



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής
και Αγροτικού Περιβάλλοντος



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

Βελτιστοποίηση της εκχύλισης πολυφαινολών από σκόνη κακάο, με την τεχνική
Εκχύλισης στο Σημείο Νέφωσης.

Optimization of polyphenol extraction from cocoa powder, using the technique of
Cloud Point Extraction.

Φοιτητής: Λιονάκης Νικόλαος

Επιβλέπουσα: Δρ. Γκορτζή Όλγα

Ακαδημαϊκό Έτος: 2022-2023



Ημερομηνία: 5/10/2023

ΣΕΛΙΔΑ ΣΚΟΠΙΜΑ ΚΕΝΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της πτυχιακής εργασίας, Διδάκτορα κ. Όλγα Γκορτζή για την ευκαιρία που μου παρείχε να εμβαθύνω στον τομέα της επιστήμης, ανάλυσης και διαχείρισης των τροφίμων, ενώ παράλληλα να ανακαλύψω εξειδικευμένες και εξεζητημένες γνώσεις πάνω σε καινοτόμες τεχνολογίες όσον αφορά τον τομέα αυτόν. Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να δώσω την ευγνωμοσύνη μου στους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Κολώνα και Χριστίνα Αδαμάκη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση, καθώς και για τον χρόνο και το ενδιαφέρον που διέθεσαν για τη διεκπεραίωση αυτής της έρευνας. Επιπλέον, να ευχαριστήσω και τον κ. Ιωάννη Βαγγέλα του οποίου η συνεισφορά με βοήθησε να ενισχύσω με ολοκληρωμένα δεδομένα το πείραμα της διατριβής. Τέλος, δίνω τις θερμότερες ευχαριστίες την οικογένειά μου και στους τους φίλους μου για τη στήριξη και ενθάρρυνσή τους, όχι μόνο κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της μελέτης της πτυχιακής, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου καριέρας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT.....	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΚΑΚΑΟ: ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	16
1.1 Σημασία του κακάο και ταξινόμηση του	16
1.2 Το κακάο στην ιστορία	16
1.3 Φυσιολογία του κακάο	18
1.4 Καλλιέργεια του κακάο.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Η ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ	22
2.1 Χρήσεις και Προϊόντα του κακάο	22
2.1.1 Η παραγωγή σοκολάτας.....	22
2.1.2 Λικέρ Κακάο	23
2.2 Η επεξεργασία του κακάο και τα υποπροϊόντα της.....	24
2.2.1 Η κατεργασία των κόκκων	24
2.2.2 Αλκάλωση και υποπροϊόντα κακάο	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ	26
3.1 Χημική Σύσταση του κακάο και Διατροφική Αξία	26
3.1.1 Χημική Σύσταση.....	26
3.1.2 Διατροφική αξία.....	28
3.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	29
3.3 Ορισμός πολυφαινόλων.....	30
3.3.1 Χημική Διάταξη και Σύσταση πολυφαινόλων	30
3.3.2 Ταξινόμηση των πολυφαινόλων	31
3.3.3 Οι πολυφαινόλες του κακάο.....	32
3.4 Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών του Κακάο.....	36
3.5 Οι επιδράσεις διαφόρων χημικών μεταβολών στην συγκέντρωση των πολυφαινόλων κατά την επεξεργασία του κακάο	40
3.5.1 Αλλαγές κατά το στάδιο της ζύμωσης	42
3.5.2 Αλλαγές κατά το στάδιο της ξήρανσης.....	42
3.5.3 Αλλαγές κατά τα δευτερεύοντα στάδια επεξεργασίας.....	44
3.6 Αναφορά σε άλλες πηγές πολυφαινόλων	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Η ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ	50

4.1 Τρόπος Δράσης, Μεταβολισμός και η Αντιοξειδωτική ιδιότητα των Πολυφαινολών	50
4.1.1 Η σχέση των Αντιοξειδωτικών και των πολυφαινολών	50
4.1.2 Οι πολυφαινόλες ως Αντιοξειδωτικά	52
4.1.3 Τα οφέλη των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό	53
4.1.4 Ο Μεταβολισμός και η βιοαπορρόφηση των πολυφαινολών στον οργανισμό	55
4.2 Η αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΣΗΜΕΙΟ ΝΕΦΩΣΗΣ (CLOUD POINT EXTRACTION) ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	70
5.1 Οι «πράσινες» μέθοδοι εκχύλισης	70
5.2 Οι κυριότερες τεχνικές Εκχύλισης	70
5.2.1 Οι κυριότερες συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης	70
5.2.2 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα [αγγλ.: Microwave-assisted extraction (MAE)]	75
5.2.3 Εκχύλιση μέσω ψυχρού πλάσματος [αγγλ.: Cold plasma assisted extraction]	75
5.2.4 Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού [αγγλ.: Supercritical Fluid Extraction (SFE)]	76
5.2.5 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχηση [αγγλ.: Ultrasound assisted extraction (UAE)]	77
5.2.6 Επιταχυνόμενη Εκχύλιση με Διαλύτη	78
5.2.7 Εκχύλιση με τη χρήση ενζύμων	80
5.3 Περιγραφή της Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης	80
5.4 Εφαρμογές της CPE σε τρόφιμα	84
5.4.1 Υλοποίηση σε επεξεργασμένα τρόφιμα και φυτικά προϊόντα	84
5.4.2 Απομόνωση Βιοδραστικών	84
5.3.3 Ανάλυση συστατικών τροφίμων	89
5.4.4 Ανάλυση προσθέτων τροφίμων	89
5.5 Πλεονεκτήματα, περιορισμοί και προοπτικές εφαρμογής της CPE	90
5.7 Αξιολόγηση των τεχνικών εκχύλισης των βιοδραστικών τροφίμων	90
5.8 Διερεύνηση των παραμέτρων διεκπεραίωσης της CPE	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	103
6.1 Συνοπτική επεξήγηση	103
6.2 Περιγραφή του τρόπου εκπόνησης	103

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	104
7.1 Υλικά	104
7.2 Μέθοδοι.....	106
7.2.1 Εκχύλιση σε Σημείο Νέφωσης (Cloud Point Extraction)	106
7.2.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός τις συγκέντρωσης των πολυφαινολών του κακάο με χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu.....	108
7.2.3 Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανακτηθέντων πολυφαινολών των μειγμάτων μέσω της αξιολόγησης της Αντιβακτηριακής ιδιότητάς.....	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	115
8.1 Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης των πολυφαινολών που ανακτήθηκαν μέσω Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης (CPE) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	115
8.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης.....	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ.....	125
9.1 Ανακεφαλαίωση της πειραματικού μέρους και γενική θεώρηση	125
9.2 Αξιολόγηση της CPE ως «πράσινης» τεχνικής εκχύλισης βιοδραστικών και μέτρα βελτιστοποίησής της	125
9.1.1 Μέτρα βελτιστοποίησης της CPE	125
9.1.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της τεχνικής CPE.....	126
9.3 Εκτίμηση της ανακτηθείσας συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών του κακάο	127
9.4 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης.....	129
9.5 Διερεύνηση της αξιοποίησης των αντικειμένων της μελέτης στη βιομηχανία λειτουργικών τροφίμων και φαρμάκων	129
Βιβλιογραφία	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η σημαντικότητα του κακάο για τη φυλή των Μάγια, (Cacao, A Mesoamerican Treasure Chocolate Class, 2018)	17
Εικόνα 2: Ερνάν Κορτές. Συναντιέται με τον αυτοκράτορα των Αζτέκων στην Τενίτσελαν (Ο Κατακτητής Του Μεξικού Ερνάν Κορτές - Newsbeast, 2013)	17
Εικόνα 3: Μία σύντομη απεικόνιση της εξέλιξης του κακάο ανά τους αιώνες (McMahan Liz, 2014)	18
Εικόνα 4: Κακαόδεντρο μαζί με ώριμους καρπούς (L. Russell Cook, 2023).....	20
Εικόνα 5: Ανοιγμένος καρπός του κακαόδεντρου με τους σπόρους του, (L. Russell Cook, 2023).....	21
Εικόνα 6: Υποπροϊόντα του κακάο. (Agudelo et al., 2021).....	23
Εικόνα 7: Καλλυντικό από βούτυρο κακάο για σώμα και πρόσωπο, από το ηλεκτρονικό κατάστημα Biosophy (https://www.biosophy.gr/Solid-Cacao-Butter-Frangipani-Face-Body-54ml-Lamazuna)	24
Εικόνα 8: Κόκκοι κακάο σε αποξηραμένη μορφή (Engels Jonathon, 2022)	25
Εικόνα 9: Φλαβονόλες κακάο (Aprotosoaie et al., 2016)	33
Εικόνα 10: Προκυανιδίνη B1 (Aprotosoaie et al., 2016)	34
Εικόνα 11: Προκυανιδίνη B2 (Aprotosoaie et al., 2016)	34
Εικόνα 12: Προκυανιδίνη C1 (Aprotosoaie et al., 2016).....	35
Εικόνα 13: Όλες οι ομάδες και βασικότερες ενώσεις πολυφαινολών του κακάο (Aprotosoaie et al., 2016).....	36
Εικόνα 14: Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (MAE) (Ingle et al., 2017)	75
Εικόνα 15: Εκχύλιση μέσω Ψυχρού Πλάσματος (Picot-Allain et al., 2021).....	76
Εικόνα 16: Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Ingle et al., 2017)	77
Εικόνα 17: Πιθανές μέθοδοι διαλυτοποίησης σωματιδίων σε μικκύλια. Α – διαλυτοποιημένα μόρια τοποθετημένα ακριβώς δίπλα στην υδρόφοβη αλυσίδα μικκυλίων, Β – διαλυτοποιημένα μόρια που βρίσκονται μέσα στα μικκύλια για να σχηματίσουν μια ξεχωριστή φάση (Melnyk et al., 2015).....	82
Εικόνα 18: Πιθανή θέση διαλυτοποιημένων μορίων χημικών ενώσεων σε αντίστροφα μικκύλια (Melnyk et al., 2015)	82
Εικόνα 19 Ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση του αρχικού μείγματος πριν την εφαρμογή του επιφανειοδραστικού (λεκιθίνη).....	107
Εικόνα 20 Υπερήχηση του αρχικού μείγματος.....	107
Εικόνα 21 Ο διαχωρισμός των φάσεων της CPE.....	108
Εικόνα 22 Προετοιμασία των μειγμάτων για τη δοκιμασία της Folin-Ciocalteu	111
Εικόνα 23 Δείγματα έτοιμα προς φασματοφωτομέτρηση	111
Εικόνα 24 Εφαρμογή και διασπορά των φάσεων και των βακτηρίων στα τριβλία για δοκιμασία	113
Εικόνα 25 Ανάδευση σε incubator.....	113
Εικόνα 26 Επώαση στο επωαστήριο	114
Εικόνα 27 Καταμέτρηση των αποικιών που προέκυψαν.....	114

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κύρια συστατικά ζυμωμένων κόκκων (Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;, 2021.).....	26
Πίνακας 2: Σύσταση σκόνης κακάο (Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;, 2021).....	27
Πίνακας 3: Ποσότητες γλυκεριδίων στο βούτυρο κακάο (Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;, 2021).....	27
Πίνακας 4: Θρεπτικά Συστατικά που περιέχονται σε σκόνη κακάο και 1 κουτ. Κακάο (Παπαχρήστου Πάρης & Κόκκαλη Αναστασία, 2006).....	28
Πίνακας 5: Ποσότητες αντιοξειδωτικών του κακάο και των διασημότερων υποπροϊόντων τους (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).....	30
Πίνακας 6: Οι κύριες κλάσεις των Πολυφαινόλων, (Bravo, 1998)	32
Πίνακας 7: Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα από εμπορικούς σπόρους κακάο. TAC, συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα- POLY, πολυφαινόλες (Ramos-Escudero et al., 2021)	38
Πίνακας 8: Βιοδραστικές ουσίες του κακάο σε διάφορες λατινοαμερικανικές ποικιλίες (Ramos-Escudero et al., 2021)	39
Πίνακας 9: Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζονται με τη μέθοδο DPPH σε διαφορετικά δείγματα (Bubonja-Sonje et al., 2011)	40
Πίνακας 10: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε μετά από τη διαδικασία της ζύμωσης (Ching lik Hii et al., 2009).....	42
Πίνακας 11: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε μετά από διαδικασία ξήρανσής του (Ching lik Hii et al., 2009).....	43
Πίνακας 12: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε πολυφαινόλες ύστερα από τις διαδικασίες της αλκάλωσης και του καβουρδίσματος. (Ching lik Hii et al., 2009)	45
Πίνακας 13: Περιεκτικότητα (mg/100g) πολυφαινόλων σε διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης (Συρίμπεη, 2006).....	48
Πίνακας 14: Η περιεκτικότητα των πολυφαινόλων σε διάφορα φυτικά προϊόντα (Bravo, 1998).....	49
Πίνακας 15: Η δράση των πολυφαινόλων σε διάφορες νόσους (Cory et al., 2018; Wang et al., 2014; Y. Zhou et al., 2016).....	53
Πίνακας 16: Δοκιμασία αντιβακτηριακής δράσης. όπου MIC: Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση MBC: Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση. (Indrianingsih et al., 2021).....	64
Πίνακας 17 Ελάχιστες ανασταλτικές (MIC) και ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MBC) ολικών εκχυλισμάτων πολυφαινόλων και καθαρών	

πολυφαινολών έναντι του <i>Listeria</i> spp, όπου EPI = επικατεχίνη, HT = υδροξυτυροσόλη, OPOE = εκχύλισμα πολυφαινόλης ελαιολάδου. CPE = εκχύλισμα πολυφαινόλης κακάο. CA = καρνοσικό οξύ, V40 = εκχύλισμα δεντρολίβανου (Bubonja-Sonje et al., 2011).	66
Πίνακας 18: Αντιβακτηριακή δράση των μικροκαψουλών με ενθυλακόμενο εκχύλισμα CSP, όπου CSP: σκόνη κελύφους κακάο, GAM: μικροκάψουλα αραβικού κόμμεος (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με GA), MDM: μικροκάψουλα μαλτοδεξτρίνης (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με MD), GMM: αραβικό κόμμι + μικροκάψουλα μαλτοδεξτρίνης (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με το μείγμα GA+MD). (Jafari et al., 2023)	69
Πίνακας 19: Τύποι διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοδραστικών (Koçak & Pazır, 2018)	72
Πίνακας 20: Μελέτες που εστιάζουν στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά με συμβατικές μεθόδους (Koçak & Pazır, 2018)	74
Πίνακας 21: Επισκόπηση της εφαρμογής της CPE στην εξαγωγή βιοδραστικών από υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων (Arya et al., 2019)	86
Πίνακας 22: Επισκόπηση της εφαρμογής του ΚΠΦ στην εξαγωγή βιοδραστικών από φαρμακευτικά φυτά (Arya et al., 2019)	88
Πίνακας 23 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των τεχνικών "πράσινης" εκχύλισης βιοδραστικών φυτικής προέλευσης (Picot-Allain et al., 2021)	91
Πίνακας 24: Επίδραση της τιμής pH στην απόδοση της CPE χρησιμοποιώντας 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 (Chatzilazarou et al., 2010)	94
Πίνακας 25: Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της CPE χρησιμοποιώντας 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 (Chatzilazarou et al., 2010)	95
Πίνακας 26: Αποτελέσματα εφαρμογής CPE διπλής ανάκτησης σε οινολάσπη με χρήση 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 σε κάθε βήμα σε ποσοστό ανάκτησης φαινόλης και της συγκέντρωσης φαινολών στη διαχωρισμένη επιφανειοδραστική φάση (mg/L). (Chatzilazarou et al., 2010)	96
Πίνακας 27: Μεμονωμένη ανάκτηση φαινόλης (%) κατά ένα βήμα CPE με 0,2–5% (v/v) Genapol X-080 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης, όπου P υποδεικνύει σημαντική διαφορά ($P \leq 0,05$) των ανακτήσεων μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικών ουσιών, ** υποδεικνύει μη σημαντική διαφορά ($P \leq 0,05$) και οι ^a τιμές είναι μέσα τριών προσδιορισμών. Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση. (Gortzi et al., 2008)	99
Πίνακας 28: Ανάκτηση φαινόλης (%), από μείγμα δέκα φαινολών (50 ppm η καθεμία), κατά ένα βήμα CPE με 2–20% (v/v) Genapol X-080 στην ίδια θερμοκρασία (55 °C), όπου οι ^a τιμές είναι μέσα τριών προσδιορισμών. Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση (Gortzi et al., 2008).	100
Πίνακας 29: Ανάκτηση φαινόλης (%) με CPE δύο ή τριών σταδίων με 2–20% (v/v) Genapol X-080 από λύματα ελαιολιτριβείου (Gortzi et al., 2008).	101
Πίνακας 30: Βαθμονόμηση της φασματοφωτομέτρησης μέσω της μεθόδου Folin Ciocalteu	110

Πίνακας 31: Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu, όπου MO: μέσος όρος, SD: Τυπική Απόκλιση.....	115
Πίνακας 32: Η % Ανάκτηση των φαινολικών στις μικκυλιακές δομές.....	116
Πίνακας 33 Αποτελέσματα Βακτηριακής Δοκιμής.....	117
Πίνακας 34: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (one way-ANOVA) μεταξύ των μικροοργανισμών. της μεταχείρισης και της μεταξύ τους συσχέτισης	118
Πίνακας 35: Post hoc σύγκριση μικροοργανισμών – μεταχείρισης	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Συνολική φαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων του T. cacao (PC για μωβ παραλλαγή· ΥC για κίτρινη παραλλαγή) (Indrianingsih et al., 2021).....	40
Διάγραμμα 2: Επιπτώσεις στην περιεκτικότητα του κακάο σε (+)-κατεχίνες μετά από τις διαδικασίες προπαρασκευής του (Ching lik Hii et al., 2009)	41
Διάγραμμα 3: Σχηματική αναπαράσταση βιοαπορρόφησης των πολυφαινολών κατά μήκος της πεπτικής οδού (Eran Nagar et al., 2020)	59
Διάγραμμα 4: Πορεία των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).....	63
Διάγραμμα 5: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης των ολικών πολυφαινολών του ελαιολάδου έναντι του <i>Listeria monocytogenes</i> . Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: έλεγχος (χωρίς φάρμακο), 0,2 m 0,2 mg/ml (0,5 × MIC), 0,4 mg/ml (1 × MIC), 0,8 mg/ml (2 × MIC), 1,6 mg/ml (4 × MIC), ο 3,2 mg/ml (8 × MIC) (Bubonja-Sonje et al., 2011)	66
Διάγραμμα 6: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης των ολικών πολυφαινολών κακάο έναντι του <i>Listeria monocytogenes</i> . Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: κοντρόλ (χωρίς φάρμακα), 0,8 mg/ml (0,5 × MIC), 1,6 mg/ml (1 × MIC), 3,2 mg/ml (2 × MIC), 6,4 mg/ml (4 × MIC) (Bubonja-Sonje et al., 2011)	67
Διάγραμμα 7: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης του εκχυλίσματος πολυφαινόλης δεντρολίβανου έναντι του <i>Listeria monocytogenes</i> . Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: ■ έλεγχος (χωρίς φάρμακα), □ 0,025 mg/ml (0,5 × MIC), ▲ 0,05 mg/ml (1 × MIC) (Bubonja-Sonje et al., 2011)	67
Διάγραμμα 8: Εκπόρευση της Εκχύλισης ψυχρού πλάσματος (Sangeetha Karunanithi et al., 2022)	76
Διάγραμμα 9: Διαδικασία εκπόνησης της CPE (Arya et al., 2019)	82
Διάγραμμα 10: Κύρια σημεία στην εξαγωγή σημείων νέφωσης (Arya et al., 2019)	83
Διάγραμμα 11 Καμπύλη απορρόφησης Γαλλικού Οξέος για τη βαθμονόμηση της μεθόδου Folin Ciocalteu	116

Διάγραμμα 12 Καμπύλη συσχέτισης της %Συγκέντρωσης λεκιθίνης με τη Συγκέντρωση (mg/L) των ολικών φαινολικών στις μικκυλιακές φάσεις.....	128
Διάγραμμα 13 Καμπύλη γραμμικής συσχέτισης %Ανάκτησης των ολικών φαινολικών και της %Συγκέντρωσης w/w λεκιθίνης.....	128

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή, αναλύθηκαν η σημασία και τα οφέλη της κατανάλωσης σκόνης κακάο (T. cocoa), ιδιαίτερα η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, και οι τρόποι με τους οποίους αυτές απορροφούνται και δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Ταυτόχρονα, ένα πρωτόκολλο Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης (CPE) με τη βοήθεια υπερήχων εισήχθη ως μια «πράσινη» μέθοδος για την εξαγωγή και τον προσδιορισμό τέτοιων βιοδραστικών χημικών ουσιών με μήτρα τη σκόνη κακάο εμπορίου. Παρουσιάστηκαν γενικά στοιχεία για το κακάο, όπως η σημασία του στην ιστορία και στο σύγχρονο εμπόριο, η καλλιέργειά του, ο τρόπος επεξεργασίας του και τα υποπροϊόντα της. Αναλύθηκαν οι πολυφαινόλες του κακάο για τη διατροφική τους αξία και τις πιθανές θετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Περιεγράφηκαν οι πιθανές περιεκτικότητές τους στο κακάο, οι παράγοντες που τις επηρεάζουν καθώς και η αντιοξειδωτική δράση τους. Επεξηγήθηκε η διαδικασία της CPE, ως μίας χημικώς καθαρής μεθοδολογίας, και έγινε συγκριτική αξιολόγηση τόσο με τις συμβατικές όσο και με άλλες σύγχρονες και καινοτόμες «πράσινες» μεθόδους, ενώ παρατηρήθηκαν οι παράγοντες που καθορίζουν τη μικκυλλιοποίηση. Για τη CPE με υπέρηχους, χρησιμοποιήθηκε λεκιθίνη σόγιας. Μετρήθηκαν οι μάζες του δείγματος και εφαρμόστηκαν ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας (45°C & 54°C), pH(=3), αλατότητας (5% NaCl) καθώς και ανάδευσης του μείγματος (1500 rpm). Η βέλτιστη συγκέντρωση λεκιθίνης αξιολογήθηκε για 5%, 10%, 15% και 20% w/w. Ο διαχωρισμός φάσεων διεξήχθη με φυγοκέντρωση (4000 rpm). Ο προσδιορισμός της Ολικής Φαινολικής Περιεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομέτρηση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Για το αντιβακτηριακό τεστ, μικκυλιακές και υγρές φάσεις απλώθηκαν σε τριβλία για την αξιολόγηση της αναστολής στα βακτήρια *S. aureus* και *E. coli*. Τα αποτελέσματα έδειξαν περιεκτικότητα πολυφαινολών στα 8,03-9,68 mg/L. Η %Ανάκτηση ήταν 45,03-53,6%. Η αντιβακτηριακή ανασταλτική ζώνη υποτιμήθηκε, που συνεπάγεται με υπονόμηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου.

Λέξεις – κλειδιά: κακάο, πολυφαινόλες, εκχύλιση, αντιοξειδωτικά

ABSTRACT

In this thesis, the importance and benefits of consuming cocoa powder (*T. cocoa*), particularly the polyphenol content, and the ways in which they are absorbed and act in the human body were analyzed. At the same time, an ultrasound-assisted Cloud Point Extraction (CPE) protocol was introduced as a “green” method for the extraction and determination of such bioactive chemicals with a commercial cocoa powder matrix. General information about cocoa were presented, such as its importance in history and modern trade, its cultivation, its process and its by-products. Cocoa polyphenols were analyzed for their nutritional value and potential positive effects on human health. Their possible cocoa contents, the factors influencing them and their antioxidant activity were described. The process of CPE, as a chemically clean methodology, was explained and benchmarked against both conventional and other modern and innovative "green" methods, and the factors that determine micellization were observed. For ultrasound CPE, soy lecithin was used. Sample masses were measured and mild conditions of temperature (45°C & 54°C), pH(=3), salinity (5% NaCl) and stirring of the mixture (1500 rpm) were applied. The optimal lecithin concentration was evaluated for 5%, 10%, 15% and 20% w/w. Phase separation was performed by centrifugation (4000 rpm). Total Phenolic Content was determined by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu reagent. For the antibacterial test, micellar and liquid phases were spread on bearings to evaluate the inhibitory activity on *S. aureus* and *E. coli* bacteria. The results showed polyphenol content at 8.03-9.68 mg/L. The %Recovery was 45.03-53.6%. The antibacterial inhibitory zone was underestimated, which implies an impairment of the total phenolic content.

Keywords: cocoa, polyphenols, extraction, antioxidants

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κακάο είναι από τις πιο διαδεδομένες τροφές στην καθημερινότητα. Αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της προόδου στη βιομηχανία τροφίμων. Από τις τροπικές ρίζες του στο Μεξικό, αξιοποιούμενο ως ενεργειακό ποτό, μέχρι το σήμερα, όπου, ιδιαίτερα η μετατροπή του σε σοκολάτα, πλέον καταβάλλει κυρίαρχο ρόλο στη ζαχαροπλαστική, μπορεί να καταλάβει κανείς τη σημαντικότητα της εξέλιξης αυτής. Στην σημερινή αγορά, εμφανίζεται σε διάφορα προϊόντα είτε μόνο του, όπως σκόνη ή μπάρες κακάο ή σοκολάτας, είτε ως συστατικό άλλων προϊόντων, για παράδειγμα ως άλειμμα ζαχαροπλαστικής. Το ενδιαφέρον για το κακάο προέρχεται από τον ιδιαίτερα πλούσιο αρωματικό και γευστικό του χαρακτήρα, διαθέτοντας μια πληθώρα κυκλικών και αρωματικών ενώσεων, προσφέροντας τόσο θρεπτική όσο και γευστική αξία (*Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;*, 2021). Έτσι για τους λόγους αυτούς, το κακάο έχει πρόσφατα κερδίσει αυξανόμενη προσοχή στον τομέα των τροφίμων (Balzer et al., 2008). Οι ιδιότητες αυτές επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες ή παραμέτρους, όπως ο τρόπος καλλιέργειας, ο τόπος καλλιέργειας, η ποικιλία ο τρόπος επεξεργασίας και κυρίως της ζύμωσης και της ξήρανσης κ.α. (Ching lik Hii et al., 2009; Indrianingsih et al., 2021; Ramos-Escudero et al., 2021).

Τα τελευταία χρόνια, το κακάο έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα ως «θαυματουργός» τροφή, ικανή να θωρακίσει και ενισχύσει την άμυνα και τη φυσική κατάσταση του οργανισμού έναντι διάφορων παθήσεων. Αναφορές υπάρχουν στην αντιοξειδωτική του ιδιότητα και πιο συγκεκριμένα στην ολική φαινολική περιεκτικότητα, κάνοντας λόγο για βελτίωση της κατάστασης, όπως σε ασθένειες καρδιολογικής φύσεως και ο διαβήτης (Aprotosoaie et al., 2016). Ο τρόπος δράσης των πολυφαινόλων ως αντιοξειδωτικά στον οργανισμό και η βιοαπορρόφηση τους αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης ακόμη και σήμερα (Eran Nagar et al., 2020; Jensen, 2003; Scalbert et al., 2005; Vladimir-Knežević et al., 2012; Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004). Συνεπακόλουθα διάφορες μελέτες της αντιοξειδωτικής και αντιβακτηριακής ιδιότητας του κακάο μας έχουν δώσει σημαντικά δεδομένα για το επίπεδο της αποτελεσματικότητας των πολυφαινόλων του στην αναστολή του πολλαπλασιασμού αποικιών βακτηρίων σε σύγκριση τόσο μεταξύ των διάφορων ποικιλιών του (Indrianingsih et al., 2021) όσο και με άλλα φυτικά προϊόντα, όπως το ελαιόλαδο και το δενδρολίβανο (Bubonja-Sonje et al., 2011).

Παράλληλα, έρευνες έχουν προχωρήσει στην εύρεση νέων «πράσινων» και ασφαλών τεχνολογιών εκχύλισης για τη μελέτη και χρήση βιοδραστικών ουσιών (Picot-Allain et al., 2021). Οι περισσότερες μελέτες έχουν βασιστεί σε συμβατικές τεχνολογίες απομόνωσης οι οποίες και συνεπακόλουθα φέρουν αξιόλογα μειονεκτήματα για την αξιοποίηση τέτοιων ουσιών σε βιομηχανική κλίμακα (Kozak & Pazir, 2018). Σε αυτές τις πράσινες μεθοδολογίες ανήκει και η Cloud Point Extraction (ελλ.: Εκχύλιση σε Σημείο Νέφωσης, συν: CPE), η οποία αξιοποιεί ήπιες συνθήκες και φιλικά προς το περιβάλλον μέσα για τη διεκπεραίωσή της. Η CPE έχει ως στόχο τη δέσμευση των ουσιών ενδιαφέροντος σε λιπόφιλους σχηματισμούς (μικκύλια). Ο εγκλωβισμός αυτός

πραγματοποιείται με χημικά αδρανής και καθαρή επιφανειοδραστική ουσία. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η αλλοίωση των ενώσεων της μελέτης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, πράγμα το οποίο θα γινόταν εάν χρησιμοποιούταν επιβλαβή αντιδραστήρια σε μία συμβατική εκχύλιση στερεού/υγρού-υγρού (Solid-Liquid ή Liquid-Liquid Extraction) (Arya et al., 2019; Chatzilazarou et al., 2010; Gortzi et al., 2008).

