την ελληνική ταυτότητα", Κατάλογος των ΠΟΠ – ΠΓΕ προϊόντων. *Εφημερίδα "Το Βήμα"*,

Καραθάνος Β. Ύψιμειώσεις φυσικοχημείας τροφίμων (2010-2011). *Χαροκόπειο πανεπιστήμιο*

Μουρτζίνος Ι. (2007). Προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση διατροφιδραστικών ουσιών μικροενθυλακωμένων σε δομές βιοπολυμερών. *Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο*,

Μπόσκου Δ (2004). Ύψιμειά Τροφίμων. *Εκδόσεις Γαρταγάνη*

Ραπτοπούλου Ξένη (2011). Εγκλεισμός εκχυλίσματος σε β-κυκλοδεξτρίνη: μελέτη απόδοσης, ελεγχόμενης απελευθέρωσης και αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, *Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο*,