Η εν λόγω πτυχιακή εργασία αποτελείται από ερευνητικό και πειραματικό μέρος. Το ερευνητικό κομμάτι της αναδεικνύει τα οφέλη του κακάο, των πολυφαινολών του κακάο και κυριότερα της μεθοδολογίας Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης. Τα αντικείμενα αυτά επιλέχθηκαν με σκοπό την πρόταση νέων λειτουργικών τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών κλπ. μέσω της αξιοποίησης βιοδραστικών βιοχημικών ουσιών του κακάο με εφαρμογή καθαρώς χημικής μεθοδολογίας εκχύλισης. Επεξηγηματικά, οι εκτενείς μελέτες που έχουν γίνει για το κακάο και την ευεργετική του δράση, έχουν εδραιώσει μια θετική εικόνα σε πληθώρα εφαρμογών. Για τον λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαίο, η φιλοσοφία της απομόνωσης αυτών των ουσιών να λαμβάνει υπόψιν τόσο την εύκολη, σύντομη πραγματοποίηση της διαδικασίας με κοινώς διαθέσιμα υλικά, όσο και την αποφυγή πιθανής αλλοίωσης των συστατικών ενδιαφέροντος (Arya et al., 2019). Το πειραματικό κομμάτι έχει στόχο να αναδείξει, να αποδείξει και να βελτιώσει τη μεθοδολογία της CPE, καθώς και να προτείνει τρόπους εφαρμογής των ουσιών ενδιαφέροντος που εκχυλίστηκαν (Chatzilazarou et al., 2010; Gortzi et al., 2008).

- ✓ Στο 1^ο Κεφάλαιο, όπου και ξεκινά το ερευνητικό μέρος, παρουσιάζονται γενικά στοιχεία του κακάο, δηλαδή η ιστορία του, η βιολογική του ταξινόμηση, η φυσιολογία του και ο τρόπος καλλιέργειας. Περιγράφονται βασικές πληροφορίες και η ταξινόμηση του κακάο. Γίνεται μια γενική εικόνα για την προέλευση του κακάο και τη σημασία του στο παγκόσμιο εμπόριο και, επιπλέον, παρουσιάζονται συνοπτικά στοιχεία φυσιολογίας, όπως το περιβάλλον ανάπτυξης του, η ανατομία του φυτού, τα στάδια ανάπτυξης κ.α., και καλλιέργειας, όπως ο τρόπος πολλαπλασιασμού, η διαμόρφωση και η συγκομιδή.
- ✓ Στο 2^ο Κεφάλαιο παρουσιάζονται η κατεργασία και επεξεργασία του κακάο από ακατέργαστους καρπούς σε εμπορεύσιμη ύλη (σοκολάτα, είδη ζαχαροπλαστικής, λικέρ κλπ.). Περιγράφονται τα στάδια επεξεργασίας και αναλύονται τμηματικά οι ενέργειες που λαμβάνουν χώρα ούτως ώστε το κακάο να μετατραπεί και αξιοποιήσιμες ύλες, τα γνωστά σε όλους σκόνη και βούτυρο κακάο. Δίνεται μια γενική εικόνα στα προϊόντα του κακάο καθώς και ο πιθανός τρόπος αξιοποίησης τους στο εμπόριο.
- ✓ Στο 3^ο Κεφάλαιο υπό τη μορφή πινάκων παρατίθενται τα θρεπτικά στοιχεία και η σύσταση του κακάο. Στη συνέχεια, αναπτύσσονται υπό τη μορφή διαγραμμάτων η περιγραφή, η ταξινόμηση, η περιεκτικότητα και οι μεταβολές των πολυφαινολών, χημικώς ενεργών μορίων αντιοξειδωτικής φύσεως.
- ✓ Στο 4^ο Κεφάλαιο πραγματοποιείται η ανάλυση της βιοδραστικότητας των πολυφαινολών του κακάο δηλαδή, αναφέρονται τα οφέλη στην υγεία όπου έχουν

συγκεντρωθεί από διάφορες έρευνες, ακόμη αναφέρεται ο τρόπος μεταβολισμού τους στον άνθρωπο καθώς και η αντιβακτηριακή τους δράση.

- ✓ Στο 5^ο Κεφάλαιο παρουσιάζεται και περιγράφεται η Εκχύλιση σε Σημείο Νέφωσης (Cloud Point Extraction, abn: CPE), μιας χημικώς καθαρής μεθόδου εκχύλισης ενεργώς δραστικών ουσιών, καθώς επίσης τα οφέλη της και τις προοπτικές που έχει στη βιομηχανία μεταποίησης και επεξεργασίας τροφίμων. Παράλληλα, συγκρίνεται με άλλες διαθέσιμες συμβατικές και «πράσινες» μεθοδολογίες εκχύλισης και αναδεικνύεται ο ορθός τρόπος εκπόρευσής της.
- ✓ Στο 6^ο Κεφάλαιο καθορίζονται οι στόχοι της πτυχιακής εργασίας. Γίνεται μία συνοπτική επεξήγηση των στόχων, των μεθόδων που εφαρμόστηκαν και της κύριας ιδέας με την οποία αυτή πραγματοποιήθηκε.
- ✓ Το 7^ο Κεφάλαιο αποτελεί αρχή του πειραματικού μέρους και εμπεριέχει παρουσίαση των Υλικών και των Μεθόδων που εφαρμόστηκαν σε αυτό.
- ✓ Το 8^ο Κεφάλαιο επισημαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα καθώς και μία συγκριτική αξιολόγηση με αυτά άλλων ερευνητών από τη διεθνή βιβλιογραφία από παρόμοιου αντικειμένου μελέτες
- ✓ Στο 9^ο Κεφάλαιο παρατίθενται τα συμπεράσματα της μελέτης και συζητούνται οι πιθανές εφαρμογές της CPE καθώς και των πολυφαινολών του κακάο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΚΑΚΑΟ: ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

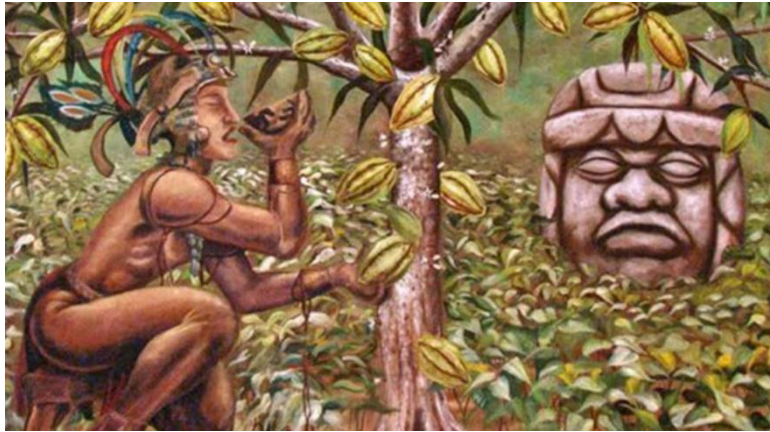
1.1 Σημασία του κακάο και ταξινόμηση του

Το κακάο ή αλλιώς αγγλ.: «cocoa» (επιστημονική ονομασία *Theobroma cacao*, οικογένεια Malvaceae) είναι ένα τροπικό αειθαλές φυτό, του οποίου η καλλιέργεια έχει επεκταθεί και είναι διάσημη για τους εδώδιμους καρπούς του. Η επιστημονική του ονομασία αναγνωρίζει τη σημασία του ως «τροφή των θεών» ελληνιστί. Ευδοκίμει σε πεδιάδες με τροπικά δάση όπως οι λεκάνες του Αμαζονίου και του Ορινόκο. Το κακάο συναντάται σε εμπορική κλίμακα στα τροπικά μέρη του Νέου Κόσμου όπως επίσης και στις ηπείρους της Αφρικής (δυτικά) και στις τροπικές περιοχές της Ασίας. Οι καρποί του, επονομαζόμενοι κόκκοι κακάο, κατεργάζονται προς την παραγωγή σκόνης κακάο, βουτύρου κακάο (λίπους κακάο) και σοκολάτας (L. Russell Cook, 2023).

1.2 Το κακάο στην ιστορία

Το κακάο αποτελεί ένα από τα βασικότερα είδη τρόφιμου που καταναλώνεται από κοινού στην ημερήσια διατροφή. Σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, κυρίως στη ζαχαροπλαστική, υπό διάφορες μορφές. Η εμπορική φήμη του έχει δώσει μία πληθώρα υποπροϊόντων με κορυφαίο τη σοκολάτα.

Η ιστορία του ξεκινάει στην Κεντρική Αμερική το 1500 με 1900 μ.Χ. Οι Ολμέκοι ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν τους καρπούς να τα καταναλώνονται με μεγάλη μανία από αρουραίους. Σύντομα ανακάλυψαν τις ευεργετικές ιδιότητες του και τις πολλαπλές χρήσεις του. Ανέφεραν, μάλιστα, ότι είχαν εφεύρει τον τρόπο επεξεργασίας των σπόρων κακάο. Οι κόκκοι κακάο αλέθονταν και ανακατεύονταν με νερό και άλλα συστατικά, όπως τσίλι και βότανα, για την παρασκευή ενός ροφήματος, το οποίο είχε τονωτικές ιδιότητες. Σύντομα, επεκτάθηκε και στους υπόλοιπους λαούς της Κεντρικής Αμερικής, όπως τους Μάγια και τους Αζτέκους. Αποτελούσε μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες της ηπείρου, αφού οι σπόροι κακάο αποτελούσαν κομμάτι ιεροτελεστιών και τελετουργιών, καθώς θεωρούνταν «σπόρος που χαρίστηκε από τους θεούς». Οι Αζτέκοι, επίσης, τους χρησιμοποιούσαν ως νόμισμα και ως ανταμοιβή στους στρατιώτες όταν νικούσαν τη μάχη, ενώ το ρόφημα δεν έλλειπε από τις βασιλικές γιορτές. Οι Τσιμέκοι, κατακτημένος από τους Αζτέκους λαός, επιβάλλονταν να πληρώνουν φόρους με σπόρους κακάο ως αντίτιμο (*The History of Chocolate* - Deanna Pucciarelli - YouTube, 2017).



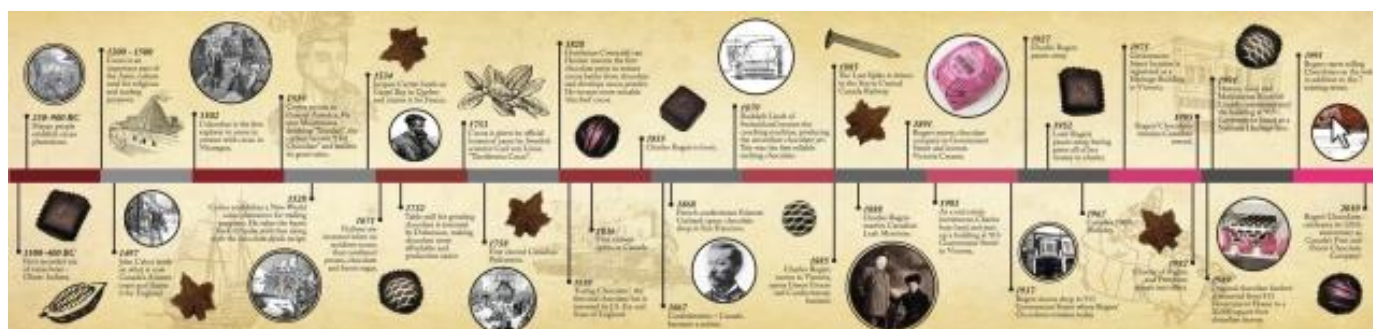
Εικόνα 1: Η σημαντικότητα του κακάο για τη φυλή των Μάγια, (Cacao, A Mesoamerican Treasure | Chocolate Class, 2018)

Στην ύστερη εποχή του 16^{ου} αιώνα, η Ισπανία ήταν η πρώτη ευρωπαϊκή χώρα η οποία έφερε το προϊόν στην Ευρώπη. Αναφέρεται ότι πιθανόν ο Κολόμβος ήταν αυτός που το έφερε πρώτος από τη Νικαράγουα στην Ευρώπη το 1502, χωρίς όμως να αναγνωρίσει την ιδιαίτερη σημασία του. Αντίθετα, Ε. Κορτές στο ταξίδι του στην Τεντίστελαν, πρωτεύουσα της Αζτέκινης αυτοκρατορίας που αποτελεί το σημερινό Μεξικό, γνώρισε το κακάο το 1528 και προσπάθησε να αναπτύξει εμπόριο και την καλλιέργεια στις κατεκτημένες περιοχές με σκοπό να το φέρει στην Ισπανία. Εκεί, λόγω της σημασίας του, προστατευόταν πολύ στενά από τις ισπανικές αρχές και αποτελούσε προνόμιο μόνο του παλατιού. Αργότερα, όμως, το 1585 ξεκίνησε να αναπτύσσεται το εμπόριο κακάο στην Ευρώπη, με τη μετακίνησή του από την Κ. Αμερική και το άνοιγμα εξειδικευμένων καταστημάτων στην Ισπανία. Η πικρή του γεύση το καθιστούσε ιδανικό ως φάρμακο για τους πόνους του στομάχου, ενώ κυκλοφορούσε η φήμη του ως αφροδισιακό. Η γνωστή σε όλους σοκολάτα εγκαθιδρύθηκε ως προϊόν τον ύστερο 16^ο αιώνα. Με την ανάμειξη του κακάο με γλυκαντικά όπως μέλι, ζάχαρη ή βανίλια, συνταγή έγινε ιδιαίτερα αγαπημένη στο ισπανικό παλάτι και σύντομα σε δεξιώσεις αριστοκρατών (History of Cocoa, 2008).



Εικόνα 2: Ερνάν Κορτές. Συναντιέται με τον αυτοκράτορα των Αζτέκων στην Τεντίστελαν (Ο Κατακτητής Του Μεξικού Ερνάν Κορτές - Newsbeast, 2013)

Από τον 17^ο και εξής ξεκίνησε η μαζική παραγωγή κακάο και η διάδοσή του στην υπόλοιπη Ευρώπη. Η διαδικασία ήταν δαπανηρή και χρονοβόρα καθώς περιλάμβανε τη μεταφορά σκλάβων από τις ακτές της Αφρικής στην Κ. Αμερική. Συνεπώς, η κατανάλωση του προερχόταν κυρίως από τις εύπορες τάξεις. Οι Άγγλοι ήταν οι πρώτοι που έφτιαξαν αναψυκτικό βασισμένο στο κακάο, ενώ το πρώτο κατάστημα στη Γαλλία εγκαταστάθηκε το 1659 στο Παρίσι. Με την εφεύρεση της πρέσας Βαν Χάουτεν στο Άμστερνταμ (1828), συσκευή ικανή να ξεχωρίζει το βούτυρο κακάο από τη σκόνη κακάο, διευκολύνθηκε η μαζική επεξεργασία του κακάο υπό μορφή σκόνης με σκοπό τη δημιουργία ροφήματος. Η σκόνη αυτή μετέπειτα μπορούσε να επαναχρησιμοποιηθεί μαζί με το βούτυρο στην παραγωγή της γνωστής μας σήμερα μπάρας σοκολάτας. Μετέπειτα, ο Ελβετός Ντάνιελ Πίτερς (1875), πρόσθεσε σκόνη γάλακτος στο μείγμα, δημιουργώντας τη γνωστή σε όλους σοκολάτα γάλακτος. Παράλληλα, η καλλιέργεια κακάο μεταφέρθηκε από το Μεξικό στις αφρικάνικες περιοχές του Ισημερινού, για την αποφυγή μεταφοράς σκλάβων, με τις περισσότερες να βρίσκονται έως σήμερα στην Ακτή Ελεφαντοστού. Έτσι, η κατανάλωση της σοκολάτας διαδόθηκε γρήγορα τις επόμενες δεκαετίες για να καταλήξει μετά το 20^ο αιώνα να είναι διαθέσιμη και για τις μέσες τάξεις και να αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς και λαχταριστές λιχουδιές στην ιστορία της ανθρωπότητας. (History of Cacao: Where Does Chocolate Come From And How Is It Made?, 2021.).



Εικόνα 3: Μία σύντομη απεικόνιση της εξέλιξης του κακάο ανά τους αιώνες (McMahan Liz, 2014)

1.3 Φυσιολογία του κακάο

Το κακάο αναπτύσσεται στα κατώτερα σκιερά μέρη δασών σε ύψος 6–12m, συνήθως παραμένοντας στο χαμηλότερο άκρο αυτής της περιοχής. Τα επιμήκη δερματώδη φύλλα του έχουν μήκος ελάσματος έως και 30 cm και ρίχνονται περιοδικά και αντικαθίστανται από νέα φύλλα που είναι εντυπωσιακά κόκκινα όταν είναι νεαρά. Τα άνθη του είναι είτε δύσσομα είτε άοσμα. Μπορούν να υπάρχουν ανά πάσα στιγμή αλλά εμφανίζονται σε αφθονία δύο φορές το χρόνο. Αυτά τα άνθη αναπτύσσονται σε ομάδες απευθείας από τον κορμό και τα άκρα και έχουν ύψος και πλάτος περίπου 1 cm (0,4 ίντσες). Μπορούν να είναι λευκά, ροζ, ροζ, κίτρινα ή έντονο κόκκινο, ανάλογα με την ποικιλία, και επικονιάζονται από μικροσκοπικές μύγες που ονομάζονται σκνίπες σε πολλές περιοχές.

Μετά από τέσσερα χρόνια το ώριμο κακαόδεντρο παράγει καρπούς με τη μορφή επιμηκών λοβών. Μπορεί να αποδίδει έως και 70 τέτοιους καρπούς ετησίως. Οι λοβοί,

ή τσέρελ, έχουν χρώμα από έντονο κίτρινο έως βαθύ μωβ. Ωριμάζουν σε λιγότερο από έξι μήνες σε μήκος έως 35 cm (14 ίντσες) και πλάτος στο κέντρο 12 cm (4,7 ίντσες). Κάθε λοβός έχει πολλές κορυφογραμμές που εκτείνονται κατά μήκος του και χωράει 20 έως 60 σπόρους, ή κόκκους κακάο, διατεταγμένους γύρω από τον μακρύ άξονα του λοβού. Οι οβάλ σπόροι έχουν μήκος περίπου 2,5 cm (1 ίντσα) και καλύπτονται με ένα γλυκό κολλώδες λευκό πολτό.

Το κακάο ευδοκιμεί σε υψόμετρα από 30 έως 300 μέτρα (100 έως 1.000 πόδια) πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας σε περιοχές όπου οι θερμοκρασίες δεν κυμαίνονται πολύ κάτω από 20 °C ή πάνω από 28 °C. Οι απαιτήσεις βροχοπτώσεων εξαρτώνται από τη συχνότητα και την κατανομή της βροχής και τον βαθμό κατακράτησης νερού από το έδαφος. η ελάχιστη απαραίτητη βροχόπτωση είναι περίπου 100 cm (39 ίντσες) ομοιόμορφα κατανεμημένες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, αλλά 150–200 cm (59–79 ίντσες) είναι η βέλτιστη. Η επιτυχής καλλιέργεια απαιτεί επίσης εδάφη βαθιά και καλά στράγγισης που είναι πορώδες και πλούσιο σε χούμο . Η προστασία από τους δυνατούς ανέμους είναι απαραίτητη λόγω του ρηχού ριζικού συστήματος του δέντρου (L. Russell Cook, 2023).

1.4 Καλλιέργεια του κακάο

Τα κακαόδεντρα είναι τροπικά φυτά και αναπτύσσονται καλύτερα σε υγρές συνθήκες σε θερμοκρασίες μεταξύ 18 και 32°C (65–90°F). Καλλιεργείται συνήθως σε περιοχές όπου η υγρασία της ημέρας φτάνει έως και το 100% και η υγρασία τη νύχτα είναι μεταξύ 70 και 80%. Τα φυτά απαιτούν ένα βαθύ, γόνιμο και καλά στραγγιζόμενο έδαφος με pH 5,0–7,5 για βέλτιστη ανάπτυξη. Το κακάο συνήθως καλλιεργείται σε τροπικές πεδινές περιοχές που είναι ευαίσθητες στην ξηρασία. Συνήθως δεν πρέπει να καλλιεργείται σε περιοχές με βροχοπτώσεις μικρότερες από 1 cm για περιόδους άνω των 3 μηνών. Οι σπόροι κακάο από υγιείς, ώριμους καρπούς παραμένουν βιώσιμοι για 3 εβδομάδες και συνήθως φυτεύονται αμέσως μετά τη συγκομιδή για την παραγωγή νέων σπορόφυτων. Οι σπόροι πρέπει να φυτευτούν σε ένα καλάθι φυτικών ινών ή σε πλαστική σακούλα φυτωρίου γεμάτη με καθαρό χώμα και να τοποθετηθούν σε σκιερό μέρος προστατευμένο από τον ήλιο για να αποφευχθεί το κάψιμο. Τα σπορόφυτα αναπτύσσονται γρήγορα και είναι έτοιμα για μεταφύτευση μετά από 4-6 μήνες. Το κακάο μπορεί επίσης να πολλαπλασιαστεί φυσικά μέσω μοσχευμάτων, στρωματοποίησης και εκβλάστησης. Τα μοσχεύματα πρέπει να έχουν 2-5 φύλλα και 1 ή 2 ανθικά στελέχη. Τα φύλλα πρέπει να κόβονται στο μισό πριν τοποθετηθούν τα μοσχεύματα σε ένα δοχείο και να καλυφθούν με πολυαιθυλένιο για εκκίνηση της ανάπτυξης των ριζών. Το marcotting (παραγωγή καταβολάδων/μοσχευμάτων), επιτυγχάνεται με την αφαίρεση μέρους του φλοιού από ένα βλαστό του δέντρου και την κάλυψη της περιοχής με ένα στρώμα από πριονίδι πριν την κάλυψη με πολυαιθυλένιο. Η καλυμμένη περιοχή θα αναπτύξει ριζικό σύστημα και στη συνέχεια μπορεί να αφαιρεθεί και να φυτευτεί. Η τελική μέθοδος, που ονομάζεται ενοφθαλμισμός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναζωογόνηση παλαιότερων φυτεύσεων και περιλαμβάνει την αποκοπή ενός οφθαλμού και την τοποθέτησή του κάτω από το φλοιό άλλου δέντρου. Ο σύνδεσμος στη συνέχεια σφραγίζεται. Μόλις ο

οφθαλμός αρχίζει να αναπτύσσεται η βλάστηση του δέντρου στο πάνω μέρος από αυτόν θα πρέπει να αφαιρεθεί. Τα νεαρά δέντρα είναι ευαίσθητα και απαιτούν κάποια προστασία από το έντονο ηλιακό φως και τις ζημιές από τον άνεμο. Η προστασία παρέχεται συνήθως με φύτευση δενδρυλλίων δίπλα σε μητρικά δέντρα. Αυτή η σκίαση βοηθά επίσης στην πρόληψη της υπερβολικής αύξησης των δέντρων, διατηρώντας τα σε ένα διαχειρίσιμο μέγεθος για συντήρηση και συγκομιδή. Τα δέντρα σκιάς είναι συνήθως άλλες καλλιέργειες όπως μπανάνα, καρύδα, πλαντάν ή καουτσούκ. Τα σπορόφυτα κακάου πρέπει να φυτεύονται σε απόσταση 3-4 m και 3-6 m από τα δέντρα σκιάς. Η σκίαση μπορεί να μειωθεί μόλις τα κακαόδέντρα σχηματίσουν ένα κλειστό θόλο, αλλά μερικά πρέπει να διατηρηθούν για να μειωθεί η καταπόνηση του νερού και η ζημιά από τα έντομα. Το φυτώριο κακάο πρέπει να διατηρείται χωρίς ζιζάνια ενώ τα φυτά εγκαθίστανται αλλά γενικά δεν απαιτούν ξεχορτάρισμα αφού τα δέντρα έχουν σχηματίσει κλειστό θόλο καθώς η έλλειψη φωτός κάτω από τα δέντρα εμποδίζει οποιαδήποτε περαιτέρω ανάπτυξη. Το κακάο πρέπει να τροφοδοτείται με πρόσθετα θρεπτικά συστατικά με λίπανση, ιδιαίτερα όταν τα δέντρα καλλιεργούνται σε φτωχά εδάφη ή χωρίς σκιά. Τα οργανικά λιπάσματα είναι γενικά προτιμότερα από τα ανόργανα, καθώς δεν καταστρέφουν το οργανικό περιεχόμενο του εδάφους και συντηρούν τη δομή του. Η ποσότητα του απαιτούμενου λιπάσματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία του δέντρου και η ποσότητα σκίασης, αλλά το ώριμο κακάο απαιτεί γενικά τουλάχιστον 50-100 kg / ha αζώτου, 25 kg / ha φωσφόρου, 75 kg / ha καλίου και 15 kg / ha μαγνησίου κάθε χρόνο (*Cocoa (Cacao) | Diseases and Pests, Description, Uses, Propagation*, n.d.).



Εικόνα 4: Κακαόδεντρό μαζί με ώριμους καρπούς (L. Russell Cook, 2023)

Για την αποφυγή εξάπλωσης ασθενειών και παρασίτων, έχει επικρατήσει η ιδέα της καλλιέργειας μικρής κλίμακας σε μικρές εκτάσεις (κάτω των δύο εκταρίων ή πέντε στρεμμάτων) αντί για φυτείες μεγάλης κλίμακας, όπου οι κίνδυνοι αυτοί επεκτείνονται ταχύτερα. Παρόλα αυτά, οι απώλειες παραγωγής λόγω φυτοϋγειονομικών προβλημάτων αγγίζει 30 έως 100 τοις εκατό των καλλιεργειών τους, ακόμη και με την εκτέλεση των απαραίτητων μεθόδων φυτοπροστασίας. Η καλλιέργεια του κακάο ενδείκνυται παράλληλα στην αγροδοασοκομία για φυτείες χαμηλών πυκνοτήτων μέσα

σε παρθένα τροπικά δάση, για την παροχή οικονομικής χρήσεως κοντά σε προστατευόμενες γαίες. Η φύτευση πραγματοποιείται από σπόρους ή μοσχεύματα, συνεπακολουθούμενης της μεταφύτευσής τους. Μαζί με το κακάο μπορεί να υπάρχει συγκαλλιέργεια μαζί με άλλα τροπικά δέντρα όπως μπανάνα, φοίνικες ή καουτσούκ για τη βελτίωση του μικροκλίματος του φυτού (π.χ. σκίαση και προστασία από τον αέρα). Οι ανθοφόροι οφθαλμοί πρέπει να αφαιρούνται από τα δέντρα έως ότου γίνουν πέντε ετών. Η καλλιέργεια μπορεί να αποδώσει λιγότερο των 100 έως πάνω από 3.000 κιλών ανά εκτάριο (110 έως 2.700 λιβρών ανά στρέμμα), με τον μέσο όρο παγκοσμίως να περιλαμβάνει τα 340 με 450 κιλά ανά εκτάριο (300 και 400 λίβρες ανά στρέμμα).

Οι ποικιλίες του κακάο ανήκουν σε τρεις γενικές ομάδες:

- **forastero**, που αξιοποιείται συχνότερα στο εμπόριο, από αυτών της *criollo*, οι οποίες είναι ευπαθείς σε ασθένειες και είναι λιγότερο διαδεδομένες.
- **criollo και**
- **trinitario**, που συνδυάζει τις ποικιλίες (υβριδισμός) *forastero* και *criollo* και αποδίδοντας έναν πιο αρωματικό καρπό για την παραγωγή μαύρης σοκολάτα υψηλής αξίας

Στην Κεντρική Αμερική μαζί με τους σπόρους του *T. cacao* συνδυάζονται οι αντίστοιχοι από την καλλιέργεια δύο συγγενικών ειδών (*T. bicolor* και *T. angustifolium*) όπου και αναμιγνύονται κατά τη μεταποίηση (L. Russell Cook, 2023).



Εικόνα 5: Ανοιγμένος καρπός του κακαόδεντρου με τους σπόρους του, (L. Russell Cook, 2023)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Η ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ

2.1 Χρήσεις και Προϊόντα του κακάο

Το γνωστό σε όλους κακάο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη βιομηχανία και στο εμπόριο τροφίμων. Κύριος λόγος είναι η χρήση του ως συστατικό στην σοκολάτα και σε πολλά άλλα γλυκά και συνταγές. Αδιαμφισβήτητα, δεν μπορεί κάποιος να παραβλέψει την ξεχωριστή γεύση και άρωμα που διαθέτει. Χρησιμοποιείται κυρίως υπό μορφή σκόνης. Το κακάο, όπως και άλλα προϊόντα που χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική (π.χ. βανίλια), διότι περιέχει πολλές αρωματικές ύλες. Παράλληλα, συναντάται και σε άλλες βιομηχανίες όπως αυτή της αρωματοποιίας, όπου το ξεχωριστό του άρωμα αξιοποιείται για την παραγωγή υψηλής ποιότητας αρωμάτων, και ως καλλυντικό (βούτυρο), λόγω των ευεργετικών του δράσεων στο δέρμα και στα μαλλιά (7 Elements Βιολογικό Cacao Butter (200 Gr) - NATANS, 2020).

2.1.1 Η παραγωγή σοκολάτας

Τα προϊόντα σοκολάτας συχνά απαιτούν την προσθήκη βουτύρου κακάο από ήδη διαθέσιμη στο διάλυμα. Η σοκολάτα σε διάφορες μορφές πωλείται σε συσκευασίες καταναλωτικού μεγέθους και σε μεγαλύτερα χύμα μεγέθη για χρήση από παραγωγούς τροφίμων και ζαχαροπλάστες. Τα περισσότερα ευρωπαϊκά ζαχαροπλαστεία παράγουν τη δική τους σοκολάτα, ενώ άλλα ζαχαροπλαστεία αγοράζουν σοκολάτα από εξειδικευμένους κατασκευαστές. Για τις μαζικές παραγγελίες, η σοκολάτα αποστέλλεται σε ζεστή, υγρή μορφή σε θερμαινόμενα, αποστειρωμένα βυτιοφόρα ή βυτιοφόρα αυτοκίνητα (L. Russell Cook, 2023).

Η **σοκολάτα ψησίματος** (μαύρη σοκολάτα), δημοφιλής στην οικιακή αρτοποιία και ζαχαροπλαστική, είναι ένα καθαρό λικέρ σοκολάτας που παρασκευάζεται από λεπτά αλεσμένους κόκκους, οι οποίοι είναι κομμάτια καβουρδισμένων και αποφλοιωμένων κόκκων κακάο. Αυτή η σοκολάτα είναι πικρή επειδή δεν περιέχει ζάχαρη και διατίθεται ως φυσική και αλκαλική σοκολάτα (L. Russell Cook, 2023).

Η **γλυκιά σοκολάτα** έχει συνήθως σκούρο χρώμα και παρασκευάζεται από λικέρ σοκολάτας, ζάχαρη, πρόσθετα βουτύρου κακάο και αρωματικές ύλες όπως βανίλια, βανιλίνη, αλάτι, μπαχαρικά και αιθέρια έλαια. Η γλυκιά σοκολάτα περιέχει συνήθως τουλάχιστον 15% λικέρ σοκολάτας και οι περισσότερες γλυκές σοκολάτες περιέχουν 25-35%. Τα συστατικά αναμειγνύονται, εξομαλύνονται (αλέθονται σε λείους σβώλους) και συμπυκνώνονται. Έπειτα, προστίθενται βούτυρο κακάο, λεκιθίνη (γαλακτωματοποιητής) ή και τα δύο για να ρυθμιστεί το ιξώδες (L. Russell Cook, 2023).

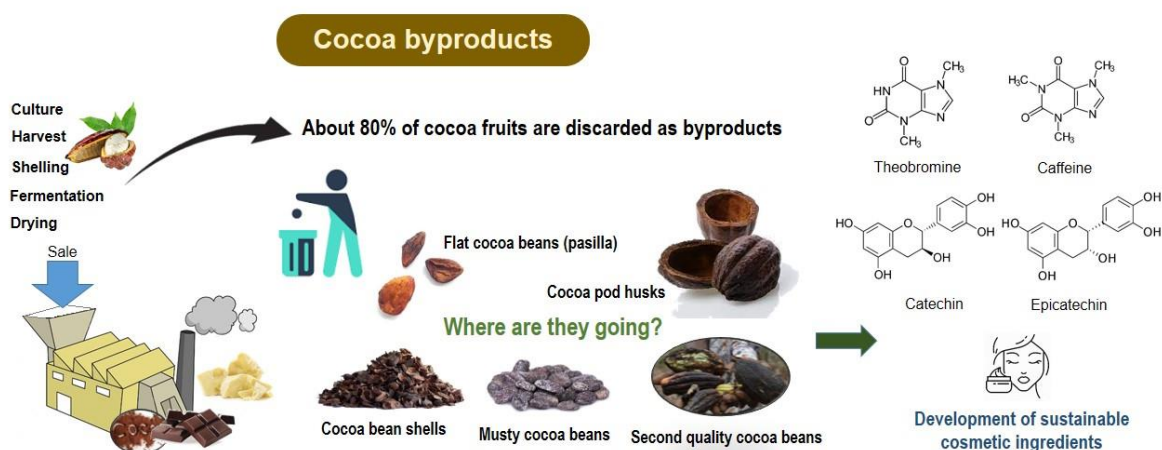
Η **σοκολάτα γάλακτος** παρασκευάζεται με αντικατάσταση μέρους της υγρής σοκολάτας που χρησιμοποιείται στη γλυκιά σοκολάτα με στερεά συστατικά από πλήρες γάλα. Συνήθως περιέχει τουλάχιστον 10% υγρό σοκολάτας και 12% ολικά στερεά υλικά από γάλα. Οι βιομηχανίες συνήθως υπερβαίνουν αυτές τις τιμές, προσεγγίζοντας το 12-15% σοκολατούχο υγρό και το 15-20% ολικά στερεά γάλακτος.

Η σοκολάτα γάλακτος αποτελείται από συστατικά γάλακτος που προστίθενται ως στερεά υλικά (σκόνη γάλακτος και σκόνη ορού γάλακτος) εξευγενισμένα με υγρό κακάο και ζάχαρη, τα οποία διασκορπίζονται στη λιπαρή φάση. Το κύριο λιπαρό συστατικό, το βούτυρο κακάο, συγκρατεί όλα τα στερεά σωματίδια ζάχαρης και κακάο μαζί. Πρόσθετα συστατικά, όπως η σκόνη γάλακτος, μπορούν να τροποποιήσουν σημαντικά τις λειτουργικές και χημικοφυσικές ιδιότητες, καθώς και τη συνολική ποιότητα των προϊόντων σοκολάτας εν γένει (Larčikoná et al., 2022).

Τα **αλείμματα ζαχαροπλαστικής** παρασκευάζονται με παρόμοια μέθοδο, αλλά με διαφορετικούς τύπους σοκολάτας. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, μέρος ή όλο το υγρό της σοκολάτας αντικαθίσταται με σκόνη κακάο και αντί της ενσωμάτωσης βουτύρου κακάο, με σημείο τήξης περίπου 32-33 °C, χρησιμοποιούνται άλλα φυτικά έλαια με ίσα ή υψηλότερα σημεία τήξης. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, αυτή η επίστρωση αναφέρεται νόμιμα ως "επικάλυψη γλυκού κακάο και φυτικού λίπους (εκτός από κακάο)". Ομοίως, η επικάλυψη που χρησιμοποιείται στο παγωτό και σε άλλα κατεψυγμένα προϊόντα, γνωστή ως «επικάλυψη γλυκιάς σοκολάτας και φυτικών λιπαρών (εκτός από το βούτυρο κακάο)», αντικαθιστά το βούτυρο κακάο που βρίσκεται στη σοκολάτα με φυτικά λίπη που έχουν χαμηλότερο σημείο τήξης, όπως το λάδι καρύδας. (L. Russell Cook, 2023)

2.1.2 Λικέρ Κακάο

Σε μικρότερη κλίμακα, το κακάο χρησιμοποιείται ως λικέρ το οποίο μπορεί να υποστεί περεταίρω καβούρδισμα και αλκάλωση για να αλλάξει το χρώμα και η γεύση του, που επίσης θα προκαλέσει και αλλαγή στη χημική του σύσταση (*Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;*, 2021).



Εικόνα 6: Υποπροϊόντα του κακάο. (Agudelo et al., 2021)



Εικόνα 7: Καλλυντικό από βούτυρο κακάο για σώμα και πρόσωπο, από το ηλεκτρονικό κατάστημα Biosophy (<https://www.biosophy.gr/Solid-Cacao-Butter-Frangipani-Face-Body-54ml-Lamazuna>)

2.2 Η επεξεργασία του κακάο και τα υποπροϊόντα της

2.2.1 Η κατεργασία των κόκκων

Όπως προαναφέρθηκε, το κακάο αρχικά συναντάται υπό μορφή «φασολιών», οι οποίοι για να μετατραπούν σε εμπορεύσιμη ύλη πρέπει να υποστούν επεξεργασία. Αφού τα φασόλια ληφθούν από το καρπό, πρέπει να υποστούν **αποξήρανση** και πάτημα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η μετατροπή τους σε κόκκους κακάο. Ακολουθεί ο καθαρισμός, όπου στη διαδικασία αυτή, απομακρύνονται οι ξένες ύλες, έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα λειτουργίας των μηχανών καθώς και να αποφευχθεί αλλοίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Ανάλογα του είδους των ξένων υλών που έχουν αναμειχθεί με τους κόκκους, εφαρμόζονται συνδυαστικά διαφορετικές μέθοδοι διαχωρισμού. Για παράδειγμα, για τον σίδηρο εφαρμόζονται μαγνήτες, ενώ στις πέτρες παρατηρείται το «πλεονέκτημα» πως έχουν διαφορετική πυκνότητα από το προϊόν και έτσι αξιοποιείται η δόνηση και ο αέρας. Επόμενο βήμα είναι το **καβούρδισμα** και το **κοσκίνισμα**, διαδικασίες οι οποίες, στοχεύουν στη μετατροπή του αρχικού προς παραγωγή του αντίστοιχου επιθυμητού εμπορικού καθώς και στην καταστολή της μικροβιακής δράσης στους κόκκους. Τέλος, υπάρχει το **λίχνισμα**, δηλαδή η αφαίρεση του κελύφους και μέρους των φύτρων, και η **άλεση**. Το δεύτερο πραγματοποιείται βάσει δύο αρχών: ικανοποιητική τροποποίηση του μεγέθους τους και αποδέσμευση όσο περισσότερου λίπους γίνεται (ΧΡΗΤΗ & ΒΑΡΖΑΚΑΣ, 2017).



Εικόνα 8: Κόκκοι κακάο σε αποξηραμένη μορφή (Engels Jonathon, 2022)

2.2.2 Αλκάλωση και υποπροϊόντα κακάο

Αρχικό βήμα πριν την πραγματοποίηση της λήψης των προϊόντων κακάο αποτελεί η **αλκάλωση**. Διαδικασία που ανακαλύφθηκε στην Ολλανδία του 18^{ου} αιώνα, η αλκάλωση υλοποιείται για να αποτρέψει τη δημιουργία συσσωματωμάτων κατά την ανάμειξη με γάλα ή άλλου υγρού τρόφιμου. Η πρακτική αυτή έχει τη δυνατότητα να αλλάζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος προσφέροντας ιδιαίτερο άρωμα και γεύση. Χορήγηση αλκαλικού διαλύματος, κατά κύριο λόγο ανθρακικού καλίου, σε μικρές ποσότητες γίνεται πριν το ψήσιμο. Για τον έλεγχο του pH, προστίθεται αιθανοϊκό ή τρυγικό οξύ, αλλά για ορισμένες ποικιλίες όπου η γεύση είναι ήδη όξινη, λόγω της έντονης παρουσίας των προαναφερθέντων οξέων. Η μεταχείριση γίνεται σε μικρότερη κλίμακα, για την εξισορρόπηση της γεύσης. Η μεταβολή του χρώματος οφείλεται στις ταννίνες (polyhydroxyphenols) και, με κατά κύριο ποσοστό, στις επικατεχίνες. Αναφορικά, με τις προαναφερθείσες διαδικασίες παρατηρείται η απόχρωση του προϊόντος, η οποία πλέον μεταβάλλεται σε σκούρα. Επομένως, με την παραμετροποίηση συνθηκών όπως: pH, θερμοκρασία και χρόνος ψησίματος κόκκων προκύπτει μεγάλη γκάμα τελικών προϊόντων (ΧΡΗΤΗ & ΒΑΡΖΑΚΑΣ, 2017).

Κύρια υποπροϊόντα του κακάο είναι η **σκόνη κακάο** και το **βούτυρο (λίπος) κακάο**. Η μεν σκόνη παράγεται από την άλεση συμπιεσμένης μάζας κόκκων σε ειδικές πρέσες και κατόπιν ψύξη με μύλο ακίδων και, εν συνεχεία, αέρα. Περιέχει 20-22% λιπαρά, ενώ υπάρχουν και με λιγότερα, λ.χ. 15-17% ή 10-12%. Χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, είτε μόνη της σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής ή αρτοποιίας (π.χ. κέικ και λοιπά βουτήματα ή κρέμες κακάο), είτε για παραγωγή ροφήματος σοκολάτας ή αρωματισμένης σοκολάτας, με επανένωση με το λιπαρό μέρος. Το δε βούτυρο κακάο είναι φυτικό λίπος σε ρευστή μορφή με τις γνώριμες στο εμπόριο αρωματικές και γευστικές ιδιότητες του κακάο, είναι πλούσιο σε βιταμίνες, όπως η Ε, και ιχνοστοιχεία και διαθέτει ενώσεις αντιοξειδωτικού χαρακτήρα. Οι θεραπευτικές ιδιότητες που προαναφέρθηκαν αποδίδονται κυρίως σε αυτό. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν όσα παραπροϊόντα συνδυάζονται με λανολίνη (ΧΡΗΤΗ & ΒΑΡΖΑΚΑΣ, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ

3.1 Χημική Σύσταση του κακάο και Διατροφική Αξία

Το κακάο είναι ένα σύνθετο τρόφιμο το οποίο εμπεριέχει πληθώρα ωφέλιμων συστατικών. Τα συστατικά αυτά διαφέρουν ανάλογα της ποικιλίας και του τρόπου καλλιέργειας του φυτού (Ramos-Escudero et al., 2021). Σε αυτό το κεφάλαιο αναλύονται περαιτέρω τα συγκεκριμένα στοιχεία σε επιμέρους πίνακες.

3.1.1 Χημική Σύσταση

Το κακάο περιέχει ένα σύμπλεγμα από ωφέλιμες, κυρίως, χημικές ενώσεις. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας οι μεταβολές της φυσικής σύστασης επηρεάζουν επιδρώντας στη χημική αντίστοιχα. (*Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;*, 2021). Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται αναλυτικά τα κύρια συστατικά των ζυμωμένων κόκκων:

Πίνακας 1: Κύρια συστατικά ζυμωμένων κόκκων (*Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;*, 2021.)

	Μύτη (w _{max} %)	Καρπός (w _{max} %)
Υγρασία	3.2	6.6
Λίπος (βούτυρο κακάο, λίπος κελύφους)	57	5.9
Τέφρα	4.2	20.7
Άζωτο		
Ολικό άζωτο	2.5	3.2
Θειοβρωμίνη	1.3	0.9
Καφεΐνη	0.7	0.3
Άμυλο	9	5.2
Ακατέργαστες ίνες	3.2	19.2

Ενδεικτικά, αναλύεται η σύσταση της σκόνης κακάο στον **Πίνακα 2**, όμως, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι αυτή μπορεί να ποικίλει αναλόγως του καβουρδίσματος, της επεξεργασίας με αλκάλια και της επεξεργασία πίεσης που θα ακολουθηθεί (*Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;*, 2021).

Πίνακας 2: Σύσταση σκόνης κακάο (Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;, 2021)

Συστατικά σκόνης κακάο	
Υγρασία %	3.0
Βούτυρο κακάο	11.0
pH (10% διαθέσιμο)	5.7
Τέφρα %	5.5
Υδατοδιαλυτή τέφρα %	2.2
Αλκαλικότητα διαλύματος τέφρας σε νερό με K ₂ O σε καθαρό κακάο %	0.8
Φωσφορικό (σε P ₂ O ₅) %	1.9
Χλώριο (σε NaCl) %	0.04
Τέφρα διαλυτή σε 50% HCl	0.08
Καρπός % (υπολογισμένος σε μη αλκαλιωμένη μύτη)	1.4
Ολικό άζωτο %	4.3
Άζωτο (διορθωμένο για αλκαλοϊδή) %	3.4
Άζωτο διορθωμένο για αλκαλοειδή x 6.25 %	21.2
Θειοβρωμίνη %	2.8

Επιπλέον, το βούτυρο κακάο έχει τις παρακάτω ποσότητες γλυκεριδίων:

Πίνακας 3: Ποσότητες γλυκεριδίων στο βούτυρο κακάο (Food-Info.Net : Ποια Είναι η (Φυσική Και Χημική) Σύσταση Των Κόκκων, Του Βουτύρου, Της Μάζας Και Της Σκόνης Του Κακάο;, 2021)

Τρικορεσμένα	2.5 έως 3.0
Τριακόρεστα (τριολεΐνη)	1.0
Διακόρεστα	
Στεαρο-διολεΐνη	6 έως 12
Παλμιτο-διολεΐνη	7 έως 8
Μονοακόρεστα	
Ολέο-διστεαρίνη	18 έως 22
Ολέο-παλμιτοστεαρίνη	52 έως 57
Ολέο-διπαλμιτίνη	4 έως 6

3.1.2 Διατροφική αξία

Το κακάο αποτελεί μία τροφή με πληθώρα θρεπτικών συστατικών. Όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα, 15g σκόνης κακάο δύνανται να περιέχουν ενέργεια, υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, βιταμίνες και διάφορα ιχνοστοιχεία όπως Φώσφορος και Μαγνήσιο (Παπαχρήστος Πάρης & Κόκκαλη Αναστασία, 2006).

Πίνακας 4: Θρεπτικά Συστατικά που περιέχονται σε σκόνη κακάο και 1 κουτ. Κακάο (Παπαχρήστος Πάρης & Κόκκαλη Αναστασία, 2006)

Θρεπτικά Συστατικά	Κακάο σκόνη	1 κουτ. κακάο
Θερμίδες kcal	312	47
Θερμίδες kj	1301	195
Πρωτεΐνες g	18,5	2,7
Λίπος g	21,7	3,2
Υδατάνθρακες g	11,5	1,7
Ασβέστιο mg	130	19,5
Σίδηρος mg	10,5	1,57
Μαγνήσιο mg	520	78
Φώσφορος mg	660	99
Κάλιο mg	1500	225
Νάτριο mg	950	142,5
Ψευδάργυρος mg	6,9	1,03

Θιαμίνη (Βιταμίνη B1) mg	0,16	0,02
Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B2) mg	0,06	0,01
Βιταμίνη B6 mg	0,07	0,01
Βιταμίνη E mg	0,68	0,10
Κορεσμένα λιπαρά οξέα g	12,8	1,92
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα g	7,2	1,08
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα g	0,6	0,09
Χοληστερίνη mg	0	0

3.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Το κακάο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, ιδίως σε κατεχίνες και προκυανιδίνες (βλ 3.3.3). Η περιεκτικότητα των προϊόντων κακάο σε πολυφαινόλες ποικίλλει. Για παράδειγμα, το ακατέργαστο κακάο περιέχει διαφορετικές πολυφαινόλες από τη σκόνη κακάο ή τη σοκολάτα που έχει υποστεί ζύμωση, ξήρανση ή καβούρδισμα. Το ακατέργαστο κακάο είναι πλούσιο σε μονομερή φλαβονόλης και προκυανιδίνες, ενώ διαθέτει μικρές ποσότητες κερκετίνης (φλαβονόλη), ισοβιτεξίνης (φλαβόνη), κλομπαμίδης και δεοξυγλομπαμίδης (φαινόλη) και ορισμένες ανθοκυανίνες, οι οποίες δίνουν στο ακατέργαστο κακάο το μωβ χρώμα του. Η μαύρη σοκολάτα έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε κατεχίνες. Πρόσφατες εκτιμήσεις για την πρόσληψη αντιοξειδωτικών από τη σοκολάτα δείχνουν ότι 41gr σοκολάτας γάλακτος περιέχουν την ίδια ποσότητα πολυφαινολών με ένα ποτήρι κόκκινο κρασί, ενώ ένα φλιτζάνι σοκολάτας περιέχει περίπου τα δύο τρίτα αυτής της ποσότητας. Επιπροσθέτως, η σοκολάτα εμπεριέχει τις τετραπλάσιες ποσότητες σε κατεχίνες απ' ό,τι το τσάι (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Ο παρακάτω πίνακας αναλύει τις ποσότητες αντιοξειδωτικών του κακάο και των δημοφιλέστερων υποπροϊόντων του:

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιοξειδωτικών του κακάο και των διασημότερων υποπροϊόντων τους
(Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004)

Source	Extraction solvent	Analysis method	Quantity
Cocoa powder	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	20 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	65±19 mg/g Total polyphenols ^a
Cocoa powder (non-alkalised)	70% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	Ca 58 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders (instant)	70% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	6.46±2.44 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	2.96–3.27 mg/g Catechin and epicatechin
Cocoa powder (non-alkalised)	75% Aqueous acetone	RP-HPLC (epicatechin standard)	Ca 3 mg/g Epicatechin
Cocoa powder (instant)	75% Aqueous acetone	RP-HPLC (epicatechin standard)	0.26±0.05 mg/g Epicatechin
Dark chocolate	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	8.4 mg/g Total polyphenols
Dark chocolates	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	36.5±5 mg/g Total polyphenols ^a
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	1.7±0.08 mg/g total procyanidins
Dark chocolate	70% Aqueous methanol	RP-HPLC (catechin standards)	0.5 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	0.48–1.37 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.8±0.08 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	n.a.	n.a.	2 mg/g Epicatechin
Milk chocolate	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	5 mg/g Total polyphenols
Milk chocolate	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	15±5.8 mg/g Total polyphenols ^a
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.7±0.17 mg/g Total procyanidins
Milk chocolate	70% Aqueous methanol	RP-HPLC (catechin standards)	0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	0.15–0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.2±0.05 mg/g Catechin and epicatechin

3.3 Ορισμός πολυφαινόλων

Πολυφαινόλες ονομάζονται όσες χημικές ενώσεις δομούνται στο σύνολό τους από φαινόλη, σχηματίζοντας τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου. Οι πολυφαινόλες αριθμούν πάνω από 500 και ανήκουν στην ομάδα των φωτοχημικών ενώσεων (Scalbert et al., 2005). Προέρχονται σε δευτερεύον βαθμό από τον μεταβολισμό των φυτών και συμμετέχουν στην άμυνά τους, π.χ. οι μικροβιακές προσβολές ή η υπερϊώδης ακτινοβολία. Σε ζωικές τροφές συναντάται μέσω της μεταφοράς από την τροφική αλυσίδα. Μερικές, μάλιστα, έχουν ρόλο προσέλκυσης των εντόμων κατά την επικονίαση λόγω του έντονου χρώματος (ανθοκυάνες) και της οσμής τους. Λόγω της ικανότητας τους να οξειδώνονται, όπως και στα φυτά, έτσι και στον άνθρωπο συναντώνται διάφορα οφέλη στη βιοχημική λειτουργία του οργανισμού. Κατά κόρων, εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις εξωτερικές επιφάνειες των φυτών, όπως πχ στο εξωκάρπιο και στην επιδερμίδα. Σε πολλές τροφές παρατηρούνται ως φυσικά συστατικά, είτε ως πολύπλοκα σύμπλοκα, ή μπορούν να **εκχυλίζονται**, ούτως ώστε, να προστίθενται σε άλλα τρόφιμα ή να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής (Aprotosoaie et al., 2016).

3.3.1 Χημική Διάταξη και Σύσταση πολυφαινόλων

Με τον όρο «πολυφαινόλες» να αποκαλούνται όλες οι ενώσεις που διαθέτουν υδροξύλια απ' ευθείας ενωμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες δομούνται είτε ως απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε ως υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, π.χ. οι ταννίνες. Βρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε διαθέτοντας μεθύλια, είτε ως γλυκοζίτες. Το τμήμα από υδατάνθρακες μπορεί να έχει είτε μονοσακχαρίτες, είτε δισακχαρίτες ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτες. Η γλυκόζη είναι η κυριότερη των σακχάρων, όπως επίσης η

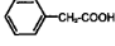
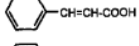
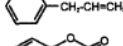
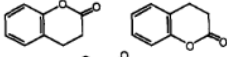
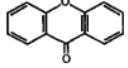
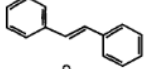
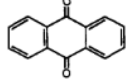
γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη, καθώς και το γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια (Aprotosoaie et al., 2016).

3.3.2 Ταξινόμηση των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κλάσεις (5-6 εάν συγκαταλεχθούν και οι επιπρόσθετες υποομάδες). Η κατάταξη αυτή γίνεται βάσει του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων που διαθέτουν και του τρόπου δέσμευσής τους από τα στοιχεία δόμησης της κάθε ένωσης (Aprotosoaie et al., 2016).

1. Πρώτη κλάση που διακρίνεται είναι τα **Φλαβονοειδή**. Είναι πολυπληθέστερη κατηγορία, καθώς χαρακτηρίζονται ως υπεύθυνες στην θρέψη των φυτών και στο γεγονός πως παρέχουν χρώσεις στα διάφορα φρούτα και λαχανικά όπου και εμφανίζονται. Κυριότερες είναι:
 - i. Φλαβόνες
 - ii. Φλαβονόλες (**κατεχίνες**, γαλλοκατεχίνες, καμφορόλες)
 - iii. Φλαβανόνες
 - iv. Ισοφλαβόνες
 - v. Ανθοκυανίνες
2. Δεύτερη σημαντικότερη κλάση είναι τα **Φαινολικά Οξέα**. Ειδικότερα, στα συγκεκριμένα, παρατηρούνται ενώσεις προστατευτικής λειτουργίας, όπως αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές. Κυριότερες ενώσεις είναι: τα α) Υδροξυβενζοϊκά και τα β) υδροξυκινναμικά οξέα. Δρουν αποτρεπτικά στη δράση των ελεύθερων ριζών (βλ. 4.1.1), ενώ παράλληλα, ελαττώνουν όσες ασθένειες εμφανίζονται κατά το γήρας.
3. Στιλβένια και Λιγνάνες είναι ουσίες δευτερεύουσας σημασίας που οι πρώτες εμφανίζονται στο σταφύλι και οι δεύτερες σε δημητριακά, λαχανικά και φρούτα που αποτελούν σπόρους αντίστοιχα, π.χ. φακές, φασόλια, λινάρι και σουσάμι (Aprotosoaie et al., 2016).

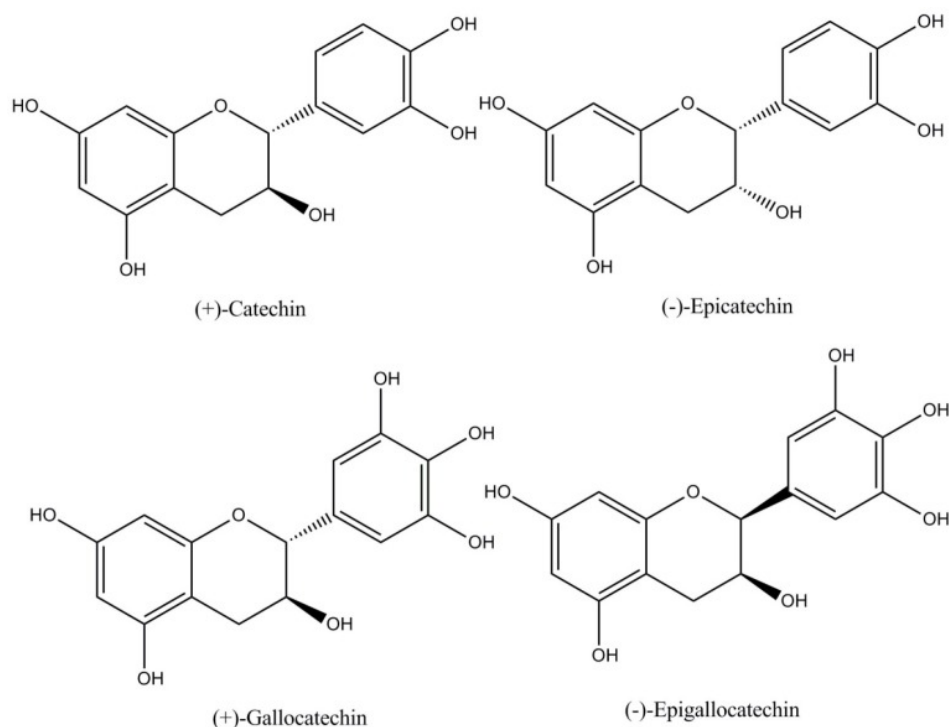
Πίνακας 6: Οι κύριες κλάσεις των Πολυφαινολών, (Bravo, 1998)

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C ₆	
Benzoquinones	C ₆ *	
Phenolic acids	C ₆ -C ₁	
Acetophenones	C ₆ -C ₂	
Phenylacetic acids	C ₆ -C ₂	
Hydroxycinnamic acids	C ₆ -C ₃	
Phenylpropenes	C ₆ -C ₃	
Coumarins, isocoumarins	C ₆ -C ₃	
Chromones	C ₆ -C ₃	
Naftoquinones	C ₆ -C ₄	
Xanthones	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Stilbenes	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Anthraquinones	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoids	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Lignans, neolignans	(C ₆ -C ₃) ₂	
Lignins	(C ₆ -C ₃) _n	

3.3.3 Οι πολυφαινόλες του κακάο

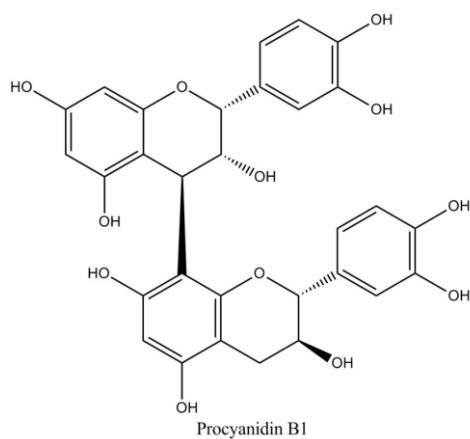
Από τις παραπάνω κατηγορίες που αναλύθηκαν οι σημαντικότερες πολυφαινόλες που εμπεριέχονται στο κακάο ανήκουν στα Φλαβονοειδή. Οι κυριότερες παρουσιάζονται και αναλύονται παρακάτω:

- **Φλαβονο-3-όλες ή κατεχίνες** (29%-38% των ολικών πολυφαινολών) ως μονομερείς και πολυμερείς μορφές. Οι μονομερείς αποτελούν τις (-)-επικατεχίνη, (+)-κατεχίνη, (+)-γαλλοκατεχίνη και (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Η (-)-επικατεχίνη συντελεί έως και στο 35% του συνόλου των πολυφαινολών, όντας η επικρατέστερη πολυφαινόλη τόσο στα προϊόντα που προέρχονται από το κακάο, όσο και σε προϊόντα που προέρχονται από την επεξεργασία του (σοκολάτα). Οι φλαβανόλες βρίσκονται συνήθως στο κακάο ως μορφές R (Aprotosoaie et al., 2016).

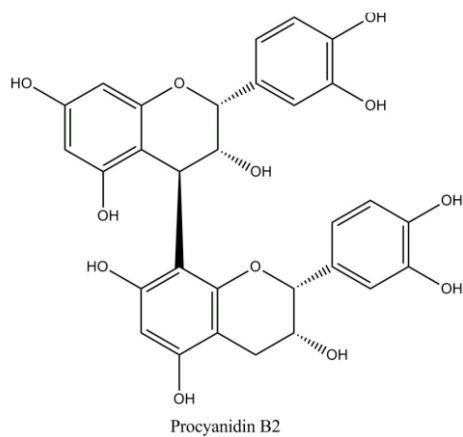


Εικόνα 9: Φλαβονόλες κακάο (Aprotosoie et al., 2016)

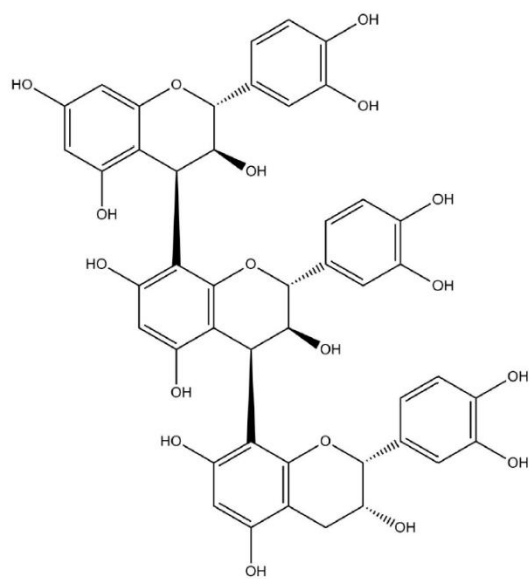
- Οι **προανθοκυανιδίνες** (58%-65% των συνολικών πολυφαινολών) είναι πολυμερή των μορίων επικατεχίνης και κατεχίνης που έλκονται με δεσμούς 4→8 και 4→6. Στο κακάο, εντοπίζονται κυρίως ολιγομερείς προανθοκυανιδίνες (βαθμός πολυμερισμού = 10) και κυριαρχούν τα διμερή σε εξαμερή. Οι σημαντικότερες προαθοκυανιδίνες κακάου είναι τα διμερή: B1 [επικατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη], B2 [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη] (Εικόνα 2), B3 [κατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη], B4 [κατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη], B5 [επικατεχίνη-(4→6)-επικατεχίνη], και τριμερή: C1 [επικατεχίνη-(4→8)₂-επικατεχίνη].
- **Ανθοκυάνες** (4% των ολικών πολυφαινολών), όπως: κυανιδίνη-3-L-αραβινοσίδη, κυανιδίνη-3-D-γαλακτοσίδη και λευκοανθοκυανίνες (L1, L2, L3, L4) (Aprotosoie et al., 2016).



Εικόνα 10: Προκυανιδίνη B1 (Aprotosoie et al., 2016)



Εικόνα 11: Προκυανιδίνη B2 (Aprotosoie et al., 2016)

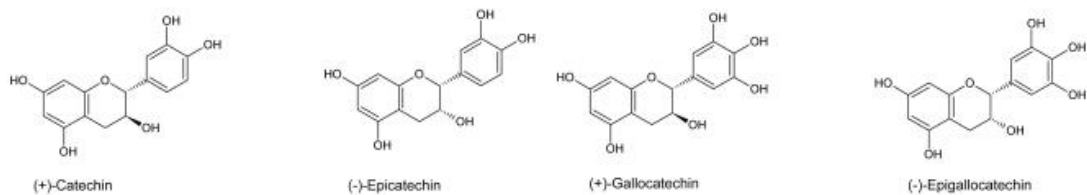


Procyanidin C1

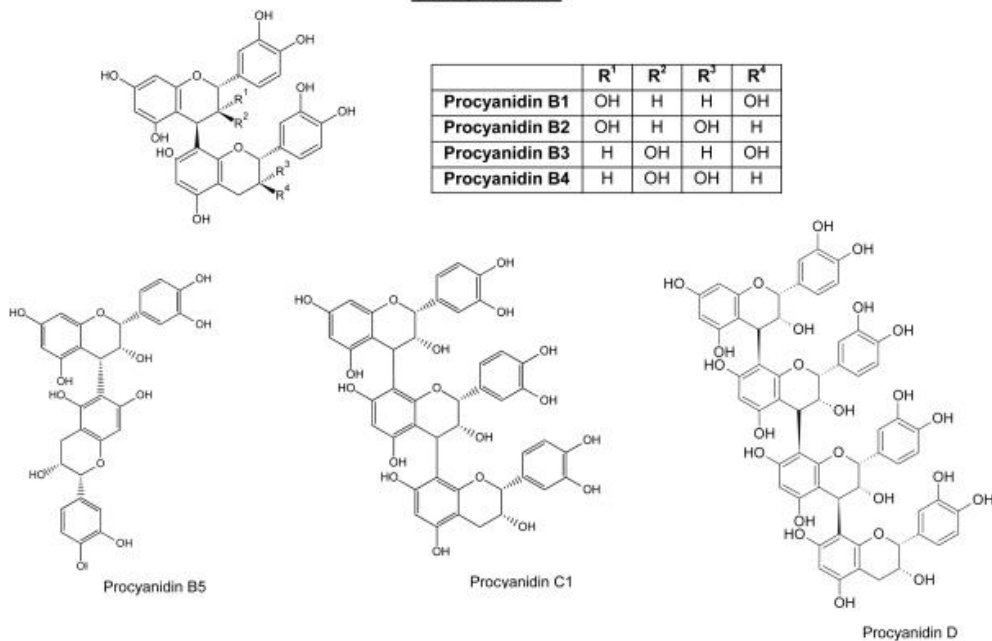
Εικόνα 12: Προκυανιδίνη C1 (Aprotosoie et al., 2016)

4. **Λοιπά πολυφαινολικά στοιχεία**, σε μικρότερες ποσότητες, κυρίως **Φλαβόνες** (απιγενίνη, κουερκετίνη, γλυκοσιδήτες), **Πολυφαινολικά Οξέα**, **Στιλβένια**, **καφεοϋλο-συζεύγματα**. (Aprotosoie et al., 2016).

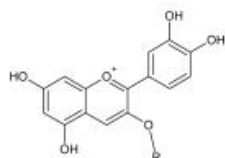
Catechins



Procyanidins

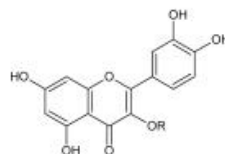


Anthocyanins



	R
Cyanidin-3- α -L-arabinosid	L-arabinose
Cyanidin-3- β -D-galactosid	D-galactose

Flavonol glycosides



	R
Quercetin-3-O- α -D-arabinosid	D-arabinosid
Quercetin-3-O- β -D-glucopuranosid	D-glucopuranosid

Others



Εικόνα 13: Όλες οι ομάδες και βασικότερες ενώσεις πολυφαινολών του κακάο (Aprotosoiaie et al., 2016)

3.4 Συγκέντρωση Ολικών Φαινολικών του Κακάο

Οι Ramos-Escudero et al., 2021 παρουσίασαν την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα από περουβιανούς εμπορικούς κόκκους κακάο. Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των διαφόρων ποικιλιών κόκκων κακάο

κυμαινόταν μεταξύ 19,85 και 33,39 mg GAE/g (GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος). Όταν εξετάστηκε ολόκληρο το σύνολο των δειγμάτων, η περιεκτικότητα σε φλαβανόλες και φλαβονοειδή κυμαινόταν από 9,99 έως 22,30 mg [ισοδύναμων κατεχίνης]/g και από 13.78 με 35.93 mg ισοδύναμων ρουτίνης/g, αντίστοιχα. Αναφέρεται ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες των κόκκων κακάο διαφορετικών ποικιλιών και γεωγραφικής προέλευσης (Κολομβία, Δομινικανή Δημοκρατία, Ισημερινός, Γκάνα και Βενεζουέλα) ποικίλει από 10.34 έως 37.66 mg/g. Ένα δείγμα από το Περού έδειξε φαινολική περιεκτικότητα 27.78 mg/g. Από αναφορά των ερευνητών σε διάφορες μελέτες φαίνεται να υπάρχουν υψηλότερες τιμές ολικών πολυφαινόλων για τις ποικιλίες Nacional, Trinitario και Forastero (140.53, 167.23 and 173.58 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος/g, αντίστοιχα), από υβριδικούς κλώνους όπως Forastero Άπω Αμαζονίου (105.18 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος/g from Ghana) και Trinitario- Forastero Άπω Αμαζονίου (129.37 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος/g από την Ινδονησία). Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε φλαβανόλες, εντοπίστηκε ότι για διαφορετικές ποικιλίες μεταξύ 19 και 130 mg ισοδύναμων επικατεχίνης/g σε ξηρό εκχύλισμα, αποδεικνύεται ότι η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή για τους κόκκους κακάο διαφορετικής προέλευσης κυμαινόταν από 3.50 έως 12.62 mg ισοδύναμων επικατεχίνης/g. Οι διαφορές στο περιεχόμενο μπορούν να εξηγηθούν από διάφορους παράγοντες, όπως:

- **οι ποικιλίες κακάο,**
- **η γεωγραφική θέση,**
- **τα διαφορετικά στάδια ωριμότητας,**
- **οι κατεργασίες μετά τη συγκομιδή,**
- **η ζύμωση και η ξήρανση,**
- **οι διαδικασίες εκχύλισης και οι αναλυτικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση.**

Η **συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα** των διαφόρων ποικιλιών βρέθηκε μεταξύ 103.38 και 372.11 mmol TE/g. Η αντιοξειδωτική δράση βρέθηκε 240–490 mmol TE/g μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού DPPH°. Η αντιοξειδωτική δράση που μετρήθηκε από τη δοκιμή DPPH° του εκχυλίσματος κλάσματος ποικιλιών κακάο διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών που παρουσίασε τιμές από 323.81 με 1370.12 μmol TE/g ξηρού βάρους. Τα υβρίδια ποικιλιών παρουσίασαν υψηλότερες τιμές. Η φαινολική περιεκτικότητα των ποικιλιών κακάο, οι οποίες σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα, συμπεριλαμβανομένου του λόγου TAC/POLY (Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα/ Πολυφαινόλη) αναλογίας είναι περί τα 4.73–11.83 (Ramos-Escudero et al., 2021).

Πίνακας 7: Περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα από εμπορικούς σπόρους κακάο. TAC, συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα- POLY, πολυφαινόλες (Ramos-Escudero et al., 2021)

	Polyphenols (mg GAE/g)	Flavanols (mg CE/g)	Flavonoids (mg RE/g)	TAC (mmol TE/g)	TAC/ POLY ratio
CHU	21.88 ± 0.49 ^e	14.05 ± 0.05 ^f	18.54 ± 0.24 ^e	156.01 ± 2.08 ^e	7.86
BLA	19.85 ± 0.12 ^f	9.99 ± 0.14 ^g	13.78 ± 0.24 ^f	103.38 ± 5.72 ^f	4.73
Hy1	28.46 ± 1.03 ^c	21.20 ± 0.02 ^d	28.78 ± 0.99 ^{bc}	244.24 ± 3.89 ^b	8.58
Hy2	33.39 ± 0.57 ^a	21.62 ± 0.02 ^b	35.93 ± 0.13 ^a	368.40 ± 1.03 ^a	11.03
Hy3	26.39 ± 0.49 ^d	22.30 ± 0.02 ^a	29.93 ± 0.15 ^b	249.42 ± 2.14 ^b	9.45
Hy4	31.46 ± 0.34 ^b	21.36 ± 0.13 ^{cd}	33.22 ± 1.11 ^a	372.11 ± 0.74 ^a	11.83
Hy5	22.21 ± 0.39 ^e	20.31 ± 0.02 ^e	24.82 ± 2.09 ^d	172.99 ± 2.69 ^d	7.79
Hy6	25.61 ± 0.20 ^d	21.44 ± 0.03 ^{bc}	26.68 ± 1.22 ^{cd}	198.26 ± 1.28 ^c	7.74

Τα κύρια πιο γνωστά βιοδραστικά συστατικά της σκόνης κακάο είναι η θεοβρωμίνη, η κατεχίνη και η επικατεχίνη (**Πίνακας 8**). Οι συγκεντρώσεις κατεχίνης στις ποικιλίες κακάο κυμαίνονταν από 3,90 έως 18,22 mg/g. Οι υβριδικές ποικιλίες έδειξαν υψηλότερη περιεκτικότητα (κατά μέσο όρο 13,90 mg/g) από άλλες ποικιλίες (κατά μέσο όρο 4,09 mg/g). Η επικατεχίνη ήταν η τρίτη πιο σημαντική ένωση που παρουσίασε μέσο όρο για όλες τις ποικιλίες κακάο 7,97 mg / g. Ενώ η ποικιλία Chuncho (CHU) περιείχε υψηλότερη επικατεχίνη (13,09 ± 1,26 mg / g) από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Η περιεκτικότητα σε κατεχίνη και επικατεχίνη σε δείγματα κακάο Criollo της Κολομβίας μετά από ζύμωση και ξήρανση κυμαινόταν από 0,03 έως 4,43 mg / g και 0,45-2,34 mg / g αντίστοιχα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα στους γονότυπους των ζυμωμένων κοτυληδόνων του κακάο για την κατεχίνη ήταν 0,42-6,02 mg / g και για την επικατεχίνη ήταν 6,16-51,57 mg / g. Η περιεκτικότητα σε επικατεχίνη ήταν υψηλότερη από αυτή της κατεχίνης. Σε παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα σε επικατεχίνη (μέσος όρος ~ 1,63 mg / g) ήταν υψηλότερη από την περιεκτικότητα σε κατεχίνη (μέσος όρος ~ 0,78 mg / g) σε σκόνη κακάο διαφορετικής προέλευσης. Η επικατεχίνη και η κατεχίνη μειώθηκαν καθώς προχωρούσε η ζύμωση (βλ. **3.5 Οι επιδράσεις διαφόρων χημικών μεταβολών στην συγκέντρωση των πολυφαινολών κατά την επεξεργασία του κακάο**). Επομένως, αυτές οι φλαβανόλες μειώθηκαν κατά ~93 και ~85% των αρχικών τιμών, αντίστοιχα, στο τέλος των 10 ημερών ζύμωσης.

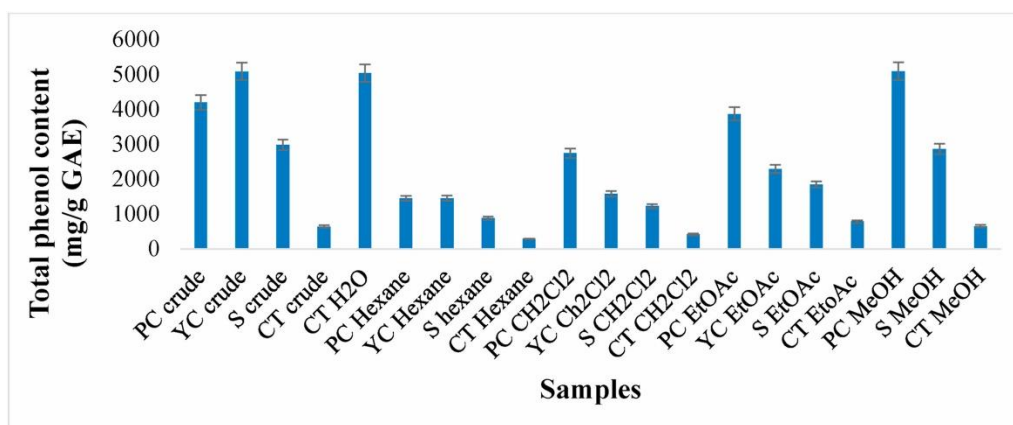
Από την άλλη, η παρουσία ενζύμου οξειδάσης πολυφαινόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καταλύει την ταχεία μείωση της περιεκτικότητας σε φλαβανόλες στους

κόκκους κακάο. Η αναλογία επικατεχίνης/κατεχίνη (epi/cat) βρέθηκε μεταξύ 0,38 και 3,06, ενώ ανέφεραν τιμές για δείγματα κόκκων κακάο μεταξύ 0,13 και 17,55. Η αναλογία epi/cat είναι ένας δείκτης επεξεργασίας των κόκκων κακάο. Το ψήσιμο επηρεάζει αυτή την αναλογία λόγω του επιμερισμού της επικατεχίνης. Μικρές ποσότητες τριών παραγώγων επικατεχίνης και καφεϊκού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Όταν τα δείγματα εξετάστηκαν μαζί, τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: παράγωγο I (κατά μέσο όρο 1,80 mg/g), παράγωγο II (κατά μέσο όρο 1,16 mg/g), παράγωγο III (κατά μέσο όρο 0,78 mg/g) και καφεϊκό οξύ (κατά μέσο όρο 0,05 mg/g). Οι ποικιλίες CHU και BLA παρουσίασαν χαμηλότερη περιεκτικότητα από εκείνη των υβριδικών ποικιλιών. Αυτά τα παράγωγα αντιστοιχούν σε ισομερή της αιθυλο-συνδεδεμένης επικατεχίνης καθώς και σε διάφορα ισομερή της επικατεχίνης-αιθυλο-προκυανιδίνης που έχουν αναγνωριστεί ως μεταβολίτες των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης φρούτων. Αυτά τα παράγωγα έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση του κακάο. Αναφέρθηκαν τιμές για παράγωγα επικατεχίνης από ίχνη έως 4,83 mg/g. Άλλες ενώσεις όπως τα διμερή προκυανιδίνης B1 και B2 ποσοτικοποιήθηκαν επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα μονομερή (κατεχίνη και επικατεχίνη) σε συμβατική σκόνη κακάο και εμπλουτισμένη σκόνη κακάο. (Ramos-Escudero et al., 2021).

Πίνακας 8: Βιοδραστικές ουσίες του κακάο σε διάφορες λατινοαμερικανικές ποικιλίες (Ramos-Escudero et al., 2021)

	BLA	CHU	Hy1	Hy2	Hy3	Hy4	Hy5	Hy6
Theobromine	9.79 ± 0.80 ^d	10.17 ± 0.42 ^{cd}	11.83 ± 0.33 ^b	11.34 ± 0.02 ^{bc}	11.99 ± 0.36 ^b	11.43 ± 0.09 ^{bc}	11.85 ± 0.54 ^b	12.95 ± 0.08 ^a
Catechin	4.28 ± 0.26 ^f	3.90 ± 0.59 ^f	12.81 ± 0.11 ^d	18.22 ± 0.01 ^a	13.76 ± 0.02 ^c	15.84 ± 0.13 ^b	8.72 ± 0.26 ^e	14.05 ± 0.07 ^c
Epicatechin	13.09 ± 1.26 ^a	6.53 ± 0.90 ^c	6.25 ± 0.11 ^c	7.00 ± 0.07 ^b	7.41 ± 0.06 ^b	6.15 ± 0.01 ^c	9.25 ± 0.08 ^b	8.06 ± 0.16 ^b
Derivative I	0.65 ± 0.06 ^e	0.80 ± 0.12 ^f	2.11 ± 0.05 ^{cd}	2.62 ± 0.03 ^a	2.06 ± 0.06 ^d	2.45 ± 0.01 ^b	1.47 ± 0.01 ^e	2.27 ± 0.04 ^{bc}
Derivative II	0.31 ± 0.05 ^e	0.40 ± 0.07 ^e	1.35 ± 0.05 ^c	1.60 ± 0.01 ^{ab}	1.29 ± 0.09 ^c	1.73 ± 0.02 ^a	1.07 ± 0.00 ^d	1.55 ± 0.03 ^b
Derivative III	0.23 ± 0.01 ^e	0.29 ± 0.05 ^f	1.02 ± 0.03 ^{bc}	1.14 ± 0.01 ^a	0.87 ± 0.04 ^d	1.07 ± 0.01 ^{ab}	0.61 ± 0.01 ^e	1.00 ± 0.02 ^c
Caffeic acid	0.08 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.00 ^d	0.07 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.00 ^b	0.06 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^d	0.06 ± 0.00 ^b

Οι Indrianingsih et al., 2021 περιέγραψαν τη διαφορά της περιεκτικότητας των ολικών φαινολικών σε δυο ασιατικές ποικιλίες (μωβ και κίτρινη) συγκρινόμενων με αυτόχθονα φυτά. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα φλοιού καρπού του *T. cacao* και των δύο ποικιλιών (κίτρινο και μωβ) είχαν καλή αντιοξειδωτική δράση και αντιδιαβητική δράση με IC50 από 41,3 και 44,5 μg/mL για τη δοκιμασία DPPH και 41,6 και 27,7 μg/mL για την ανασταλτική δοκιμασία α-γλυκοσιδάσης, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ως χιλιοστόγραμμα ισοδύναμου γαλλικού οξέος (GAE) ανά γραμμάριο ξηρού εκχυλίσματος (Διάγραμμα 1). Οι μέσες τιμές της ολικής φαινολικής περιεκτικότητας κυμαίνονταν από 282,2 έως 5087,8 mg/g GAE (ισοδύναμο γαλλικού οξέος). Μεταξύ των εκχυλίσμάτων, η υψηλότερη φαινολική περιεκτικότητα παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα του διαλυτού κλάσματος μεθανόλης μωβ ποικιλίας *T. cacao* με 5087,8 mg/g, ακολουθούμενο από το ακατέργαστο εκχύλισμα μεθανόλης κίτρινης ποικιλίας *T. cacao*.



Διάγραμμα 1: Συνολική φαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων του *T. cacao* (PC για μωβ παραλλαγή· YC για κίτρινη παραλλαγή) (Indrianingsih et al., 2021)

Οι Bubonja-Sonje et al., 2011, εκχύλισαν φαινολικά στοιχεία κακάο και αυτά υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφική ανάλυση υψηλής απόδοσης για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων αναλύθηκε εις τριπλούν με την τροποποιημένη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η επικατεχίνη ήταν κυρίαρχη ένωση στην σκόνη του κακάο (1,2 mg/g ξηρού εκχυλίσματος) ακολουθούμενη από τα παράγωγα καφεϊκού οξέος (0475 mg/g), (–)-επιγαλλοκατεχίνη (0,42 mg/g), (–)-γαλλοκατεχίνη (0,19 mg/g) και (+)-κατεχίνη (0,10 mg/g). Το ξηρό εκχύλισμα κακάο σε σκόνη περιείχε 0,249 mg/g προκυανιδίνης B1 και 0068 mg/g προκυανιδίνης B2 (Bubonja-Sonje et al., 2011).

Πίνακας 9: Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζονται με τη μέθοδο DPPH σε διαφορετικά δείγματα (Bubonja-Sonje et al., 2011)

Εκχύλισμα πολυφαινόλης ^a	Ολική περιεκτικότητα σε φαινόλες (mg/g)	Αντιοξειδωτική δράση ^b		
		RSA ^a (%)	TE ^a (μmol/g)	EC ₅₀ ^a (mg/ml)
OOPE	0.279	69.66	0.27 ± 0.08	0.0331 ± 0.0008
CPE	32.48	78.34	0.30 ± 0.10	0.0318 ± 0.0008
V40	450	81.60	0.31 ± 0.05	0.0282 ± 0.0030

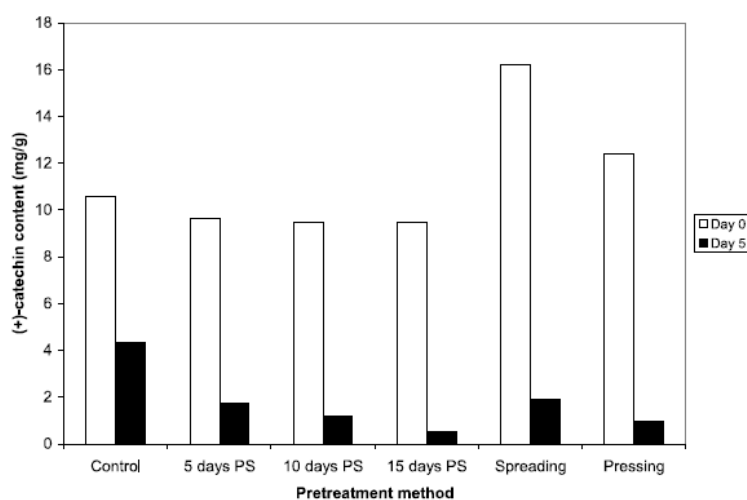
Συντομογραφίες: CPE = εκχύλισμα κακάο με πολυφαινόλες, EC₅₀ = συγκέντρωση φαινολικού στο μείγμα αντίδρασης που προκαλεί μείωση κατά 50% της αρχικής συγκέντρωσης 2,2'-διφαινυλο-1-πικρυλνυδραζυλίου (DPPH); OOPE = εκχύλισμα πολυφαινόλης ελαιολάδου; RSA = Δραστηριότητα ριζικής απομάκρυνσης; TE = Ισοδύναμο Trolox; V40 = Εκχύλισμα δεντρολίβανου.

3.5 Οι επιδράσεις διαφόρων χημικών μεταβολών στην συγκέντρωση των πολυφαινολών κατά την επεξεργασία του κακάο

Οι πολυφαινόλες κακάο δύνανται να συνεισφέρουν έως και 12-18% της ξηρής μάζας ολόκληρου του κόκκου. Οι κατηγορίες πολυφαινολών που κυρίως επηρεάζονται κατά την πρωταρχική επεξεργασία ανήκουν στις πρωτεύοντες του είδους, δηλαδή τις κατεχίνες, προκυανιδίνες και ανθοκυάνες. Η ζύμωση και η ξήρανση είναι στάδια κατά τα οποία η συγκέντρωση των πολυφαινολών μεταβάλλεται σημαντικά εξαιτίας της

πρόκλησης ενζυματικών αντιδράσεων που επιφέρουν μαύρισμα στο προϊόν. Οι επιπτώσεις αυτές φαίνονται στο **Διάγραμμα 2**. Ωστόσο, κάποιες προπαρασκευαστικές παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψιν καθώς θα επηρέαζε την έκταση των ενζυματικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Ching lik Hii et al., 2009).

Οι επιπτώσεις των διαδικασιών προπαρασκευής στο σύνολο της περιεκτικότητας των πολυφαινόλων του κακάο έχουν αναφερθεί και αναλυθεί από διάφορους ερευνητές. Για παράδειγμα, ο Bravo, 1998 αναφέρει ότι η *in vitro* ζύμωση του φλαβονοειδούς της κερσετίνης για 72 ώρες απέδωσε μειωμένη παραγωγή προπιονικού και βουτυρικού άλατος, αλλά υψηλή παραγωγή οξικού οξέος. Αυτό υποδηλώνει ότι, η κουερσετίνη ζυμώνεται από βακτηριακή μικροχλωρίδα με το άνοιγμα του αρωματικού δακτυλίου, γεγονός που θα εξηγούσε την υψηλή παραγωγή οξικού οξέος που προέρχεται από την πλήρη υδρόλυση του φλαβονοειδούς και την απουσία άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Short-Chain Fatty Acids, abn: SCFA) που παράγονται συνήθως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των υδατανθράκων. Ομοίως, παρατηρήθηκε ότι η *in vitro* ζύμωση της κατεχίνης φλαβονοειδών και του ταννικού οξέος (με το γαλλικό οξύ ως συστατικό μονομερής φαινόλης) χαρακτηρίστηκε επίσης, από υψηλή σχετική παραγωγή οξικού οξέος μετά από 72 ώρες ζύμωσης, αλλά όχι μετά από 24 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι, η προτεινόμενη υδρόλυση του αρωματικού δακτυλίου χρειάζεται μεγάλο χρόνο ζύμωσης (Bravo, 1998). Η μέθοδος αποθήκευσης των βολβών προκαλούσε μείωση στον όγκο του πολτού κακάο, που προφανώς οφείλεται στην οξείδωση και πολυμερισμό των πολυφαινόλων (-)επικατεχίνης και των προϊόντων οξείδωσής της. Διαφορά παρατηρήθηκε και στο σύνολο (-)επικατεχίνης και (+)-κατεχίνης μεταξύ συμπιεσμένων και εξαλειμμένων κόκκων. (Ching lik Hii et al., 2009).



(Day 0 = zero day pod storage and Day 5 = five days pod storage)

Διάγραμμα 2: Επιπτώσεις στην περιεκτικότητα του κακάο σε (+)-κατεχίνες μετά από τις διαδικασίες προπαρασκευής του (Ching lik Hii et al., 2009)

3.5.1 Αλλαγές κατά το στάδιο της ζύμωσης

Στο στάδιο της ζύμωσης οι κόκκοι υφίστανται το χημικό φαινόμενο της **οξειδωσης**, η οποία οφείλεται είτε σε δράση ενζύμων, και δει της **πολυφαινολικής οξειδάσης**, είτε στη δράση άλλων ενδογενών ή μη παραγόντων. Παρατηρήθηκε πως απ' την πάροδο της πρώτης έως της δεύτερης μέρας της ζύμωσης παρέμειναν μόνο το 50 και 6% της ενζυματικής δραστηριότητας αντιστοίχως. Επιβεβαιωμένες έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι πολυφαινόλες διαχέονται στην εφίδρωση που εμφανίζεται κατά τη ζύμωση (Ching lik Hii et al., 2009). Στον παρακάτω πίνακα αναλύονται οι πιθανές αλλαγές στην περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης:

Πίνακας 10: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε μετά από τη διαδικασία της ζύμωσης (Ching lik Hii et al., 2009)

Στάδιο παρασκευής	Ευρήματα
Ζύμωση	1. Τα επίπεδα (-)-επικατεχίνης και (+)-κατεχίνης επηρεάστηκαν κατά την προπαρασκευή
	2. Η μέθοδος αποθήκευσης των βολβών μέχρι 15 μέρες είχε σημαντικότερη επίπτωση στη μείωση των ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου εν αντιθέσει με άλλα στάδια (π.χ. συμπίεση ή εξόλειψη των κόκκων)
	3. Επιπτώσεις από την αποθήκευση των βολβών δεν είχε επιρροή στις (+)-κατεχίνες
	4. Βέλτιστη συνθήκη προετοιμασίας είναι ένα δεκαπενθήμερο
	5. Η διαφυγή των πολυφαινολών κατά τη ζύμωση μέσω των φακιδίων των κόκκων ανέρχεται στο 24% μετά από 60 ώρες και στο 58% μετά από 8 μέρες

3.5.2 Αλλαγές κατά το στάδιο της ξήρανσης

Η παραπάνω οξειδωτική διαδικασία που υφίστανται οι πολυφαινόλες κατά τη ζύμωση συνεχίζεται και κατά την ξήρανση των κόκκων. Η εξάτμιση των υδρατμών είναι μια σταθερή πηγή αέριου οξυγόνου στο εσωτερικό της κοτυληδόνας. Η οξείδωση αυτή πραγματοποιείται ούτως ώστε να συμπυκνώσει τις ταννίνες, οι οποίες έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και είναι αδιάλυτες. Το τυπικό τελικό καφέ χρώμα που μορφοποιείται κατά την ξήρανση οφείλεται στην παραγόμενη μελανίνη. Έρευνες έδειξαν ότι το pH=6 στους 35,5°C είναι το απαιτούμενο στη δράση του ενζύμου πολυφαινολοξειδάσης, ενώ,

σε άλλες παρατηρήσεις, οι κινητές μορφές των αντιδράσεων τόσο της οξείδωσης όσο και αυτών της συμύκνωσης εναρμονίζονται σε μια υποτιθέμενη «πρώτης τάξεως» αντίδραση. Άλλες μελέτες διεξήγαγαν σύγκριση μεταξύ των συμβατικών τρόπων ξήρανσης και της μεθόδου «freeze drying» στο κακάο. Η δεύτερη έδειξε μεγαλύτερη τελική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ακολουθούμενη από την εφαρμογή καυτού αέρα και παραδοσιακής ξήρανσης μέσω ηλίου. Οι παραπάνω αλλαγές φαίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα 11** (Ching lik Hii et al., 2009).

Στο εμπόριο, το κακάο με πολύ υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών είναι συνήθως ανεπιθύμητο διότι, αυξάνει την πικρότητα και την καυστικότητα στην γεύση του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, υπάρχουν αγορές που διαθέτουν εμπορεύσιμη σοκολάτα και υποπροϊόντα της πλούσια σε πολυφαινόλες για τους πιο απαιτητικούς καταναλωτές (Ching lik Hii et al., 2009).

Πίνακας 11: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε μετά από διαδικασία ξήρανσής του (Ching lik Hii et al., 2009)

Στάδιο παρασκευής	Πορίσματα
Ξήρανση	1. Η πολυφαινολική οξειδάση απενεργοποιούταν μετά από ένα 24ωρο στους 65 °C, ενώ στους 55°C η απώλεια στην ενέργεια του ενζύμου ήταν της τάξεως του 80% στο πρώτο 24ωρο και άνω του 95% σε 48 ώρες.
	2. Το ένζυμο δρα αποτελεσματικά σε pH=6 στους 35,5°C.
	3. Με το πέρας του σταδίου της ξήρανσης τα φαινολικά συστατικά μειώθηκαν στο 32% σε σύγκριση με το στάδιο της ζύμωσης.
	4. Σε συνθήκες αέρα: θερμοκρασία θ=40-60 °C και σχετική υγρασία RH=50-80% η μείωση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών ήταν ταχεία.
	5. Όσο μεγαλύτερες οι τιμές της θερμοκρασίας και υγρασίας τόσο λιγότερες οι εναπομείναντες πολυφαινόλες, περιεχόμενες στους κόκκους.
	6. Η ξήρανση μέσω ψύξης (freeze drying) συγκράτησε περισσότερες πολυφαινόλες στο τελικό προϊόν, συγκριτικά με τις σύνηθες μεθόδους ξήρανσης.

	7. Δείγματα όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος της ξήρανσης μέσω ηλίου είχαν τη μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, λόγω της έκθεσης σε χαμηλότερη θερμοκρασία και της μεγάλης διάρκειας.
--	---

3.5.3 Αλλαγές κατά τα δευτερεύοντα στάδια επεξεργασίας

Ημιτελή προϊόντα, όπως λικέρ κακάο, κέικ κακάο, βούτυρο κακάο και σκόνη κακάο, παρασκευάζονται κατά τη δευτερεύουσα επεξεργασία. Οι επιδράσεις των διαφόρων λειτουργιών της μονάδας στις πολυφαινόλες δεν είναι πλήρως κατανοητές, ιδιαίτερα για όσες λειτουργίες συμπεριλαμβάνουν θέρμανση. Τέτοιες επιδράσεις, μπορεί να είναι υπέρυθρη μικροκονιοποίηση, αλκάλωση, καβούρδισα, άλεση, πίεση βουτύρου και κονιορτοποίηση (Ching lik Hii et al., 2009). Μελέτες έχουν αναφερθεί στην επίδραση της αλκαλοποίησης και του καβουρδίσματος στις πολυφαινόλες στους κόκκους κακάο, όπως φαίνεται στον αντίστοιχο πίνακα. Έχει αποδειχθεί η επίδραση της αλλαγής του pH με την προσθήκη αλκαλίου στην ολική περιεκτικότητα των πολυφαινολών της παραγόμενης σκόνης κακάο. (Miller et al., 2006). Άλλα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ιδιότητα από δείγματα σκόνης κακάο φυσικής προέλευσης (pH=5,39-5,76) έναντι βαριά κατεργασμένων (από αλκάλωση) δειγμάτων (pH=7,69-8,06). Τα δεδομένα παρουσίασαν μια γραμμική συσχέτιση του pH με τη σύσταση σε πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική ικανότητα (Ching lik Hii et al., 2009). Αλλοίωση των πολυφαινολών έδειξαν μελέτες από τους Andres-Lacueva et al., 2008 που παρατήρησαν τις απώλειες σε φλαβονοειδή. Ο συγγραφέας απέδωσε τη μείωση αυτή στην οξείδωση που υφίσταται κατά το στάδιο αυτό συναρτήσει του pH, που καταλήγει στην δημιουργία καφέ χρωματισμών η οποίοι πολυμερίζονται σε διάφορους βαθμούς. Υπαινίχθηκε ότι δευτερεύουσες αντιδράσεις, που συμπεριλαμβάνουν ο-κινόνες σχηματιζόμενες κατά τη ζύμωση, πιθανόν, να συμμετέχουν σε περεταίρω αντιδράσεις κατά την αλκάλωση (Andres-Lacueva et al., 2008).

Γενικά, μελέτες πάνω στο καβούρδισμα έδειξαν μείωση των πολυφαινολών με έμφαση στις αυξημένες θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία αυτή. Η μείωση μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη οξειδοαναγωγική δραστηριότητα σε περιβάλλον αυξημένης παρουσίας οξυγόνου. Καμία, όμως, λεπτομέρεια δεν δόθηκε για τον ακριβή μηχανισμό της αντίδρασης (Ching lik Hii et al., 2009). Οι Kealy et al. κατέληξαν ότι **η θερμοκρασία είναι κρίσιμος παράγοντας διατήρησης της σύστασης πολυφαινολών**, κυριότερα για τα υψηλότερα ολιγομερή. (Kirk S. Kealy et al., 1997)

Στον **Πίνακα 12** εμφανίζεται η επίδραση της αλκάλωσης και του καβουρδίσματος στην τελική σύσταση των πολυφαινολών του κακάο:

Πίνακας 12: Επιπτώσεις στην σύσταση του κακάο σε πολυφαινόλες ύστερα από τις διαδικασίες της αλκάλωσης και του καβούρδισματος. (Ching lik Hii et al., 2009)

Στάδιο παρασκευής	Πορίσματα
Αλκάλωση	▪ Η ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και αντιοξειδωτική ιδιότητα μειώθηκαν με αυξημένες τιμές του pH.
	▪ Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικά φλαβονοειδή (22,86-40,25 mg/g) σε δείγματα σκόνης κακάο φυσικής προέλευσης έναντι ελαφρώς (8,76-24,65 mg/g) και βαριά (1,33-6,05 mg/g) κατεργασμένων (από αλκάλωση) δειγμάτων σκόνης
	▪ Αποδόθηκε 60% μείωση στην ολική σύσταση των φλαβονοειδών
	▪ Μεταξύ των φλαβονόλων μεγαλύτερη μείωση είχε η (-)-επικατεχίνη (67%) έναντι της (+)-κατεχίνης (38%)
	▪ Όσο αφορά τις φλαβονόλες μεγαλύτερη μείωση είχε η κουερκετίνη (86%) συγκριτικά με τις κουρκετίνης-3-γλουκουρονιδίνης (58%), κουρκετίνης-3-αραβοσιδίνης (62%) και ισοκουερκιτρίνης (16%)
Καβούρδισμα	▪ Αξιόλογη μείωση ($p < 0,05$) από 157 mg ταννικού οξέος/g (πριν το καβούρδισμα) σε 131 mg ταννικού οξέος/g (μετά το καβούρδισμα) ▪ Παρατεταμένη διάρκεια της διαδικασίας ή/και υψηλές θερμοκρασίες επεξεργασίας ελαττώνουν τη συγκέντρωση πολυφαινολών του κακάο ▪ Όσο η θερμοκρασία αυξανόταν από τους 127°C στους 181°C το απόθεμα πολυφαινολών μειωνόταν από 24618 σε 12786 μg/g. Τα πενταμερή προκυανιδίων από 1953 έπεσαν στα 425 μg/g

3.6 Αναφορά σε άλλες πηγές πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες, εφόσον αποτελούν καθοριστικής σημασίας για την άμυνα του οργανισμού, βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό σε όλα τα τρόφιμα που προέρχονται από το φυτικό βασίλειο και για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να προσλαμβάνονται σε ικανοποιητικές ποσότητες. Συνεπακόλουθα, θα πρέπει ένας μέσος ενήλικας να καταναλώνει τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως όσπρια, λαχανικά, φρούτα, , το μέλι, το κρασί, οι ξηροί καρποί, ελαιόλαδο, τσάι, ο καφές όπως επίσης και το **κακάο**, τροφές-ευεργέτες της φυσιολογίας του οργανισμού. Με τον τρόπο αυτό, ο συνδυασμός διαφόρων τροφίμων στις διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου, συνεπάγεται με την λήψη όλων των ικανών για απορρόφηση από τον οργανισμό πολυφαινολών. Αυτό είναι σημαντικό τόσο από άποψης ικανοποιητικού μεταβολισμού (όλες οι πολυφαινόλες δεν μεταβολίζονται το ίδιο) όσο και από μεριάς ανοσοποίησης (η κάθε πολυφαινόλη δεν δρα με τον ίδιο τρόπο).

Εξηγήθηκε ότι το κακάο φέρει σημαντικές ποσότητες πολυφαινολών, παρ' όλα αυτά υπάρχουν και άλλες εξίσου αξιόλογες πηγές που αναφέρονται, ενδεικτικά, παρακάτω:

- **Μέλι:** Σε αντίθεση με άλλα φυτικά προϊόντα, το μέλι, εμπεριέχει διάφορους τύπους φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών ανάλογα της προέλευσης (λ.χ. θυμαρίσιο, λεβάντας, πεύκου, ευκάλυπτου, ακακίας κ.τ.λ.). Βρέθηκε ότι το μέλι στην Ελλάδα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα όπως προτοκατεχουικό οξύ (από πεύκη και ελάτη) και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (θυμάρι). Το μέλι είναι μια φυσική πηγή φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και παραγώγων τους, ενώ η φαινολική περιεκτικότητα του μελιού πιστεύεται ότι καθορίζει τις βιοδραστικές του ιδιότητες, ιδιαίτερα το αντιοξειδωτικό δυναμικό του. Επιπλέον, η ακαετίνη, το καφεϊκό οξύ, η κουερσετίνη, η γαλαγγίνη και η καμπερόλη, καθώς και άλλες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι, έχει αναφερθεί το ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση τους ως φαρμακευτικά προϊόντα στη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων. Στην πραγματικότητα, αναμειγνύμενες ποικιλίες δειγμάτων μελιού από διάφορες χώρες περιέχουν απιγενίνη (0,03 mg / 100 g), ισοραμεντίνη (0,06 mg / 100 g), καμπερόλη (0,06 mg / 100 g), λουτεολίνη (0,28 mg / 100 g), κουερσετίνη (0,31 mg / 100 g) και μυρικετίνη (0,36 mg / 100 g). Φαίνεται επομένως σκόπιμο να γίνεται χημική ανάλυση στο μέλι καθώς τα διαφορετικά φαινολικά συστατικά μας δείχνουν την προέλευση και τις βιοδραστικές και θρεπτικές ιδιότητές του (Olas, 2020).
- **Καφές και Τσάι:** Όμοια με το κακάο, και τα δύο ροφήματα είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, όπως οι κατεχίνες, με παρόμοια βιοδραστικότητα στον οργανισμό (εναντίον του Parkinson, καρδιαγγειακών παθήσεων κ.λπ.), ενώ νέα έρευνα έχει αποδείξει ότι η κατανάλωσή τους βοηθούν στην αντιμετώπιση της Covid-19. Ειδικότερα, στον καφέ η περιεκτικότητα πολυφαινολών είναι εξαρτωμένη του τρόπου επεξεργασίας και κυρίως του καβουρδίσματος. Οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στο τσάι ονομάζονται κατεχίνες, η περιεκτικότητα των οποίων στην ξηρή ουσία του παρασκευασμένου πράσινου τσαγιού είναι 30-42%. Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται από έναν

υποκαταστάτη δι- ή τρι-υδροξυλίου στον δακτύλιο B και έναν μετα-5,7-διυδροξυ υποκαταστάτη στον δακτύλιο A. Οι πιο σημαντικές πολυφαινόλες τσαγιού ταξινομούνται στους 4 τύπους: γαλλική επιγαλλοκατεχίνη-3, γαλλική επικατεχίνη-3, επιγαλλοκατεχίνη και επικατεχίνη (Liczbiński & Bukowska, 2022). Επιπροσθέτως, μελέτη έδειξε ότι η συνολική φαινολική περιεκτικότητα στο μαύρο τσάι ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη στον καφέ, η οποία βρέθηκε να είναι 104,3 και 187,50mg[GAE]/g στον ωμό καφέ και το μαύρο τσάι, αντίστοιχα. Ομοίως, ο καφές που καταναλώθηκε περιείχε μικρότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες (97,87mg[GAE]/g) από εκείνη του μαύρου τσαγιού (152,87mg[GAE]/g). Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες του καβουρδισμένου καφέ βρέθηκε να είναι 37,82mg/g. Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες του ακατέργαστου και του χρησιμοποιημένου μαύρου τσαγιού ήταν σημαντικά ίση και βρέθηκε περί τα 40,35 και 42,52 mg/g στο ακατέργαστο και στο χρησιμοποιημένο μαύρο τσάι, αντίστοιχα (Abdeltaif et al., 2018).

- **Ελαιόλαδο:** Ένα από τα πιο διαδεδομένα τρόφιμα στην ελληνική και, κατ' επέκταση, μεσογειακή διατροφή, περιέχει πολλά αντιοξειδωτικά με σημαντικότερη κατηγορία τις πολυφαινόλες. Στο ελαιόλαδο, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κυμαίνεται από 50 έως 1000 mg/kg. Στην πραγματικότητα, εξαρτάται από τους αγρονομικούς παράγοντες, την ωριμότητα των ελιών, καθώς και από την τεχνολογία εκχύλισης, μαζί με τις διαδικασίες αποθήκευσης ή συσκευασίας. Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου ανήκουν οι κατηγορίες των φαινολικών οξέων ή αλκοόλων, των παράγωγων ελαιοευρωπαΐνης, των λιγνάνων και των φλαβονοειδών. Η σάρκα των υγιών ελιών περιέχει περίπου 2-3% φαινολικές ουσίες με τη μορφή γλυκοζιτών και εστέρων. Το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει περίπου 500 mg/L πολυφαινόλες. (Gorzynik-Debicka et al., 2018)
- **Οίνος και άμπελος:** Το κύριο φαινολικό συστατικό είναι η ρεσβερατρόλη. Η ουσία αυτή συναντάται σε σημαντικές ποσότητες στο εξωκάρπιο και ενδοσπέρμιο της ράγας του σταφυλιού και δύνανται να μεταφερθεί μετά το πέρας της οινοποίησης στον οίνο. Η ρεσβερατρόλη είναι χημική ουσία υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης, σε σύγκριση με άλλες πολυφαινόλες, η οποία έχει αποδειχτεί ότι υποβοηθά σε καρδιοαγγειακές και νευρολογικές παθήσεις, καθώς επίσης αντιγηραντικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. (Νταλέ Κατερίνα, 2023). Παράλληλα, στην ράγα της αμπέλου περιέχονται σημαντικές ποσότητες ανθοκυάνων και φλαβονοειδών, ουσιών που υφίστανται αλλαγές κατά τη μετέπειτα αλκοολική ζύμωση, κατά την οινοποίηση. Η μέση περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες είναι 216 mg/100 ml για τον κόκκινο οίνο και 32 mg/100 ml για τον λευκό οίνο. Η περιεκτικότητα σε φαινόλες στον ροζέ οίνο (82 mg/100 ml) είναι ενδιάμεση μεταξύ της περιεκτικότητας σε ερυθρούς και λευκούς οίνους (Cheynier et al., 2006; Fulcrand et al., 2006).
- **Ξηροί καρποί:** Όλοι οι ξηροί καρποί προσφέρουν πολυφαινόλες στον καταναλωτή, είτε ψημένοι, είτε όχι. Αναλυτικά:

- ❖ Πεκάν, μαζί με τα φουντούκια, έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες. Η συγκέντρωση φαινολικών σε ολόκληρους καρπούς πεκάν είναι ~1908,03 mg/100 g καρπού (ή ~9719,96 mg/100 g μη λιπαρού αλεύρου πεκάν), ενώ η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες στα φαινολικά εκχυλίσματα πεκάν κυμαίνεται στα ~378-455 mg/g εκχυλίσματος. Κυριότερες πολυφαινόλες είναι συμπυκνωμένες ταννίνες και παράγωγα ελλαγικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων των ελλαγιταννινών (Delgadillo-Puga et al., 2023).
- ❖ Στα φουντούκια η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κυμαίνεται από 291 mg/100 g έως 875 mg/100g (Pycia et al., 2019). Μεταξύ των πολυφαινολών που υπάρχουν στα φουντούκια υπάρχουν φαινολικά οξέα, φλαβανόλες, φλαβον-3-όλες, συμπυκνωμένες ταννίνες (προκυανιδίνες) και υδρολύσιμες ταννίνες .
- ❖ Έρευνες έχουν αποδείξει τον υψηλό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα στα καρύδια. Η μέση περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες είναι περίπου 1591,5 mg/100 g, με κύριες ομάδες τις ελλαγιταννίνες, ακολουθούμενες από τα φαινολικά οξέα, τις φλαβανόλες και τις διυδροχαλκόνες. Η μέση περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέως ή GAE) στο κέλυφος των πράσινων καρυδιών και ήταν περίπου 74,08 mg GAE/g, ανάλογα την ποικιλία (Pycia et al., 2019, 2020).

Πίνακας 13: Περιεκτικότητα (mg/100g) πολυφαινολών σε διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης (Συρίμπεη, 2006)

Τρόφιμο/ ποτό	Ολικές πολυφαινόλες	Τρόφιμο/ ποτό	Ολικές πολυφαινόλες
<i>Δημητριακά (mg/ 100g dm)</i>		<i>Φρούτα (mg/ 100g fm)</i>	
Βρώμη	8,7	Μήλο	27-298
Καλαμπόκι	30,9	Σταφύλι	50-490
Ρύζι	8,6	Πορτοκάλι	50-100
Σιτάρι	22-40	Βατόμουρο	37-429
<i>Οσπρια (mg/ 100g dm)</i>		Φράουλα	38-218
Ρεβύθια	78-230	Κεράσι	60-90
Αρακάς	440-800	Μαύρη σταφίδα	140-1200
μπιζέλια	380-1710	Κόκκινη σταφίδα	17-20
<i>Ξηροί καρποί (%dm)</i>		<i>Ποτά</i>	
Φυστίκια	0,04	Κρασί (mg/L)	
Pecan nuts	8-14	Λευκό	200-300
<i>Λαχανικά (mg/ 100g fm)</i>		κόκκινο	1000-4000
Λάχανο	25	Μπύρα (mg/L)	60-100
Κρεμμύδι	100-2025	Σπόροι κακάο (%dm)	12-18
Μαϊντανός	55-180	Σπόροι καφέ (%dm)	0,2-10
Σέλινο	94	Τσάι φλιτζ. (200 mL)	150-210

Πίνακας 14: Η περιεκτικότητα των πολυφαινολών σε διάφορα φυτικά προϊόντα (Bravo, 1998)

Food/Beverage ^a	Total Polyphenols	Food/Beverage ^a	Total Polyphenols
Cereals (mg/100 g dm)		Fruits (mg/100 g fm)	
Barley	1200–1500	Blackcurrant	140–1200
Corn	30.9	Blueberry	135–280
Millet	590–1060	Cherry	60–90
Oats	8.7	Cowberry	128
Rice	8.6	Cranberry	77–247
Sorghum	170–10,260	Gooseberry	22–75
Wheat	22–40	Grape	50–490
		Grapefruit	50
Legumes (mg/100 g dm)		Orange	50–100
Black gram	540–1200	Peach	10–150
Chickpeas	78–230	Pear	2–25
Cowpeas	175–590	Plum	4–225
Common beans	34–280	Raspberry	37–429
Green gram	440–800	Red currant	17–20
Pigeon peas	380–1710	Strawberry	38–218
		Tomato	85–130
Nuts (% dm)		Fruit juices (mg/L)	
Betel nuts	26–33	Apple juice	2–16
Cashew nuts	33.7	Orange juice ^b	370–7100
Peanuts	0.04		660–1000
Pecan nuts	8–14		
Vegetables (mg/100 g fm)		Beverages	
Brussels sprouts	6–15	Tea leaves (% dm)	
Cabbage	25	Green	20–35
Leek	20–40	Black	22–33
Onion	100–2025	Tea, cup (mg/200 mL)	150–210
Parsley	55–180	Coffee beans (% dm)	0.2–10
Celery	94	Coffee, cup (mg/150 mL)	200–550
		Cacao beans (% dm)	12–18
Fruits (mg/100 g fm)		Wine (mg/L)	
Apple	27–298	White	200–300
Apricot	30–43	Red	1000–4000 (6500)
		Beer (mg/L)	60–100

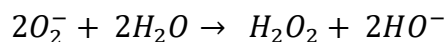
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Η ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΚΑΚΑΟ

4.1 Τρόπος Δράσης, Μεταβολισμός και η Αντιοξειδωτική ιδιότητα των Πολυφαινολών

4.1.1 Η σχέση των Αντιοξειδωτικών και των πολυφαινολών

4.1.1.1 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται τα άτομα ή τα μόρια που έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Σ' αυτή την κατάσταση αντιδρούν χημικά με άλλα μόρια ή άτομα, προσπαθώντας να καλύψουν το ηλεκτρόνιο που τους υπολείπεται (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004). Μια ελεύθερη ρίζα είναι ένα χημικό είδος με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων. Στο πλαίσιο του οξειδωτικού στρες, οι ρίζες είναι μικρά μόρια/ίοντα που αντιδρούν με μικρές ενέργειες ενεργοποίησης και σύντομο χρόνο ζωής. Το μικρό τους μέγεθος επιτρέπει σε πολλά από αυτά να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να θεωρηθούν ως υποσύνολο των δραστικών ειδών οξυγόνου ή αζώτου. Ένα μεγάλο μέρος των δραστικών ειδών οξυγόνου προέρχεται ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια. Το ανιόν υπεροξειδίου, O_2^- παράγεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων ως μέρος του μηχανισμού, ο οποίος ανάγει το O_2 σε νερό. Το O_2^- είναι η αντίστοιχη βάση του υδροπεροξυλίου, HO_2 . Το O_2^- μπορεί να εισέλθει σε αντιδράσεις δυσαναλογίας όπως:



(Jensen, 2003)

Κατά τη φυσική και βιοχημική λειτουργία του οργανισμού προσλαμβάνονται από το περιβάλλον ή παράγονται ως παραπροϊόντα της φυσιολογικής διαδικασίας του μεταβολισμού. Αυτές είναι ικανές να αποδιοργανώνουν τα ενεργά βιομόρια του κυττάρου και να καταστρέφουν τις δομές του με σκοπό την αναζήτηση του υπολειπόμενου ηλεκτρονίου τους. Έτσι, προκύπτουν νέες και ενεργότερες μορφές ελεύθερων ριζών, οι οποίες καταλήγουν στον πυρήνα του κυττάρου και στο γενετικό του υλικό. Αναπνευστικά και καρδιαγγειακά προβλήματα καθώς επίσης η καρκινογένεση είναι από τις επικρατέστερες παθήσεις για τις οποίες ευθύνονται οι ελεύθερες ρίζες (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Ο όρος «οξειδωτικό στρες» εξηγεί την κατάσταση όπου η οξείδωση σε ένα οργανισμό έχει ανέβει σε μη αναστρέψιμα επίπεδα. Χρησιμοποιείται για να αναλύει την ανοδική αυτή τάση των οξειδωμένων δραστικών μορφών. Οξειδωμένες μορφές προκύπτουν από τη δράση των ενεργών ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αυτές δημιουργούν ένα φαύλο κύκλο πολλαπλών οξειδώσεων σε υγιή βιομόρια του οργανισμού, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες κ.λπ., από τα οποία εξέρχονται νέες ρίζες κ.ο.κ. Στην κατάσταση αυτή ο οργανισμός αδυνατεί να ρυθμίσει την ομαλή λειτουργία του και έτσι έχουμε ως αποτέλεσμα μία σειρά από σοβαρά σύνδρομα και ασθένειες. Αυτές οφείλονται στην συνολική απορρύθμιση που προκαλεί η οξείδωση στα βιοχημικά και βιολογικά συστήματα. Η απορρύθμιση αυτή φαίνεται στο παράδειγμα της καρκινογένεσης όπου

η δράση των ελευθέρων ριζών έχει προχωρήσει στο DNA και αλλοιώνει την αλληλουχία του (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004). Η γήρανση έχει επίσης συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες. Η θεωρία των ελευθέρων ριζών για τη γήρανση βασίζεται στην υπόθεση ότι, όταν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά δεν καταστέλλουν πλήρως τα οξειδωτικά, τότε υπάρχουν αθροιστικά αποτελέσματα της οξειδωτικής βλάβης κατά τη διάρκεια της ζωής. Αυτό οδηγεί σε μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA με αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργικότητα του κυττάρου και τελικά το θάνατο. Η υπόθεση υποστηρίζεται από παρατηρήσεις αυξημένων συγκεντρώσεων δεικτών οξειδωτικής βλάβης σε γηρασμένα κύτταρα. Η τρέχουσα άποψη φαίνεται να είναι ότι η γήρανση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία όπου το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός αλλά όχι ο μοναδικός μηχανισμός (Jensen, 2003).

4.1.1.2 Αντιοξειδωτικά

Για τον παραπάνω λόγο, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει άμυνες εναντίον του φαινομένου των ελευθέρων ριζών, **τα αντιοξειδωτικά**. Η κύρια ιδιότητά τους είναι να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες με σκοπό να εμποδίζουν την οξείδωση άλλων ενώσεων στο κύτταρο. Έτσι, αποτρέπεται η επέλαση της οξείδωσης σε άλλα υποσυστήματα με αποτέλεσμα την εξουδετέρωσή τους. Όντας η μοναδική προστασία του οργανισμού από την οξείδωση, είναι σημαντικό ένας οργανισμός να προσλαμβάνει αξιόλογες ποσότητες αντιοξειδωτικών για να προφυλάσσεται, διαφορετικά το φαινόμενο θα γίνεται ανεξέλεγκτο και θα προκαλέσει τα προαναφερθέντα προβλήματα.

Υπάρχει μία πληθώρα από ενώσεις ικανές να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Οι πιο διάσημες είναι οι βιταμίνες C και E, η β-καροτίνη και άλλα παρεμφερή καροτενοειδή, συναθροίσει με τα ανόργανα άλατα σεληνίου και μαγγανίου, τη γλουταθειόνη, συνένζυμο Q10, λιποϊκό οξύ, φυτοοιστρογόνα αλλά και **φλαβονοειδή, φαινόλες και άλλες λοιπές πολυφαινόλες** (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004). Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) ή μη ενζυμικά. Η χημική αρχή πίσω από την προστασία που προσφέρει ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό είναι ότι αντιδρά με το οξειδωτικό πριν αυτό αντιδράσει με σημαντικά βιομόρια. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν κυρίως ως αποδέκτες σε αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις. Μπορούν να χωριστούν σε αντιοξειδωτικά που διασπάνε την αλυσίδα της λιπιδικής φάσης, όπως οι τοκοφερόλες, και σε αντιοξειδωτικά που επιδρούν στην αλυσίδα της υδατικής φάσης, όπως το ασκορβικό. Επιπλέον, άλλα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν δεσμεύοντας τα μέταλλα μετάπτωσης, μειώνοντας έτσι την εμφάνιση αντιδράσεων τύπου Fenton (Jensen, 2003).

Ένας σημαντικός όγκος βιβλιογραφίας υποστηρίζει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεια των ανθρώπινων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία και τη συμβολή των διαιτητικών πολυφαινόλων στην πρόληψή τους. Οι πολύπλοκες σχέσεις μεταξύ της αντιοξειδωτικής κατάστασης και των ασθενειών εξακολουθούν να είναι ελάχιστα κατανοητές και έχουν μελετηθεί εντατικά. Για πολλά χρόνια, οι πολυφαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά θεωρούνταν ότι προστατεύουν τα συστατικά των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες μέσω της απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών.

Ωστόσο, αυτή η αντίληψη φαίνεται τώρα να είναι μια υπεραπλουστευμένη άποψη του τρόπου δράσης τους. Πιθανότατα, τα κύτταρα ανταποκρίνονται στις πολυφαινόλες κυρίως μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς ή ένζυμα που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου και να πυροδοτήσει μια σειρά αντιδράσεων που εξαρτώνται από την οξειδοαναγωγή. Ως αντιοξειδωτικά, οι πολυφαινόλες μπορούν να βελτιώσουν την επιβίωση των κυττάρων· ως προοξειδωτικά, μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση και να αποτρέψουν την ανάπτυξη των όγκων. Ωστόσο, οι βιολογικές επιδράσεις των πολυφαινολών μπορεί να επεκτείνονται και σε άλλες βιολογικές δραστηριότητες, πέραν της ρύθμισης του οξειδωτικού στρες. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αφορά την αλληλεπίδραση των ισοφλαβονών της σόγιας με τους υποδοχείς οιστρογόνων και τις επιδράσεις αυτών των ενώσεων στην ενδοκρινική λειτουργία. Αυτές οι επιδράσεις θα μπορούσαν να εξηγήσουν την πρόληψη της οστικής απορρόφησης από τις ισοφλαβόνες στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Η λεπτομερής κατανόηση των μοριακών γεγονότων που διέπουν αυτές τις διάφορες βιολογικές επιδράσεις είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση του συνολικού αντίκτυπου στον κίνδυνο και την εξέλιξη της νόσου (Scalbert et al., 2005).

4.1.2 Οι πολυφαινόλες ως Αντιοξειδωτικά

Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη σημαντικότερη ομοταξία αντιοξειδωτικών. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός του ότι διαθέτουν **φαινολική ομάδα** στο μόριό τους. Αυτή έχει την ιδιότητα να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες και να διασπάται σε **μη τοξικά** για το κύτταρο παράγωγα. Παράλληλα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες σε πολλά φυτικής προέλευσης τρόφιμα σε επαρκείς ποσότητες. Έτσι, ένας μέσος ενήλικας καταναλώνοντας συχνά φυτικά προϊόντα μπορεί να προστατεύσει τον εαυτό του από διάφορες σημαντικές παθολογικές καταστάσεις και να ενισχύσει το ανοσοποιητικό του σύστημα και την ευεξία του.

Παραδείγματα οξείδωσης που μπορούν να καταστέλλουν οι πολυφαινόλες, αναφορικά, είναι:

- Το τάγγισμα των λιπών
- Οι μεταβολές στο χρώμα των τροφίμων
- Προστασία από διάφορες προσβολές της υγείας που οφείλονται σε λοιμώξεις, εκφυλισμούς, φλεγμονές, μεταλλάξεις κλπ. (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Ευρέως κατανεμημένες στο φυτικό βασίλειο και άφθονες στη διατροφή μας, οι φυτικές πολυφαινόλες είναι σήμερα από τις πιο πολυσυζητημένες κατηγορίες φυτοχημικών ουσιών. Υπάρχουν αρκετές χιλιάδες φυτικές ενώσεις βιολογικού ενδιαφέροντος που έχουν περισσότερες από μία φαινολικές υδροξυλομάδες συνδεδεμένες με έναν ή περισσότερους δακτυλίους βενζολίου, χαρακτηριζόμενες ως πολυφαινόλες. Τα τελευταία χρόνια, οι πολυφαινόλες έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία λόγω της δυνητικής χρήσης τους ως παραγόντων προφύλαξης και θεραπείας σε πολλές ασθένειες, και πολλές εργασίες έχουν παρουσιαστεί από την επιστημονική κοινότητα

οι οποίες επικεντρώνονται στις αντιοξειδωτικές τους επιδράσεις. Παραδοσιακά, τα φυτικά φάρμακα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχουν χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς και τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν επίσης την ευρεία αποδοχή και χρήση αυτών των παραγόντων. Οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν μελετηθεί με σκοπό να βρεθούν ενώσεις που προστατεύουν από διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, όπως καρδιαγγειακά και νευροεκφυλιστικά νοσήματα, καρκίνος, διαβήτης, αυτοάνοσες διαταραχές και ορισμένες φλεγμονώδεις ασθένειες (Vladimir-Knežević et al., 2012).

4.1.3 Τα οφέλη των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό

Το κακάο γενικότερα, τόσο λόγω της πληθώρας ωφέλιμων συστατικών που περιέχει, όσο και λόγω των συστατικών του της ενέργειας που προσφέρει, είναι ένα τρόφιμο λειτουργικό και πολυδύναμο, έχοντας πολλά οφέλη για την υγεία και προσφέροντας ευεξία στον καταναλωτή. Έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην καταπολέμηση, αντιμετώπιση ή κατευνασμό των συμπτωμάτων ασθενειών όπως ο καρκίνος, η διάρροια (και λοιπές προσβολές του γαστρεντερικού συστήματος), η αμυγδαλίτιδα, το άσθμα, η βρογχίτιδα, η συμφόρηση πνευμόνων, η κίρρωση του ήπατος, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, ο διαβήτης, η δυσκοίλια, η αυξημένη αρτηριακή πίεση, οι ρυτίδες κ.α., ενώ βοηθάει στο αδυνάτισμα και, εν δυνάμει, στη βελτίωση της ψυχικής κατάστασης. Σε γενικές γραμμές, λόγω της περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή και άλλες πολυφαινόλες έχει την ικανότητα αντιοξειδωτικής δράσης μειώνοντας, έτσι, την αρτηριακή πίεση, την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων, και, επομένως, την εμφάνιση φλεγμονών (Balzer et al., 2008; *Cocoa (Cacao) | Diseases and Pests, Description, Uses, Propagation*, n.d.).

Λαμβάνοντας υπόψη τη δράση τους, τα οφέλη του οργανισμού από την πρόσληψή των πολυφαινολών είναι:

Πίνακας 15: Η δράση των πολυφαινολών σε διάφορες νόσους (Cory et al., 2018; Wang et al., 2014; Y. Zhou et al., 2016)

Νόσος	Λεδομένα Ευεργετικής δράσης
Νευροεκφυλιστικές ασθένειες	✓ Η κουρκουμίνη, η ρεσβερατρόλη και οι κατεχίνες (όπως η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG)) μπορεί να προφυλάσσουν από ασθένειες παρόμοιες με το Αλτσχάιμερ και την άνοια μέσω των αντιοξειδωτικών, των ρυθμιστών ανοσίας και ιδιοτήτων καθαρισμού που θωρακίζουν τους νευρώνες και, έτσι, αποτρέπονται οι νευροτοξικές επιδράσεις της βήτα-αμυλοειδούς πρωτεΐνης, όπου η αύξηση της συγκέντρωσης της οποίας συνδέεται με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. (Cory et al., 2018a) ✓ Οι επιδράσεις του Χηλικού σιδήρου του EGCG, της κουρκουμίνης, της μυρικετίνης, των τζινσενοσιδών και της τζινγκτίνης πιστεύεται ότι είναι ένας έμμεσα συνδεδεόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου οι πολυφαινόλες αποτρέπουν τη νευροτοξικότητα, δίνοντας τη δυνατότητα να

	διαφυλάσσεται δράση των νεύρων από τις ανάλογες νευρολογικές παθήσεις, όπως οι νόσοι του Πάρκινσον, του Αλτσχάιμερ και του Huntington (Cory et al., 2018a)
Φλεγμονή	Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατευνάσουν τη συστηματική ή/και τοπική φλεγμονή επαναφέροντας την οξειδοαναγωγική ισοσταθμία για την ελάττωση του οξειδωτικού στρες και ρυθμίζοντας τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω του κατευνασμού των οδών κυτοκινίνων (Cory et al., 2018a)
Καρκίνος	Τα φλαβονοειδή, όπως οι ανθοκυάνες, οι κατεχίνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες και οι ισοφλαβόνες, μπορεί να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες και να μειώσουν τον κίνδυνο καρκίνου αναστέλλοντας την κυτταρική ανάπτυξη σε όγκους (Wang et al., 2014). Συγκεκριμένοι τύποι καρκίνων με ενδείξεις ευεργετικών επιδράσεων από τις πολυφαινόλες περιλαμβάνουν καρκίνο του παχέος εντέρου, του προστάτη, του επιθηλίου, του ενδομήτριου και του μαστού (Cory et al., 2018a).
Καρδιαγγειακή Λειτουργία	Τα πλούσια σε φλαβονοειδή τρόφιμα έχουν συσχετιστεί με βελτιωμένη κοιλιακή υγεία, μειωμένη δραστηριότητα αιμοπεταλίων, ενζυματική διαμόρφωση, αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα και χαμηλότερη αρτηριακή πίεση, για την αύξηση της συνολικής αγγειακής υγείας (Y. Zhou et al., 2016). Τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη μπορεί να εμποδίσουν την οξείδωση της χοληστερόλης για να μειώσουν την LDL και να μειώσουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Cory et al., 2018a).
Διαβήτης τύπου 2	✓ Μερικοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Οι πολυφαινόλες μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επίσης, επιβραδύνουν τον ρυθμό που απορροφά το σώμα τη ζάχαρη. Σύμφωνα με έρευνες, ένας τύπος φλαβονοειδούς που ονομάζεται φλαβανο-3-όλες μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευεργετικός για τη μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι τα φλαβονοειδή είναι ο τύπος της πολυφαινόλης, που συνδέεται συχνότερα με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Άλλες έρευνες έδειξαν ότι όσοι καταναλώνουν περισσότερα φλαβονοειδή έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Το ακατέργαστο κακάο είναι μια πλούσια πηγή φλαβονοειδών. Μια έρευνα έδειξε ότι η κατανάλωση κακάο μείωσε σημαντικά έναν δείκτη αντοχής στην

	ινσουλίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ακατέργαστο κακάο είναι πολύ διαφορετικό από τη σοκολάτα σε καραμέλες ή παραδοσιακά επιδόρπια (Cory et al., 2018a). ✓ Αρκετές πολυφαινολικές ενώσεις, κυρίως οι ανθοκυάνες, σχετίζονται τόσο με την πρόληψη όσο και με τη διαχείριση του διαβήτη τύπου 2 μέσω της προστασίας των βήτα κυττάρων από την τοξικότητα της γλυκόζης, των αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών επιδράσεων, της επιβράδυνσης της πέψης του αμύλου και της ρύθμισης και της αλλοιωμένης μεταφοράς της γλυκόζης, οδηγώντας σε καλύτερο έλεγχο του γλυκαιμικού δείκτη (Cory et al., 2018a)
Παχυσαρκία	✓ Οι πολυφαινόλες όπως οι κατεχίνες, η ρεσβερατρόλη και η κουρκουμίνη επιδρούν έναντι της παχυσαρκίας, ενδεχομένως μέσω της οξείδωσης των λιποκυττάρων, της αναστολής της λιπογένεσης, της μείωσης της φλεγμονής και της αύξησης της ενεργειακής δαπάνης, οδηγώντας σε βελτιωμένη απώλεια και συντήρηση του σωματικού βάρους (Wang et al., 2014). ✓ Ένας αριθμός πολυφαινολών έχει αποδειχθεί ότι έχουν ιδιότητες δέσμευσης πρωτεϊνών που μπορούν να αναστείλουν την πέψη αμύλου, λιπιδίων και πρωτεϊνών στο γαστρεντερικό σωλήνα αλληλοεπιδρώντας και αναστέλλοντας τα πεπτικά ένζυμα (Cory et al., 2018a)

4.1.4 Ο Μεταβολισμός και η βιοαπορρόφηση των πολυφαινολών στον οργανισμό

4.1.4.1 Βιοδιαθεσιμότητα Πολυφαινολών

Βιοδιαθεσιμότητα καλείται το μέρος του συνόλου της λαμβανομένης ποσότητας ενός θρεπτικού συστατικού που αξιοποιείται για τις φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες ενός δεδομένου οργανισμού. Τα στοιχεία που υπάρχουν για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών σε πολλά φυτικά προϊόντα είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Στο πρόβλημα συγκαταλέγεται και η έλλειψη εξειδικευμένων οργάνων για τη μέτρηση των φλαβονοειδών καθώς και των μεταβολίτων τους στα φυσιολογικά υγρά (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Οι σημαντικές διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα είναι πλέον καλά τεκμηριωμένες και η επίδραση των δομικών παραγόντων είναι καλύτερα κατανοητή. Οι δραστικές ενώσεις μπορεί να μην είναι οι εγγενείς πολυφαινόλες που βρίσκονται στα τρόφιμα, αλλά είναι πιο πιθανό να είναι μεταβολίτες τους. Οι πολυφαινόλες συζευγνύονται εκτενώς στο

σώμα και οι μη συζευγμένοι μεταβολίτες αντιπροσωπεύουν συνήθως ένα μικρό ποσοστό των κυκλοφορούντων μεταβολίτων. Πολύ λίγα είναι σήμερα γνωστά σχετικά με τις βιολογικές δραστηριότητες αυτών των συζευγμένων μεταβολίτων. Τα γλυκουρονίδια, για παράδειγμα, των ισοφλαβονών και της επικατεχίνης αποδείχθηκε ότι έχουν πολύ ασθενέστερη οιστρογονική δράση και δεν παρείχαν καμία προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν *in vitro*. Τα πορίσματα αυτά υποδηλώνουν ότι πολλές από τις *in vitro* μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα πρέπει να επανεκτιμηθούν, βάσει των νέων δεδομένων σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών (Scalbert et al., 2005).

4.1.4.2 Η μέση ημερήσια πρόσληψη των πολυφαινολών στον άνθρωπο

Οι φυτικές πολυφαινόλες καταναλώνονται συνήθως από προϊόντα όπως φρούτα, λαχανικά, όσπρια, κρασί και τσάι. Αν και ευρέως διαδεδομένες στα τρόφιμα, ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες και η εκτιμώμενη διαιτητική πρόσληψη περιπλέκονται από διάφορους παράγοντες. Οι βάσεις δεδομένων για τη σύνθεση των τροφίμων παραμένουν ελλιπείς και συχνά ανεπαρκείς, παρέχοντας μόνο περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μεταξύ των τροφίμων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό και ακόμη και εντός ενός συγκεκριμένου τροφίμου η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες μπορεί να διαφέρει σημαντικά και κατά πολλές τάξεις μεγέθους. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα σε προκυανιδίνη τεσσάρων κοινών ποικιλιών μήλων έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 12,3 έως 252,4 mg/μερίδα, με τις υψηλότερες ποσότητες να βρίσκονται κατά μέσο όρο στις ποικιλίες Red Delicious και τις χαμηλότερες στις ποικιλίες Golden Delicious. Τέλος, λόγω της πολυμερούς σύνθεσής τους και των αναρίθμητων συνδυασμών τους, των ανεπαρκώς διευκρινισμένων χημικών δομών και της έλλειψης εμπορικά διαθέσιμων προτύπων, η ανάλυση και η εκτίμηση είναι προβληματική (Martin, 2009).

Η διαιτητική πρόσληψη φυτικών πολυφαινολών μπορεί να ποικίλλει σημαντικά και να είναι αρκετά υψηλή, π.χ. g/ημέρα, αλλά τελικά ο διατροφικός αντίκτυπος και οι επακόλουθες συστηματικές επιδράσεις εξαρτώνται από την τύχη των πολυφαινολών στον πεπτικό σωλήνα (Martin, 2009). Δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένα στοιχεία για το πώς οι πολυφαινόλες προσλαμβάνονται από τον οργανισμό. Όμως, όσο αφορά την πρόσληψη φλαβονοειδών επιβεβαιώθηκε ότι η **Μέση Ημερήσια Πρόσληψη κυμαινόταν στα 23-28mg/d**. Δυστυχώς, οι ενδείξεις δεν είναι ικανοποιητικές καθώς δεν μας δίνουν τις ποσότητες των προανθοκυανιδίων και των κατεχίνων, με συνέπεια την απουσία ολοκληρωμένης εικόνας για τον τρόπο απορρόφησης πολυφαινολών από προϊόντα όπως το κακάο, το μαύρο τσάι, το κρασί και ο καφές, στα οποία οι συγκεκριμένες κατηγορίες πληθαίνουν (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

4.1.4.3 Βιοαπορροφησιμότητα των πολυφαινολών στο ανθρώπινο σώμα

Υπάρχουν 2 ομάδες ανάλογα με τον τρόπο πέψης:

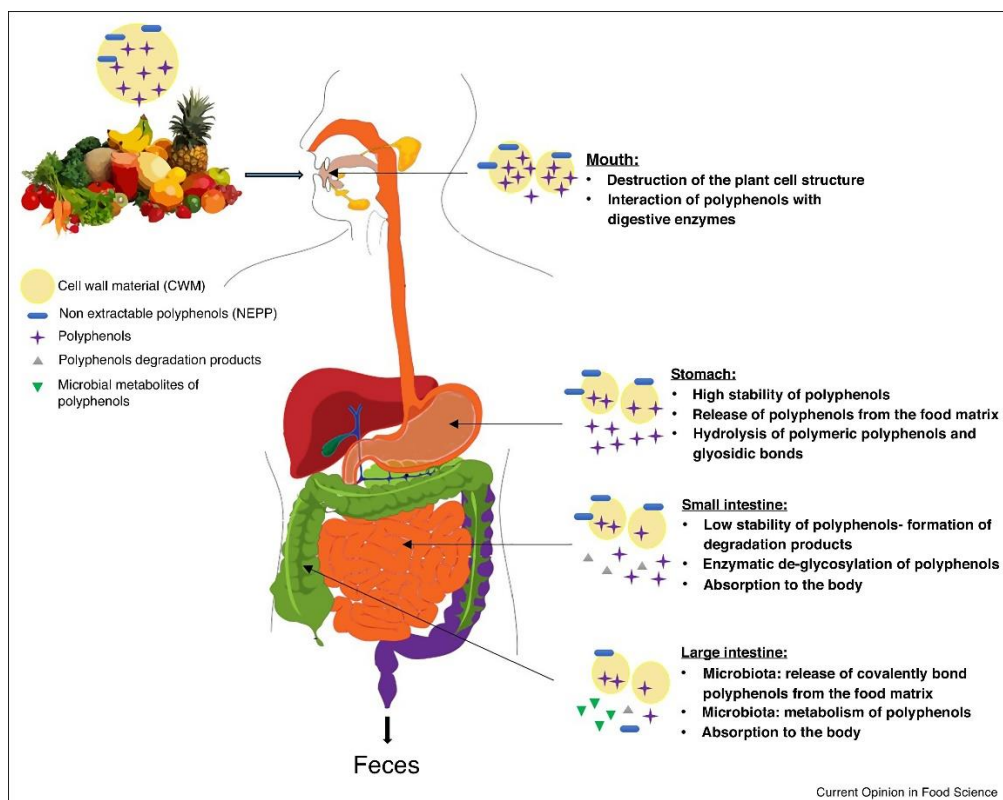
- **Εκχυλιζόμενες:** χαμηλού Μοριακού Βάρους (MB) ενώσεις καθώς και μερικές ταννίνες και προανθοκυανιδίνες των οποίων η εκχύλιση πραγματοποιείται μέσω διαδεδομένων διαλυτών (γ.π. νερό, αιθυλική και μεθυλική αλκοόλη)
- **Μη Εκχυλιζόμενες:** αντίθετα με τις παραπάνω, μεγάλου MB και έχουν την ικανότητα πρόσδεσης με άλλα συστατικά, λ.χ. φυτικές ίνες και πρωτεΐνες, και δεν διαλύονται στους παραπάνω διαλύτες

Από πειράματα χρήσης πεπτικών ενζύμων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί ότι η δεύτερη ομάδα εμφανίζει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Αυτό ερμηνεύεται από ιδιότητά τους να αντιστέκονται της πέψης και της αποδόμησής τους στον πεπτικό σωλήνα από τα εντερικά βακτήρια, πράγμα που αποδείχθηκε από την ύπαρξή τους στα αφοδεύματα των πειραματόζωων. Αντιθέτως, οι εκχυλιζόμενες μεταβολίζονται κανονικά, διασπώμενες μέσω της πέψης, λόγω της διαλυτότητάς τους (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πολυφαινολών φαίνεται να υπαγορεύουν την απορρόφηση και το μεταβολισμό και καθορίζονται κυρίως από τη χημική δομή. Για παράδειγμα, η μητρική δομή (γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ, φλαβαν-3-όλη), ο βαθμός χημικής τροποποίησης, δηλαδή η γλυκοζυλίωση, η σύζευξη, κ.λπ., το μοριακό μέγεθος, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητα είναι κρίσιμοι παράγοντες. Τα σχετικά μικρού μοριακού βάρους φαινολικά οξέα, δηλαδή το γαλλικό οξύ και οι ισοφλαβόνες απορροφώνται εύκολα μέσω του εντέρου ακολουθούμενα από κατεχίνες, φλαβανόνες και γλυκοζίτες κερκετίνης. Οι μεγαλύτερες πολυφαινόλες όπως οι προανθοκυανιδίνες απορροφώνται πολύ λίγο, καθώς και οι γαλοϋλιωμένες κατεχίνες τσαγιού και οι ανθοκυανίνες (Martin, 2009).

Συνεπώς, απαραίτητο είναι να υπάρχει γνώση της αναρρόφησης των πολυφαινολών από το πεπτικό σύστημα, καθώς έτσι αναλύονται η διατροφική σημασία και η συμπεριφορά τους σε αυτό. Έμφαση έχει δοθεί κυρίως στα φλαβονοειδή, που είναι και η επικρατέστερη και πολυπληθέστερη ομάδα. Οι αγλυκόνες είναι οι μοναδικές που απορροφούνται από το παχύ έντερο, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι η πλειοψηφία των φλαβονοειδών, εξαιρουμένων των κατεχίνων, αδυνατούν της απορρόφησης τους, διότι στο λεπτό έντερο ενώνονται με τα διαθέσιμα σάκχαρα για να προκύψουν μετά γλυκοσίδες. Τα μοναδικά φλαβονοειδή που διαπερνούν το εντερικό τοίχωμα είναι τρεις αγλυκόνες, επειδή δεν παράγονται εκεί ένζυμα που να κόπτουν τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μετέπειτα έρευνες απέδειξαν ότι οι γλυκοζίτες κερσετίνης προσλαμβάνονται από τις μικρολάχνες μέσω του εντερικού μεταφορέα της γλυκόζης. Τα φλαβονοειδή λαμβάνονται μεταβλημένα ως γλυκουρανίδια, ενώ το σύμπλεγμα κερσετίνης-γλυκοσίδης και η ρουτίνη αναλλοίωτα. Ο βαθμός απορρόφησης καθορίζεται από το ποιο είναι το σάκχαρο και το που πραγματοποιείται η γλυκοσυλίωση. Συνεπώς, η πέψη και είσοδος, μέσω του πεπτικού σωλήνα, των πολυφαινολών στον οργανισμό ρυθμίζεται από το πως αυτές δομούνται χημικά και, κατ' επέκταση, αυτό καθορίζεται από παραμέτρους όπως ο ρυθμός και η σχέση γλυκοσυλίωσης/ακετυλίωσης, η συνένωση με άλλες φαινόλες, το MB, ο τρόπος πολυμερισμού και η ικανότητα διάλυσης σε κοινούς διαλύτες (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Οι Eran Nagar et al., 2020 έχουν περιγράψει αναλυτικά την πορεία των πολυφαινολών στο πεπτικό σύστημα. Η μάσηση των τροφίμων στο στόμα είναι η πρώτη φάση της πέψης των πολυφαινολών, βασισμένη κυρίως στην άλεση των τροφίμων και την ανάμιξη με το σάλιο. Η τροφική μήτρα και η χημική δομή των πολυφαινολών επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μάσησης στις πολυφαινόλες και μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφησή τους στα ακόλουθα τμήματα του πεπτικού συστήματος. Ενώ η μηχανική διαταραχή της δομής των τροφίμων επιτρέπει τη μερική απελευθέρωσή τους και ενδεχομένως ενισχύει τη προσβασιμότητά τους στο έντερο, αυξάνει επίσης την επιφάνεια για αλληλεπιδράσεις με πεπτικά ένζυμα και σιελογόνους πρωτεΐνες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυφαινολών και πρωτεϊνών μελετήθηκαν εκτενώς στο παρελθόν και αποκάλυψαν ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τις πολυφαινόλες και έτσι να μεταβάλουν τη διαθεσιμότητα των πολυφαινολών για πέψη (και τις αναφορές σε αυτές), παράλληλα με το σχηματισμό στυπτικότητας και τη μείωση των λιπαντικών ιδιοτήτων του σάλιου. Όταν φτάνουν στο στομάχι, οι πολυφαινόλες συχνά απελευθερώνονται από τη μήτρα των τροφίμων και υδρολύονται από το όξινο περιβάλλον pH, ανάλογα με τη χημική τους δομή και την αλληλεπίδραση με τη μήτρα των τροφίμων. Οι γαστρικές συνθήκες και το χαμηλό pH, ειδικότερα, μπορούν γενικά να σταθεροποιήσουν τη χημική δομή της πολυφαινόλης, όπως φάνηκε σε προηγούμενες εκθέσεις, αν και αντίθετα αποτελέσματα αναφέρθηκαν για φαινολικά οξέα κατά τη διάρκεια προσομοίωσης *in vitro* πέψης. Επιπλέον, σε ορισμένες πολυφαινόλες, όπως οι ανθοκυάνες και τα φαινολικά οξέα, εικάζεται ότι μπορούν να υποστούν απορρόφηση στο στομάχι, όπως συμπεραίνεται από τον προσδιορισμό αυτών των πολυφαινολών στο πλάσμα και στα ούρα *in vivo* και από πειράματα κυττάρων *in vitro* (Eran Nagar et al., 2020).



Διάγραμμα 3: Σχηματική αναπαράσταση βιοαπορρόφησης των πολυφαινολών κατά μήκος της πεπτικής οδού (Eran Nagar et al., 2020)

Παρόλο που η τύχη των πολυφαινολών στο ανθρώπινο σώμα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή, οι περισσότερες από τις φαινόλες της διατροφής μας που εισέρχονται στο κυκλοφορικό σύστημα απορροφούνται στο λεπτό έντερο. Σε γενικές γραμμές, τα φλαβονοειδή, κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτικών συζεύξεων, συλλέγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, όπου μπορούν να υδρολυθούν από την υδρολάση της λακτάσης-φλοριζίνης (LPH). Αυτό το ένζυμο μπορεί να υδρολύσει ένα ευρύ φάσμα φλαβονοειδών O-β-d-γλυκοσιδίων, εξαιρουμένων των πολυφαινολών που συνδέονται με τμήμα ραμνόζης, όπως η ρουτίνη (κουερσετίνη ρουτινοσίδη). Επιπλέον, η σημαντική διακύμανση της δραστηριότητας γλυκοσιδάσης μεταξύ των ατόμων μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη διακύμανση της βιοδιαθεσιμότητας των φλαβονοειδών.

Η ενζυμική υδρόλυση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μιας αγλυκόνης με υψηλότερη λιποφιλική ιδιότητα, ικανή να διαχέεται παθητικά στα επιθηλιακά κύτταρα. Μια εναλλακτική οδός περιλαμβάνει την απορρόφηση των γλυκοζιτών πολυφαινόλης στα επιθηλιακά κύτταρα, όπου μπορούν να υδρολυθούν περαιτέρω από την κυτταρική β-γλυκοσιδάση (CBG). Για να επιτραπεί η είσοδος των γλυκοζιτών, που είναι πιο πολικές από την αγλυκόνη, στα επιθηλιακά κύτταρα, προτάθηκε η πιθανή συμμετοχή του ενεργού εξαρτώμενου από το νάτριο μεταφορέα γλυκόζης. Οι γλυκοζίτες πολυφαινολών που δεν αποτελούν υποστρώματα για την LPH ή την CBG δεν απορροφούνται γενικά στο λεπτό έντερο και φθάνουν στο παχύ έντερο όπου υφίστανται αποικοδόμηση από τη μικροχλωρίδα.

Στα επιθηλιακά κύτταρα, οι αγλυκόνες μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω σε γλυκουρονιδιωμένους, μεθυλιωμένους και/ή θειωμένους μεταβολίτες, μέσω της αντίστοιχης δράσης των UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφερασών, των Ο-μεθυλτρανσφερασών της κατεχόλης και των σουλφοτρανσφερασών αντίστοιχα. Μετά από αυτούς τους μετασχηματισμούς, τα αγλυκόνια ή οι μεταβολίτες των αγλυκονίων περνούν στην κυκλοφορία του αίματος ή μεταφέρονται πίσω στον αυλό του λεπτού εντέρου. Οι πολυφαινόλες που φτάνουν στην κυκλοφορία του αίματος, συνήθως υπόκεινται σε περαιτέρω μεταβολισμό φάσης II στο ήπαρ και μπορούν επίσης να επιστρέψουν στο λεπτό έντερο μετά από έντερο-ηπατική μεταφορά με την απέκκριση της χολής. Τα φλαβονοειδή (και οι μεταβολίτες τους) που δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο φθάνουν στο παχύ έντερο, όπου υπόκεινται στη δράση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου (Eran Nagar et al., 2020).

Ενώ το λεπτό έντερο αποτελεί σημαντικό σημείο απορρόφησης των πολυφαινολών, η χημική τους σταθερότητα στις συνθήκες του λεπτού εντέρου μπορεί να είναι χαμηλή, ως συνάρτηση της χημικής τους δομής. Παρά το γεγονός αυτό, τα δεδομένα είναι ελλιπή όσον αφορά τη σχέση μεταξύ της αστάθειας των πολυφαινολών στις συνθήκες του λεπτού εντέρου, που πιθανώς προέρχεται από το ήπιο αλκαλικό pH, και της βιοπροσβασιμότητας και βιοδιαθεσιμότητας των πολυφαινολών. Οι ανθοκυανίνες, για παράδειγμα, είναι πιθανότατα η ομάδα πολυφαινολών που επηρεάζεται περισσότερο από την αύξηση του pH. Η αύξηση του pH οδηγεί στο σχηματισμό άχρωμων χαλκονών και στην αποικοδόμηση των ανθοκυανών, και είναι επίσης η λιγότερο βιοπροσβάσιμη ομάδα φλαβονοειδών. Ωστόσο, η μειωμένη βιοπροσβασιμότητα στο λεπτό έντερο μπορεί επίσης να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυφαινολών και πεπτικών ενζύμων και ενδεχομένως άλλων συστατικών της τροφής που υπάρχουν ή σχηματίζονται κατά την πέψη. Η οξείδωση είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός υποβάθμισης της χημικής αστάθειας των πολυφαινολών, αν και ο παράγοντας αυτός δεν τυγχάνει της δέουσας προσοχής κατά τη διάρκεια των *in vitro* μελετών. Τα επίπεδα οξυγόνου στο λεπτό έντερο είναι πιθανώς μείζονος σημασίας όταν συζητείται η οξείδωση, και ενώ προτάθηκαν διάφορα επίπεδα οξυγόνου στο λεπτό έντερο (0-55,5 pO₂), οι περισσότερες από τις μελέτες *in vitro* μέχρι στιγμής διεξήχθησαν υπό μη ελεγχόμενες τιμές διαλυμένου οξυγόνου. Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί ότι η εν λόγω διακύμανση μπορεί να συμβάλει σε δυσκολίες στη σύγκριση των *in vivo* και *in vitro* αποτελεσμάτων και πιθανώς απαιτείται τυποποίηση αυτού του θέματος στις *in vitro* μελέτες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιο-προσβασιμότητα των πολυφαινολών.

Ο ρυθμός και η συνολική ποσότητα της εντερικής απορρόφησης των πολυφαινολών επηρεάζονται έντονα από τη χημική τους δομή. Μελέτες βιοδιαθεσιμότητας σε ανθρώπους έδειξαν διαφοροποίηση στις ποσότητες των μορφών γλυκοζιτών και αγλυκών στα ούρα και στο πλάσμα μεταξύ διαφορετικών φαινολικών ενώσεων. Μια ανασκόπηση σχετικά με την κινητική και την έκταση της απορρόφησης των πολυφαινολών στο πλάσμα και τις ουρικές απεκκρίσεις ενηλίκων, αποκάλυψε ότι το γαλλικό οξύ και οι ισοφλαβόνες έχουν την καλύτερη απορρόφηση μεταξύ των

πολυφαινολών, ακολουθούμενες από τις κατεχίνες, τις φλαβανόνες και τα γλυκοσίδια της κουερκετίνης, με διαφορετική κινητική. Οι προανθοκυανιδίνες, οι γαλοϋλιωμένες κατεχίνες του τσαγιού και οι ανθοκυάνες αναγνωρίστηκαν ως πολυφαινόλες με τη χαμηλότερη απορρόφηση (Eran Nagar et al., 2020).

Οι πολυφαινόλες μεταβολίζονται εκτενώς από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, κυρίως σε φαινολικά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία απορροφώνται καλύτερα μέσω του φραγμού του παχέος εντέρου από τις αρχικές τους ενώσεις, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολών και των πολυφαινολών. Ο μικροβιόκοσμος του παχέος εντέρου απελευθερώνει απλές αρωματικές ενώσεις από την αποικοδόμηση των αγλυκονών, συμπεριλαμβανομένων των υδροξυφαινυλο-οξικών οξέων από φλαβονόλες, των υδροξυφαινυλο-προπιονικών οξέων από φλαβόνες και φλαβανόνες και των φαινυλοβαλερολακτονών και των υδροξυφαινυλοπροπιονικών οξέων από φλαβονόλες. Τα τελευταία χρόνια, οι πολυφαινόλες-μεταβολίτες του μικροβιόκοσμου κερδίζουν όλο και μεγαλύτερη προσοχή, καθώς μελέτες αποδίδουν σε αυτές τις ενώσεις πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες στο σώμα μας, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών και αντιγηραντικών επιδράσεων, βελτίωσης της γνωστικής λειτουργίας και μείωσης των κινδύνων μεταβολικών ασθενειών. Επιπλέον, αναπτύσσονται περισσότερες μέθοδοι για την αξιολόγηση των αλλαγών στο προφίλ των πολυφαινολών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του παχέος εντέρου.

Από την άλλη πλευρά, φάνηκε ότι παρουσία διαφόρων πολυφαινολών, η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβλήθηκε θετικά προς πιο προαγωγικά για την υγεία μέλη, όπως το *Bifidobacterium* spp. και το *Lactobacillus-Enterococcus* spp (Eran Nagar et al., 2020) .

Παρακάτω αναφέρονται οι τρόποι βιοαπορρόφησης των κύριων κατηγοριών των πολυφαινολών από το πεπτικό σύστημα:

- **Φλαβονόλες και Φλαβόνες:** Στον άνθρωπο έχει αποδειχθεί μικρή απορρόφηση αγλυκονών μέσω του στόματος. Όμως, τα στοιχεία δείχνουν ότι οι απορρόφηση γλυκοζιτών στο λεπτό έντερο μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ικανοποιητικά επίπεδα. Μάλιστα, άτομα με ειλεοστομία κατάφεραν να απορροφήσουν 24% κερσετίνης διά του στόματος, δηλαδή με την κατανάλωση κρεμμυδιών. Ως αποτέλεσμα την έρευνας αποδείχθηκε ότι οι φλαβονόλες και μία φλαβόνη ήταν ικανές να εισέλθουν από το έντερο στο αίμα.
- **Φλαβονόνες:** Πειραματισμοί σε ανθρώπους ανέδειξαν ομοιότητα στην πεπτική κατεργασία της ναρινγκίνης και εσπεριδίνης με αυτή των ζώων. Επιπλέον, η ναρινγκίνη διασπάται και τα παράγωγά της απεκκρίνονται στα ούρα, ενώ η εσπεριδίνη διεισδύει στο κυκλοφορικό σύστημα αδιάλλακτη.
- **Κατεχίνες:**
 - Σε δοκιμές χορήγησής τους σε ανθρώπους και τρωκτικά, μέσω συμπληρωμάτων, μετά από 10 ώρες νηστείας βρέθηκε ότι η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα (επικατεχίνης και επιγαλλοκατεχίνης) αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου

($t > 30 \text{ min}$). Σε παρόμοια μελέτη, όπου χορηγούνταν πράσινο τσάι σε δόση αντίστοιχης με 6 φλιτζάνια, η μέγιστη συγκέντρωση έφτασε σε 1h. Υποστηρίζεται ότι μετά από στοματική πρόσληψη κατεχίνων σε ανθρώπους η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται σε 1-2h, καθώς επίσης ότι η απορρόφηση των κατεχίνων του τσαγιού είναι ισότιμες το 0,2-0,9% της πρωταρχικής τιμής. Επίσης ο Hollman (1997) απέδειξε ότι οι αδέσμευτες μορφές κατεχίνης [δηλαδή οι (+)(-) κατεχίνη] έχουν μικρότερη εμφάνιση (0,3%) στο πλάσμα εν συγκρίσει με την αρχική τιμή χορήγησης, σε αντίθεση με τις μεθυλιωμένες, όπου και είναι δεκαπλάσιες (3%). Οι ελεύθερες μορφές, όμως, αποτελούν 0,5% του συνόλου των κατεχίνων, ενώ αντίστοιχη ποσότητα καταλήγει στα ούρα. Συνήθως, το 25% των κατεχίνων εντοπίζεται στο αίμα ως μεταβολίτες. Τέλος, η εντερική απορρόφηση φαίνεται να αναστέλλεται από το βλεννογόνο του εντέρου, μετά από σύνδεση των κατεχίνων και του ταννικού οξέος με φυσιολογικά ευρισκόμενες πρωτεΐνες, ενώ επιπλέον το πλήθος των μεταβολίτων κατεχίνων στο αίμα ελαχιστοποιείται μετά από 6h.

- Η πρόσληψη από τις κοιλότητες του στόματος φαίνεται να είναι μεγαλύτερη και αποτελεσματικότερη καθώς τα μέγιστα επίπεδα ειδών κατεχίνων λήφθηκαν σε ολίγα λεπτά, έπειτα από την πρόσληψη 2-6 φλιτζανιών τσαγιού. Έτσι τα επίπεδα είναι μεγαλύτερα από ό,τι στο πλάσμα. Σαφές δείχνει να είναι ότι η συγκέντρωση αυτή μεγιστοποιείται μετά από κατακράτηση διαλύματος κατεχίνων (π.χ. τσάι) στο στόμα.
- **Προκυανιδίνες:** Διασπώνται σε παράγωγα μονομερών και διμερών διαλυμάτων επικατεχίνης, για να περάσουν μετά στο λεπτό έντερο απορροφούμενες. Η ποσότητα κατανάλωσης προκυανιδίων φαίνεται να έχει ανάλογη σχέση με την αντίστοιχη σύστασή τους στο αίμα.

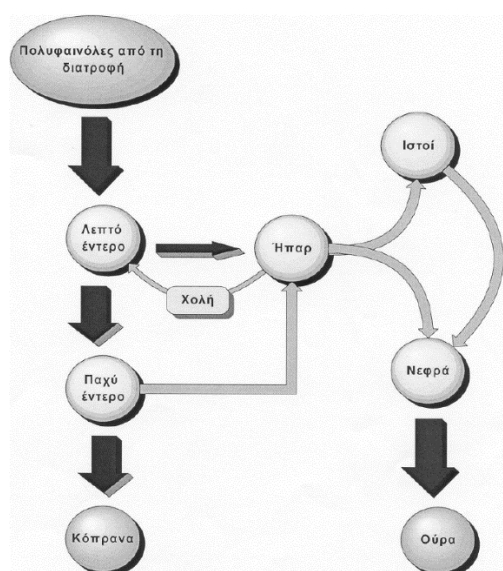
Εν συνεχεία, ας δούμε τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται ο μεταβολισμός στον άνθρωπο, παρουσιάζοντας τα διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες σε άλλα θηλαστικά.

Έρευνα έδειξε ότι έπειτα της εισόδου των φλαβονόλων από το δωδεκαδάκτυλο (εντερικά κύτταρα) στον ορογόνο χιτώνα είτε αυτά έρχονται σε επαφή με γλυκουρανίδια (45% πιθανότητα), είτε μεθυλιώνονται (30% πιθανότητα, είτε συμβαίνουν και τα δύο (20% πιθανότητα). Από εκεί και έπειτα ή θα εισέλθουν, κατεργασμένες από εξειδικευμένη μεταφορά, στην πυλαία κυκλοφορία ή μέσω ώθησης στον ειλεό, μη επεξεργασμένες. Η δεύτερη περίπτωση, εν συγκρίσει με αυτήν στο δωδεκαδάκτυλο, η και επικρατέστερη. Οι φαινολικές ουσίες, που λαμβάνονται από το πεπτικό, διαμορφώνονται ως μεταβολικά παράγωγα στο ήπαρ. Αντιδρούν με το θειικό ή γλυκουρονικό οξύ, τα οποία έλκονται από τα αδρανή υδροξύλια. Στην πλειονότητά τους, τα ευρισκόμενα στο συκώτι παράγωγα μεθυλιώνονται. Εν συνεχεία,

θα εγχυθούν στη χολή και κατόπιν στο παχύ έντερο, του οποίου η μικροχλωρίδα επενεργεί με υδρόλυση των δεσμών των ενωμένων μορίων. Με τον τρόπο αυτό, το τμήμα της αγλυκόνης είναι διαθέσιμο προς προσρόφηση, ενώ επίσης τα ενωμένα μόρια μπορούν να επαναπροσληφθούν και να επανέλθουν στην κυκλοφορία ουσιών εντέρου-ήπατος (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Τέλος, όσο αφορά την απέκκριση, αυτή γίνεται με τα κόπρανα για όσες ουσίες δεν αξιοποιήθηκαν από τη μεταβολική δραστηριότητα ούτε προορίστηκαν για την κυκλοφορία του αίματος από το παχύ έντερο και με τα ούρα όσες έχουν ήδη εισέλθει στην ροή του αίματος (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004).

Στο παρακάτω διάγραμμα αναπαρίσταται η πορεία των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό:



Διάγραμμα 4: Πορεία των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό (Μπαλαμώτη & Ανδρικόπουλος, 2004)

4.2 Η αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών

Έχουν αναφερθεί οι δράσεις των πολυφαινολών του κακάο εναντίον βακτηρίων όπως του σταφυλόκοκκου και του *E. Coli*. Έρευνα από τους Indrianingsih et al., 2021 προσδιόρισε την ολική φαινολική περιεκτικότητα, αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή και αντιδιαβητική δράση τριών γηγενών φυτών συμπεριλαμβανομένων και ποικιλιών του κακάο. Από την αντιβακτηριακή δοκιμή, ο φλοιός του *T. cacao* και των δύο ποικιλιών διέθετε τα πιο δραστικά εκχυλίσματα με MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) 0,62 mg / mL έναντι του σταφυλόκοκκου. Η μελέτη αποκάλυψε ότι ο φλοιός του *T. cacao* θα μπορούσε να είναι μια δυνητικά πλούσια πηγή φυσικών αντιβακτηριακών, αντιοξειδωτικών και αντιδιαβητικών προϊόντων (Indrianingsih et al., 2021).

Ο παρακάτω πίνακας δίνει τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας:

Πίνακας 16: Δοκιμασία αντιβακτηριακής δράσης, όπου MIC: Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση MBC: Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση. (Indrianingsih et al., 2021)

Δείγματα	<i>S. aureus</i> NBRC 12731		<i>E. coli</i> NBRC 3972	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>Theobroma Φλοιός λοβού κακάο (μωβ ποικιλία)</i>	0.62	5.00	>5.00	>5.00
	0.62	1.25	>5.00	>5.00
	0.62	5.00	>5.00	>5.00
	0.62	>5.00	>5.00	>5.00
	0.31	5.00	>5.00	>5.00
<i>Theobroma Φλοιός λοβού κακάο (κίτρινη ποικιλία)</i>	0.62	5.00	>5.00	>5.00
	1.25	5.00	>5.00	>5.00
	1.25	>5.00	>5.00	>5.00
	5.00	>5.00	>5.00	>5.00
	0.31	5.00	>5.00	>5.00

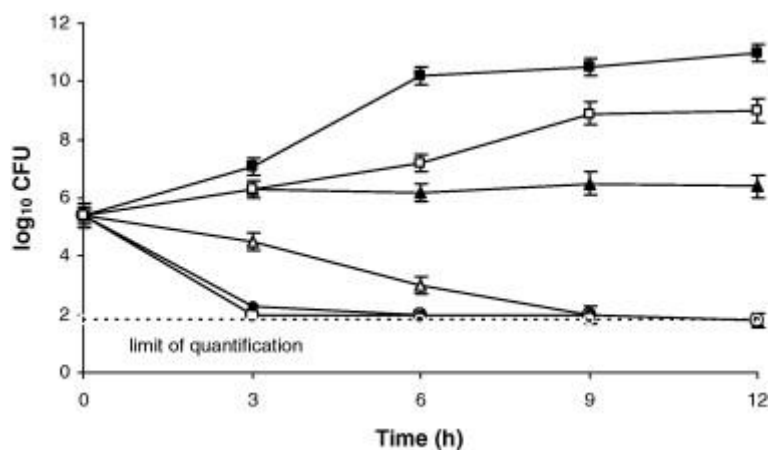
Συμπεραίνοντας, κατά τους Indrianingsih et al., 2021, η πιο βακτηριοκτόνος δράση κατά του *S. aureus* είναι ο φλοιός του καρπού της μωβ ποικιλίας του *T. cacao* με τιμή MBC 1,25 mg/mL. Μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι η πηκτίνη που περιέχεται στο φλοιό του λοβού *T. cacao* μπορεί να συνδράμει στην αντιβακτηριδιακή δράση του εκχυλίσματος.

Οι Bubonja-Sonje et al., 2011 εξήγαγαν μία συγκριτική αξιολόγηση στις πολυφαινόλες, από εκχυλίσματα τριών φυτών: **δενδρολίβανο, ελαιόλαδο και κακάο**, καθώς και ελεύθερων αντιοξειδωτικών ουσιών για να προσδιορίσουν τη δράση τους έναντι του είδους *Listeria monocytogenes*, παθογόνου βακτηρίου υπεύθυνου για την ασθένεια της Λιστερίωσης. Το παθογόνο, του οποίου η παρουσία εγκυμονεί σε πολλά τρόφιμα, προκαλεί αυξανόμενη ανησυχία για τη δημόσια υγεία σε πολλές χώρες. Η αιτία της παθογένεσης στο άνθρωπο είναι η περιστασιακή μόλυνση από έτοιμα προς κατανάλωση αλλά και ακατέργαστα τρόφιμα. Η απανταχού παρούσα κατανομή αυτού του παθογόνου στη φύση, η ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασία ψύξης και η ανοχή του σε ορισμένα συντηρητικά οδήγησαν σε εκτεταμένες προσπάθειες για την ανάπτυξη διαδικασιών ελέγχου της ανάπτυξής του στα τρόφιμα. Χρησιμοποιήθηκαν οι ολικές φαινολικές ενώσεις του κακάο (*T. cacao*) και του ελαίου ελιάς (*Olea europaea* L.), του εμπορικού εκχυλίσματος δενδρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.) V40, καθώς και καθαρές πολυφαινόλες σε αυτή τη μελέτη. Η βακτηριοκτόνος δράση κάθε εκχυλίσματος αξιολογήθηκε επίσης με καμπύλες χρονικής θανάτωσης.

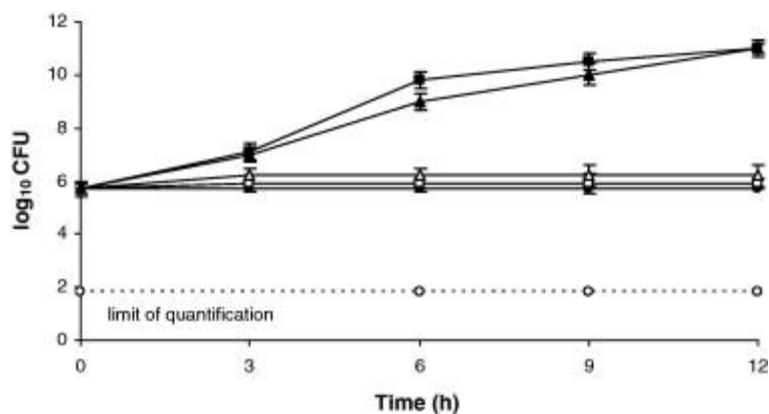
Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μια **μικρή αντιβακτηριακή ιδιότητα** στο *L. monocytogenes* από την **επικατεχίνη του κακάο** (ελάχιστες συγκεντρώσεις βακτηριοκτόνων υψηλότερες από 6,4 mg/ml). Πιθανώς, **άλλα συστατικά που περιέχονται στη σκόνη κακάο**, όπως τα λιπαρά οξέα και τα γλυκερίδια (μονοακόρεστα, διακόρεστα και πλήρως κορεσμένα σχήματα), να ήταν υπεύθυνα για τις αντιβακτηριακές επιδράσεις. Το ολικό εκχύλισμα πολυφαινόλης ελαιολάδου έδειξε ισχυρή αντιλιστερική δράση, ενώ η υδροξυτυροσόλη μέτρια. Άλλες πολυφαινόλες ελαιολάδου έδειξαν χαμηλότερη αντιλιστερική δράση από την υδροξυτυροσόλη ή το ολικό εκχύλισμα πολυφαινόλων. Οι χαμηλότερες ελάχιστες ανασταλτικές και ελάχιστες βακτηριακές συγκεντρώσεις που λαμβάνονται για το ολικό εκχύλισμα πολυφαινόλης, σε σύγκριση με την κύρια πολυφαινόλη της υδροξυτυροσόλης, υποδηλώνουν **ένα πρόσθετο ή συνεργατικό αποτέλεσμα μεταξύ ορισμένων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου. Το εκχύλισμα δεντρολίβανου**, από την άλλη πλευρά, είχε το **μεγαλύτερο** αντιλιστερικό χαρακτήρα μεταξύ όλων των εκχυλισμάτων, καθώς και των καθαρών πολυφαινόλων που δοκιμάστηκαν. Η αναστολή της ανάπτυξης του *L. Monocytogenes* επιτεύχθηκε σε πολύ πιο χαμηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος V40 ή καρνοσικού οξέος (CA) (κύριου φαινολικού βιοδραστικού [MIC σε 0,083 mg/ml και 0,166 mg/ml αντίστοιχα]). Δεδομένου ότι το καθαρό CA είχε ελαφρώς υψηλότερο MIC σε σύγκριση με το V40, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι **τα δευτερεύοντα συστατικά του εκχυλίσματος δεντρολίβανου V40** έχουν επίσης ρόλο στην αντιλιστερική δράση, αποφέροντας ένα πρόσθετο ή συνεργατικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα της αντιλιστερικής δράσης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων που λαμβάνονται με τη μέθοδο της αραιώσης επιβεβαιώθηκαν από τις καμπύλες χρονικής θνησιμότητας. Το ολικό εκχύλισμα πολυφαινόλης ελαιολάδου ανέστειλε τη βακτηριακή ανάπτυξη σε συγκέντρωση 0,4 mg/ml ($1 \times \text{MIC}$), ενώ συγκεντρώσεις άνω των 0,8 mg/ml ($2 \times \text{MIC}$) παρουσίασαν βακτηριοκτόνο δράση μετά από λίγες ώρες. Όπως φαίνεται παρακάτω, η κινητική της αδρανοποίησης που παρακολούθηθηκε επί 12 ώρες επιβεβαίωσε την ασθενή δραστηριότητα του εκχυλίσματος πολυφαινόλης κακάο έναντι του στελέχους *L. monocytogenes* EGD. **Η συγκέντρωση 6,4 mg/ml ($4 \times \text{MIC}$) εκχυλίσματος κακάο δεν ήταν επαρκής** για να επιτευχθεί βακτηριοκτόνο δράση μετά από 12 ώρες. Από την άλλη πλευρά, επιτεύχθηκε **γρήγορη αδρανοποίηση** των βακτηρίων (εντός των πρώτων 3 ωρών) **με τη χρήση του εκχυλίσματος δεντρολίβανου (V40)** σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (Bubonja-Sonje et al., 2011). Οι τιμές MIC και MBC παρατίθενται στον Πίνακα 17 ενώ οι καμπύλες χρονικής θνησιμότητας, για το κάθε αντικείμενο μελέτης, στα Διαγράμματα 5-7:

Πίνακας 17 Ελάχιστες ανασταλτικές (MIC) και ελάχιστες βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MBC) ολικών εκχυλισμάτων πολυφαινολών και καθαρών πολυφαινολών έναντι του *Listeria spp*, όπου EPI = επικατεχίνη, HT = υδροξυτυροσόλη, ΟΟΡΕ = εκχύλισμα πολυφαινόλης ελαιολάδου. CPE = εκχύλισμα πολυφαινόλης κακάο. CA = καρνοσικό οξύ, V40 = εκχύλισμα δεντρολίβανου (Bubonja-Sonje et al., 2011).

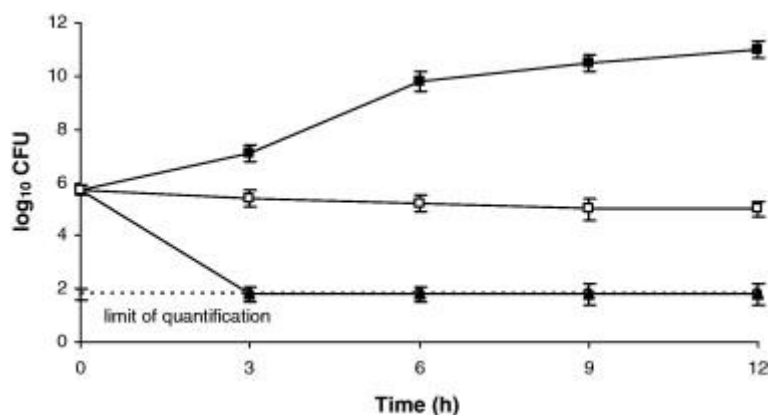
Φαινολικές ενώσεις	Αντιβακτηριακή δραστηριότητα (mg/ml)	
	MIC	MBC
ΟΟΡΕ	0.400 ± 0.096	0.925 ± 0.242
HT	0.600 ± 0.218	1.025 ± 0.371
CPE	1.200 ± 0.438	>6.4
EPI	3.733 ± 1.306	>6.4
V40	0.083 ± 0.023	0.083 ± 0.025
CA	0.166 ± 0.051	0.400 ± 0.309



Διάγραμμα 5: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης των ολικών πολυφαινολών του ελαιολάδου έναντι του *Listeria monocytogenes*. Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: έλεγχος (χωρίς φάρμακο), 0,2 mg/ml (0,5 × MIC), 0,4 mg/ml (1 × MIC), 0,8 mg/ml (2 × MIC), 1,6 mg/ml (4 × MIC), 3,2 mg/ml (8 × MIC) (Bubonja-Sonje et al., 2011)



Διάγραμμα 6: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης των ολικών πολυφαινολών κακάο έναντι του *Listeria monocytogenes*. Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: κοντρόλ (χωρίς φάρμακα), 0,8 mg/ml ($0,5 \times \text{MIC}$), 1,6 mg/ml ($1 \times \text{MIC}$), 3,2 mg/ml ($2 \times \text{MIC}$), 6,4 mg/ml ($4 \times \text{MIC}$) (Bubonja-Sonje et al., 2011)



Διάγραμμα 7: Καμπύλη χρονικής εξόντωσης του εκχυλίσματος πολυφαινόλης δεντρολίβανου έναντι του *Listeria monocytogenes*. Οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με τη σειρά ως εξής: ■ έλεγχος (χωρίς φάρμακα), □ 0,025 mg/ml ($0,5 \times \text{MIC}$), ▲ 0,05 mg/ml ($1 \times \text{MIC}$) (Bubonja-Sonje et al., 2011)

Αν και οι αντιμικροβιακές επιδράσεις διαφόρων φαινολικών εκχυλισμάτων είναι καλά τεκμηριωμένες, οι μηχανισμοί δράσης αυτών των προϊόντων και των συστατικών τους δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Οι πολυφαινόλες πιστεύεται ότι προκαλούν επιφανειακή δραστηριότητα που βλάπτει τις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων, αναστέλλουν τα ένζυμα τους ή παρεμβαίνουν στην παραγωγή ορισμένων αμινοξέων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη βακτηρίων. Η αντιβακτηριακή δράση των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου οφείλεται στην παρουσία του ορθο-διφαινολικού συστήματος (κατεχόλη). Επομένως, **η θέση και ο αριθμός των υδροξυλομάδων στην ομάδα φαινολών** πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη σχετική τοξικότητά τους σε μικροοργανισμούς, με ενδείξεις ότι η αύξηση της υδροξυλίωσης οδηγεί σε αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης. Οι πολυφαινόλες δεντρολίβανου μπορεί να επηρεάσουν τη ρευστότητα της μεμβράνης. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του καρνασικού οξέως (CA) και άλλων πολυφαινολών που δοκιμάστηκαν σε αυτή τη μελέτη κατά της λιστεριακής ανάπτυξης (Bubonja-Sonje et al., 2011).

Οι Jafari et al., 2023 εκχύλισαν βιοδραστικά από σκόνη κελύφους κακάο (CSP) και τα βελτιστοποιημένα εκχυλίσματα ξηράθηκαν με ψεκασμό για την **ενθυλάκωσή** τους με **αραβικό κόμμι (GA) και μαλτοδεξτρίνη (MD)**. Μέσω της τεχνικής αυτής, παρήχθησαν μικροκάψουλες, των οποίων προσδιορίστηκαν το πώς βελτιώνονται οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις του κακάο και απεδείχθη η αποδοτικότητά τους. Οι μικροβιακές καλλιέργειες, πάνω στις οποίες έγιναν δοκιμές, συμπεριλάμβαναν τα στελέχη των *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*.

Η GMM είχε **το μεγαλύτερο εύρος αναστολής** έναντι των *E. coli* και *S. aureus* μεταξύ όλων των δειγμάτων (11,5 και 11,1 mm, αντίστοιχα). Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση (ζώνη αναστολής και MIC), υπήρξε μια ασήμαντη διαφορά μεταξύ των μικροκαψουλών GM (αραβικό κόμμι & μαλτοδεξτρίνη) και του εκχυλίσματος CSP. Επιπλέον, όσον αφορά τη διάμετρο της ανασταλτικής ζώνης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ GMM και του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης (χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας). Η *E. coli* και ο *S. aureus* ήταν οι πιο ευαίσθητοι μικροοργανισμοί στις μικροκάψουλες CSP, όπως προσδιορίστηκαν από τις χαμηλότερες τιμές MIC. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι αντιδραστικότεροι σε ξένα υλικά επειδή έχουν εξωτερική μεμβράνη και περιπλασματικό χώρο, πράγμα που δεν διαθέτουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Οι μικροκάψουλες από GM είχαν **τη χαμηλότερη επιθυμητή τιμή MIC** (1,50), ακολουθούμενες από τις κάψουλες από GA (2,00) και από MD (2,25). Τα αποτελέσματα της έρευνας σχετικά ενδεχομένως αποδίδονται στην παρουσία φαιολικής ένωσης στα εξεταζόμενα δείγματα που έχουν εξαιρετική αντιβακτηριακή δράση. Για την πρόληψη της εξάπλωσης παθογόνων στα τρόφιμα ή στην ανθρώπινη διατροφή, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μικρο-ενθυλάκωση, μια τεχνολογία που βοηθά στη διασπορά και τη διατήρηση λειτουργικών ενώσεων αξίας τροφίμων εντός των τροφίμων αυτών, δηλαδή στην «μήτρα» τους. Ωστόσο, το είδος των μικροοργανισμών και η σύνθεση επηρεάζουν, συγχρόνως, την αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας (Jafari et al., 2023). Ο πίνακας 18 παραθέτει τα δεδομένα των αποτελεσμάτων της έρευνας:

Πίνακας 18: Αντιβακτηριακή δράση των μικροκαψουλών με ενθυλακόμενο εκχύλισμα CSP, όπου CSP: σκόνη κελύφους κακάο, GAM: μικροκάψουλα αραβικού κόμμεος (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με GA), MDM: μικροκάψουλα μαλτοδεξτρίνης (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με MD), GMM: αραβικό κόμμι + μικροκάψουλα μαλτοδεξτρίνης (εκχύλισμα CSP επικαλυμμένο με το μείγμα GA+MD). (Jafari et al., 2023)

Δείγμα/Παράμετρος	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ζώνη αναστολής (mm)				
CSP extract	9.4 ± 0.20	11.3 ± 0.50	8.9 ± 0.75	10.9 ± 0.20
GAM (5 mg/mL)	7.1 ± 0.35	10.05 ± 0.10	7.2 ± 0.20	9.8 ± 0.20
MDM (5 mg/mL)	8.4 ± 0.15	8.9 ± 1.20	8.1 ± 0.34 ^c	8.5 ± 0.25
GMM (5 mg/mL)	9.6 ± 0.15	11.5 ± 0.34	9.0 ± 0.50	11.1 ± 0.45
Χλωραμφενικόλη (30μg/mL) (μάρτηρας)	9.5 ± 0.20	11.2 ± 0.30	11.0 ± 0.50	9.1 ± 0.16
MIC (mg/mL)				
CSP extract	1.80 ^b	1.65 ^b	1.90 ^b	1.50 ^b
GAM	2.85 ^a	2.00 ^a	2.85 ^a	2.00 ^a
MDM	2.25 ^a	2.50 ^a	2.25 ^a	2.50 ^a
GMM	1.85 ^b	1.50 ^b	1.85 ^b	1.50 ^b

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5º: ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΣΗΜΕΙΟ ΝΕΦΩΣΗΣ (CLOUD POINT EXTRACTION) ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

5.1 Οι «πράσινες» μέθοδοι εκχύλισης

Η ανέλιξη στην ανάπτυξη τεχνολογιών με οικολογική συμπεριφορά έχει σημαντική επιρροή για την ανάκτηση ενώσεων φυσικής προέλευσης προοριζόμενα για τη βιομηχανία εδωδιμών προϊόντων. Οι καινοτόμες τεχνικές εκχύλισης έχουν βασιστεί στην «πράσινη» χημεία, καθώς και από το αυξανόμενο κοινό ενδιαφέρον για ενώσεις χωρίς παρελκόμενα βλαβερά χημικά. Σε τέτοιους νέους τύπους εκχύλισης ανήκουν η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού, η εκχύλιση υπό πίεση, η εκχύλιση με μικροκύματα, η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους, η εκχύλιση ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος, μεταξύ άλλων. Η πράσινη τεχνολογία σε συνδυασμό με τη χρήση μη βλαβερών οικολογικά διαλυτών, όπως οι βαθιά ευτηκτικοί διαλύτες και οι ιοντικοί διαλύτες, θεωρείται βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη φυσική ένωση ανάκτησης και επίσης αποτρέπει τον σχηματισμό τοξικών λυμάτων. Εκτός από τις φιλικές προς το περιβάλλον διαστάσεις των πράσινων τεχνικών εκχύλισης, λαμβάνονται επίσης υπόψη τα συστατικά υγείας και ασφάλειας. Οι νέες τεχνικές εκχύλισης δεν είναι χωρίς τους δικούς τους περιορισμούς. Ως εκ τούτου, οι επενδύσεις κεφαλαίου και το κόστος λειτουργίας που συνδέονται με αυτές τις τεχνολογίες ενδέχεται να αποτελέσουν σημαντικές προκλήσεις για την υλοποίηση και την εφαρμογή τους (Picot-Allain et al., 2021).

Η ανάλυση των βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο εάν ορισμένες μέθοδοι εκχύλισης εφαρμόζονται στη φύση της πηγής όσον αφορά την επιλεκτικότητα της βιοδραστικής υπό διαφορετικές συνθήκες. Οι κοινοί στόχοι των μεθόδων εκχύλισης μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Για την εξαγωγή της αναλυτέας ουσίας από τη σύνθετη μήτρα
- Αύξηση της επιλεκτικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου
- Μετατροπή αυτών των ενώσεων σε απλούστερη μορφή παρέχοντας ποσοτική και ποιοτική ανάλυση
- Ενίσχυση της δυνατότητας αναπαραγωγής της μελέτης ανεξάρτητα από τις μεταβλητές που σχετίζονται με τη σύνθεση του δείγματος (Koçak & Pazır, 2018)

5.2 Οι κυριότερες τεχνικές Εκχύλισης

5.2.1 Οι κυριότερες συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης

Η ισχύς διαλυτοποίησης, η διαδικασία ανάδευσης και η θερμική σταθερότητα του αναλύτη αποτελούν τη βάση των συμβατικών τεχνικών εκχύλισης. Οι τεχνικές μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: υδρο-απόσταξη, εκχύλιση με διαλύτη και εκχύλιση Soxhlet (Koçak & Pazır, 2018).

5.2.1.1 Εκχύλιση Soxhlet

Εκχύλιση Soxhlet: Η τεχνική αυτή, η οποία δημιουργήθηκε αρχικά το 1879 από τον Franz Ritter Von Soxhlet για την εκχύλιση λιπιδίων από φυτικά υλικά, χρησιμοποιείται συχνά σε πρόσφατες μελέτες για την εκχύλιση βιοδραστικών. Για τη σύγκριση των διαφορετικών διαδικασιών, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση στις νέες τεχνικές εκχύλισης. Μετά από κάθε κύκλο αναρροής του διαλύτη, το δείγμα χρησιμοποιείται επανειλημμένα με νέο διαλύτη σύμφωνα με την αρχή της εκχύλισης Soxhlet (SOE), η οποία ακολουθείται από την εξάτμιση του διαλύτη σε υψηλή θερμοκρασία και τη συμπύκνωση. Αυτή είναι μία από τις πιο πλεονεκτικές πτυχές αυτής της διαδικασίας, καθώς σε κάθε κύκλο, ο διαλύτης με εξαιρετικά υψηλή καθαρότητα εξατμίζεται πριν συμπυκνωθεί για να εξαχθεί το στερεό δείγμα. Ως αποτέλεσμα, η απόδοση της SOE σε εκχύλιση είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να παραχθεί με την παραδοσιακή εκχύλιση στερεού υγρού. Ένας περιστροφικός εξατμιστής μπορεί να εξατμίσει εύκολα τον διαλύτη στο τέλος της διαδικασίας για την εξαγωγή του φυτικού ελαίου. Ακολουθεί κατάλογος των πρόσθετων πλεονεκτημάτων της SOE:

- Δεν υπάρχει απαίτηση διήθησης
- Υψηλοί ρυθμοί μεταφοράς θερμότητας από το δοχείο απόσταξης και τη θερμοκρασία εκχύλισης

Από την άλλη πλευρά, διάφορα μειονεκτήματα των κρατικών επιχειρήσεων μπορούν να απαριθμηθούν ως εξής:

- Υπερβολική κατανάλωση διαλυτών
- Αποικοδόμηση ευπαθών στη θερμότητα αναλυτών
- Μακρύς χρόνος εκχύλισης
- Έλλειψη διαδικασίας ανάμιξης
- Δυσκολία στην εξάτμιση τεράστιων ποσοτήτων διαλυτών

(Koçak & Pazır, 2018)

5.2.1.2 Εκχύλιση με διαλύτη

Εκχύλιση με διαλύτη: Η εκχύλιση στερεού-υγρού (SLE) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στη μετανάστευση στερεών σωματιδίων σε υγρό με τις αρχές της διάχυσης και της μεταφοράς μάζας μετά από επεξεργασία με υγρό διαλύτη. Όταν ένας διαλύτης προστίθεται σε ένα δείγμα τροφίμου και το μείγμα ανακινείται καλά, τα στερεά σωματίδια απορροφούνται και διογκώνονται και τα διαλυμένα σωματίδια μετακινούνται αργά στον διαλύτη μέσω τριχοειδούς δράσης και διάχυσης. Η μεταφορά μάζας μπορεί να αυξηθεί με τη μεταβολή του οριακού στρώματος, της βαθμίδας συγκέντρωσης και του συντελεστή διάχυσης. Η μεταφορά μάζας μπορεί να αυξηθεί αλλάζοντας το οριακό στρώμα, τη βαθμίδα συγκέντρωσης και τον συντελεστή διάχυσης. Η απόδοση της εκχύλισης είναι συνάρτηση των συνθηκών διεργασίας και εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την αναλογία στερεού προς υγρό (S/L), το μέγεθος των σωματιδίων και τη συγκέντρωση βιοδραστικών ενώσεων που πρέπει να εξαχθούν από

το φυτό. Εξάλλου, ο χρόνος εκχύλισης και το S/L θεωρούνται σημαντικές παράμετροι διεργασίας που επηρεάζουν την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων (PC) που εκχυλίζονται. Επιπροσθέτως, ο τύπος του διαλύτη ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της βιολογικά δραστικής ένωσης. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι γνωστοί ως οξινοποιημένη μεθανόλη ή αιθανόλη. Η πολικότητα της αναλυόμενης ουσίας στόχου είναι ένας από τους πιο κρίσιμους παράγοντες για την επιλογή ενός κατάλληλου διαλύτη. Εν τω μεταξύ, ο διαλύτης με την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης είναι η μεθανόλη. Ωστόσο, η μεθανόλη αποφεύγεται στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της τοξικότητάς της, επομένως η αιθανόλη προτιμάται στη διαδικασία εκχύλισης. Οι τύποι διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών παρατίθενται στον **Πίνακα 19**.

Πίνακας 19: Τύποι διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση βιοδραστικών (Koçak & Pazır, 2018)

Φαινολική ένωση	Διαλύτης
Φαινολικά οξέα, φλαβονόλη, ανθοκυανίνη	Οξικός αιθυλεστέρας
Ανθοκυανίνη, κατεχίνη, φαινολικά οξέα, φλαβονόλη, φλαβονόλη, φλαβόνη, προκυανιδίνη, ελλαγικό οξύ, ρουτίνη, χλωρογενικό οξύ	Υδατικά μείγματα μεθανόλης με διαφορετικές αναλογίες όγκου (50-90% v/v)
Ανθοκυανίνη, φλαβονόλες, ελεύθερα φαινολικά οξέα	Υδατικά μείγματα αιθανόλης με διαφορετικές αναλογίες όγκου (10-90% v/v)
Φλαβονόλη, Ελεύθερα φαινολικά οξέα	Χλωροφόρμιο
Φλαβονόλες, φαινολικά οξέα	διαιθυλαιθέρας
Προανθοκυανιδίνες, φαινολικά οξέα	Καντό νερό στους 80-100°C
Φλαβονόλες, φαινολικά οξέα, υδροξυκινναμωμικό οξύ, κουμαρίνη, φλαβονόλη, ξανθόνες	Υδατικά μείγματα ακετόνης με διαφορετικές αναλογίες όγκου (10-90% v/v)
Τανίνες και δεσμευμένα φαινολικά οξέα	NaOH (2-10 M)
Ελευρωπαΐνη, ρουτίνη και άλλες πολυφαινόλες (φύλλα ελιάς)	Υδατικά μείγματα ακετόνης και αιθανόλης με διαφορετικές αναλογίες όγκου (10-90% v/v)

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, οι φαινόλες διαχωρίζονται με συστηματική και διαδοχική σειρά. Τα φαινολικά οξέα υπάρχουν στη μήτρα των τροφίμων τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή. Η εκχύλιση των ελεύθερων φαινολικών (φαινολικά οξέα, διαλυτοί εστέρες, διαλυτοί γλυκοζίτες) πραγματοποιείται σε υδατικά

μείγματα οργανικών διαλυτών. Τα φαινολικά οξέα μπορούν επίσης να σχηματίσουν σύμπλοκα που δεσμεύονται στο κυτταρικό τοίχωμα ως αδιάλυτοι εστέρες ή γλυκοζίτες. Αυτές οι δομές μετατρέπονται απλώς στην ελεύθερη μορφή με αλκαλική, όξινη ή και ιδίου τύπου ταυτοχρόνως υδρόλυση.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) είναι η μέθοδος επεξεργασίας υγρών ικανής να διαλύσει μία ή περισσότερες συγκεκριμένες ενώσεις με έναν σε μεγάλο βαθμό μη αναμιγνύόμενο διαλύτη. Ως εκ τούτου, η εκλεκτικότητα του υγρού διαλύτη είναι σημαντική λόγω των διαφορών πυκνότητας. Στο τέλος της εκχύλισης παρατηρούνται δύο διαφορετικές φάσεις. Η πρώτη φάση, που ονομάζεται εκχύλισμα, περιέχει τις ενώσεις-στόχους, ενώ η δεύτερη φάση, που ονομάζεται ραφινάτο, αποτελείται από υπολείμματα που περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων-στόχων. Η μέθοδος αυτή είναι γενικά κατάλληλη για τη λήψη ΒΑ από υγρά υποπροϊόντα της βιομηχανίας ποτών. Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος της διαδικασίας λόγω της χρήσης ακριβών και τοξικών διαλυτών και οι διεργασίες που απαιτούνται για την απομάκρυνση των μη φαινολικών ενώσεων (τερπένια, χλωροφύλλη και κεριά). Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και ο βαθμός αποικοδόμησης των φαινολικών ουσιών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από διάφορες μεταβλητές της διαδικασίας, όπως η θερμοκρασία, η παρουσία φωτός και αέρα, ο χρόνος ανάδευσης, ο χρόνος φυγοκέντρωσης και ο χρόνος εξάτμισης (Koçak & Pazır, 2018).

5.2.1.3 Υδρο-απόσταξη

Η υδρο-απόσταξη είναι μια παραδοσιακή διαδικασία για την εξαγωγή βιοχημικά ενεργών ουσιών και αιθέριων ελαίων. Στις βιομηχανικές εφαρμογές πραγματοποιείται με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

- a.** Απόσταξη με απεσταγμένο νερό
- b.** Απόσταξη με ατμό
- c.** Άμεση απόσταξη με ατμό.

Σε αυτή τη μέθοδο, το δείγμα τοποθετείται σε κλειστό δοχείο. Στη συνέχεια, στο δοχείο αυτό προστίθεται απεσταγμένο νερό σε επαρκή ποσότητα ώστε το μείγμα να φτάσει σε βρασμό. Εναλλακτικά, σε αυτό το στάδιο μπορεί να εισαχθεί ατμός. Το ζεστό νερό και ο ατμός βοηθούν στην απελευθέρωση του βιοδραστικού από τον φυτικό ιστό. Με την έμμεση ψύξη με νερό, το μείγμα νερού-ατμού-πετρελαίου συμπυκνώνεται και το μείγμα αυτό ρέει αυτόματα από τον συμπυκνωτή στον διαχωριστή, όπου το έλαιο και το βιοδραστικό διαχωρίζονται από το νερό. Η υδροαπόσταξη έχει τρία στάδια: την υδρο-διάχυση, την υδρο-απόσταξη και την θερμική υδρόλυση. Ως εκ τούτου, οι υψηλές θερμοκρασίες εκχύλισης μπορεί να οδηγήσουν στην απώλεια ορισμένων πτητικών ενώσεων (Koçak & Pazır, 2018).

Πίνακας 20: Μελέτες που εστιάζουν στην εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά με συμβατικές μεθόδους (Koçak & Pazır, 2018)

Μέθοδος	Αναλυτέα Χημική ουσία	Φυτό προέλευσης	Συνθήκη	Αποτέλεσμα
SLE-αλκαλική υδρόλυση	Φαινολικά οξέα	Άμπελος	Επεξεργασία με 3% H ₂ SO ₄ στους 130°C για 15 λεπτά. Επεξεργασία με 4-12% NaOH (w/w) για 30-120 λεπτά στους 50-130°C	Φερουλικό οξύ: 25,7-141 mg/L p-κουμαρικό οξύ: 15,5-31,5 mg/L Γαλλικό οξύ: 2,5-164,6 mg/L
SLE-Οξίνη μαζί με αλκαλική υδρόλυση	Φαινολικά οξέα που απελευθερώνονται από διαλυτούς εστέρες και διαλυτούς γλυκοζίτες	Σιτάρι, σικάλη, τριτικάλε	Ανάμιξη με 80% μεθανόλη στους 80°C για 15 λεπτά. προσθήκη 6 M HCl σε pH=2, διαλύοντας το εναίωρημα σε 2 M NaOH υπό N ₂ . απομόνωση ελεύθερων φαινολικών ουσιών με διαιθυλαιθέρα στους 100°C επί 1 h υπό N ₂	Τα καφεϊκά, p-κουμαρικά, φερουλικά και σιναπικά οξέα ανιχνεύθηκαν με HPLC Η πλειοψηφία των ελεύθερων φαινολικών βρίσκεται υπό μορφή διαλυτών εστέρων
SLE, SOE	Φλαβονοειδή	Αραβόσιτος	SLE: Μεθανόλη (60% v/v) για 24 ώρες στο σκοτάδι SOE: 95 °C-30 λεπτά με μεθανόλη (60% v/v)	Ολική ανάκτηση φλαβονοειδών SLE (%95)- SOE (%80)
SOE	Ισοφλαβόνες	Σόγια	Βρασμός με διμεθυλοσουλφοξείδιο: ακετονιτρίλιο: νερό(5:58:37, v/v/v) για 3 ώρες και στη συνέχεια έκπλυση του υπολείμματος δύο φορές με το ίδιο διάλυμα	Οι ανακτήσεις των εκχυλίσεων Soxhlet είναι στο 73,2% συγκριτικά με την εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους και 68,3% συγκριτικά με την επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη
Υδρο-απόσταξη	Αιθέρια έλαια	Φύλλα Άγριας Μέντας (Pennyroyal)	50 g δείγματος εκχυλίστηκαν στη συσκευή Clevenger για 3 ώρες	Στην ανάκτηση του ελαίου με εκχύλιση βρέθηκαν μεγέθη σωματιδίων 0,7, 0,5 και 0,3 mm ως 2,74%, 2,49% και 2,11% αντίστοιχα
SLE-Οξίνη υδρόλυση	Φλαβονοειδή	Βότανα: <i>Rosadamasцена</i> , <i>Solidago virgaurea</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Camellia sinensis</i>	50% Μεθανόλη+1,2M HCl στους 80°C για 2 ώρες	Κουερσετίνη: 0,54-11,10 mg/g καεμφερόλη: 0,03 -14,80 mg/g ισοραμνετίνη: 0,19-2,76 mg/g λουτεολίνη: 0,15 -2,36 mg/g Απιγενίνη: 0,27-2,05 mg/g Μυρικετίνη: 0,42-1,82 mg/g

				σε ξηρά δείγματα φυτών
--	--	--	--	------------------------

5.2.2 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα [αγγλ.: **Microwave-assisted extraction (MAE)**]

Ονομάζεται εκχύλιση μικροκυμάτων, αποτελώντας συνδυασμό της εκχύλισης μικροκυμάτων και της κλασσικής εκχύλισης με διαλύτη. Η θέρμανση των διαλυτών και του φυτικού ιστού με τη χρήση μικροκυμάτων αυξάνει την κινητική της εκχύλισης, ονομάζεται εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Η θέρμανση σε αποξηραμένο φυτικό υλικό στοχεύει στα μικροσκοπικά ίχνη υγρασίας που υπάρχουν φυσιολογικά στα φυτικά κύτταρα. Η θέρμανση αυτής της υγρασίας μέσα στο φυτικό κύτταρο λόγω της επίδρασης μικροκυμάτων, έχει ως αποτέλεσμα την εξάτμιση και τη δημιουργία τεράστιας πίεσης στο κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα ωθείται με πίεση εκ των έσω με αποτέλεσμα τη ρήξη του. Έτσι συμβαίνει η αφυδάτωση δραστικών συστατικών από τα ρήξη κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την απόδοση των συνθετικών ύλης. (Ingle et al., 2017)

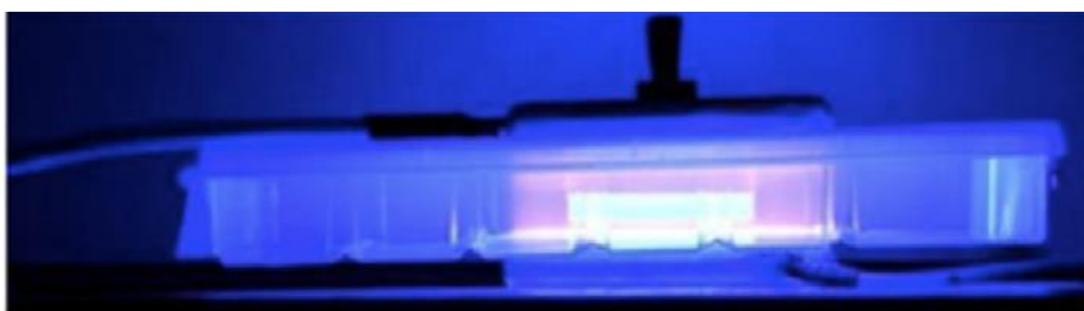


Εικόνα 14: Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (MAE) (Ingle et al., 2017)

5.2.3 Εκχύλιση μέσω ψυχρού πλάσματος [αγγλ.: **Cold plasma assisted extraction**]

Μια αναπτυσσόμενη πράσινη τεχνολογία για την ανάκτηση φυσικών ουσιών είναι η εκχύλιση με ψυχρό πλάσμα. Όταν ένα ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σε έναν παράγοντα αποστείρωσης, δημιουργείται ψυχρό πλάσμα. Είναι ένα μερικώς ιονισμένο αέριο που αποτελείται από ιόντα, ηλεκτρόνια, υπεριώδη φωτόνια και αντιδραστικές ουδέτερες ρίζες, όπως διεγερμένα και μόρια βασικής κατάστασης. Δεδομένου ότι το μέσο διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία και η ψύξη των ιόντων και των μη φορτισμένων μορίων θεωρείται πιο αποτελεσματική από τη μεταφορά ενέργειας από ηλεκτρόνια, η εξαγωγή με τη βοήθεια ψυχρού πλάσματος κατατάσσεται ως μη θερμική μέθοδος. Η εκχύλιση με ψυχρό πλάσμα δεν απαιτεί ακριβό θάλαμο αντίδρασης, επειδή μπορεί να λειτουργήσει σε πίεση αέρα ή σε χαμηλές πιέσεις. Η

κατανάλωση ενέργειας των συστημάτων εξαγωγής με ψυχρό πλάσμα, η οποία κυμαίνεται από 15 έως 900 W για πειραματικά συστήματα εργαστηριακής κλίμακας, θεωρείται επίσης ελάχιστη. Η εκχύλιση φυσικών χημικών ουσιών από φυτική μήτρα με τη χρήση ψυχρού πλάσματος έχει τεκμηριωθεί μόνο σε λίγες επιστημονικές έρευνες. Η γαλακτομαννάνη από το τριγωνέλλα και οι φαινολικές ενώσεις από τα στέμφυλα των σταφυλιών έχουν αναφερθεί πρόσφατα ότι εξαγονται με τη χρήση ατμοσφαιρικού ψυχρού πλάσματος υψηλής τάσης. Προτάθηκε ότι τα ιδιαίτερα δραστικά είδη καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, βελτιώνοντας τη μεταφορά μάζας και την εκχύλιση, προκαλώντας κυτταρική βλάβη. Προτάθηκε μια τεχνική που χρησιμοποιεί την εκχύλιση με ψυχρό πλάσμα και υπερήχους για την εξαγωγή φαινολικών συστατικών από το θαλάσσιο σπαράγγι *Salicornia peruviana* για χρήση στο ιταλικό σαλάμι (Picot-Allain et al., 2021).



Εικόνα 15: Εκχύλιση μέσω Ψυχρού Πλάσματος (Picot-Allain et al., 2021)

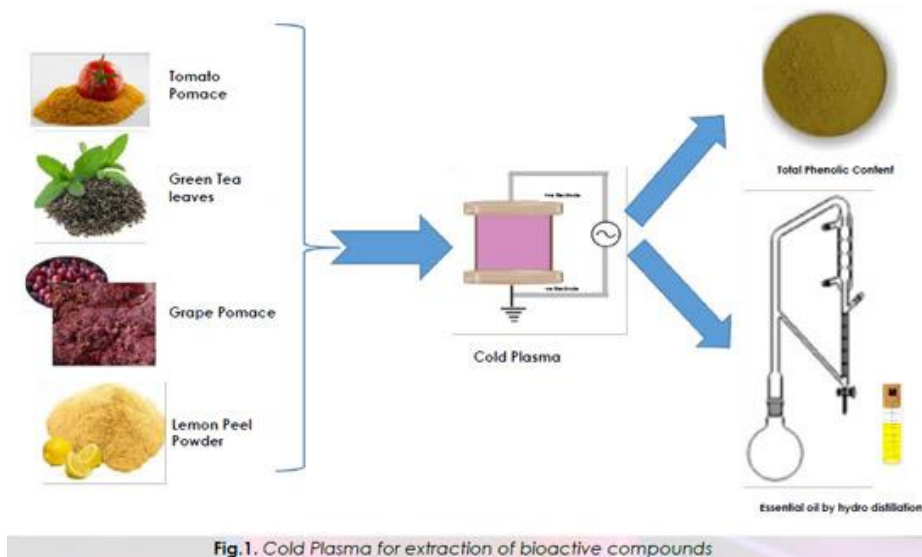


Fig.1. Cold Plasma for extraction of bioactive compounds

Διάγραμμα 8: Εκπόρευση της Εκχύλισης ψυχρού πλάσματος (Sangeetha Karunanithi et al., 2022)

5.2.4 Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού [αγγλ.: Supercritical Fluid Extraction (SFE)]

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE) περιλαμβάνει τη χρήση αερίων, συνήθως CO₂, και τη συμπίεση τους σε ένα πυκνό υγρό. Αυτό το υγρό αντλείται στη συνέχεια μέσω ενός κυλίνδρου που περιέχει το υλικό που πρόκειται να εξαχθεί. Από εκεί, το υγρό με

φορτίο εκχυλίσματος αντλείται σε θάλαμο διαχωρισμού όπου το εκχύλισμα διαχωρίζεται από το αέριο και το αέριο ανακτάται για επαναχρησιμοποίηση. Οι ιδιότητες διαλύτη του CO₂ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να ρυθμιστούν μεταβάλλοντας την πίεση και τη θερμοκρασία. Τα πλεονεκτήματα της SFE είναι ότι δεν έχουν απομείνει υπολείμματα διαλυτών καθώς το CO₂ εξατμίζεται εντελώς (Ingle et al., 2017).



Εικόνα 16: Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Ingle et al., 2017)

5.2.5 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχηση [αγγλ.: Ultrasound assisted extraction (UAE)]

Η ενίσχυση της εκχύλισης με υπερήχους έχει αποδοθεί στη διάδοση των κυμάτων πίεσης υπερήχων και των επακόλουθων φαινομένων σπηλαίωσης (δηλ. δημιουργία μικρών φυσαλίδων αερίου που αναπτύσσονται, ταλαντώνονται και καταρρέουν σε ένα υγρό ενόσω επηρεάζονται από κύματα υπερήχων (Shahidian et al., 2016)). Οι υψηλές δυνάμεις διάτμησης προκαλούν αυξημένη μεταφορά μάζας των εκχυλιστικών. Η κατάρρευση φυσαλίδων της σπηλαίωσης δημιουργεί μακρο-αναταράξεις, συγκρούσεις μεταξύ σωματιδίων υψηλής ταχύτητας και διαταραχή σε μικρο-πορώδη σωματίδια της βιομάζας που επιταχύνει τη διάχυση και την εσωτερική διάχυση. Επιπλέον, η σπηλαίωση κοντά στη διεπαφή υγρού-στερεού στέλνει ένα ταχέως κινούμενο ρεύμα υγρού μέσω της κοιλότητας στην επιφάνεια. Η σπηλαίωση στην επιφάνεια του προϊόντος προκαλεί πρόσκρουση από μικρο-πίδακες που έχουν ως αποτέλεσμα το ξεφλούδισμα της επιφάνειας, τη διάβρωση και τη διάσπαση των σωματιδίων. Αυτό το φαινόμενο παρέχει έκθεση νέων επιφανειών αυξάνοντας περαιτέρω τη μεταφορά μάζας. (Vilkhu et al., 2008) Καθώς μεγάλα κύματα υπερήχων πλάτους περνούν μέσα από ένα μέσο μάζας, η σπηλαίωση κατάρρευσης φυσαλίδων μπορεί να συμβεί σε κοντινή απόσταση ή στην επιφάνεια των φυτικών μεμβρανών προκαλώντας μικρο-καταγρήματα. (Toma et al., 2001) Η κατάρρευση σπηλαίωσης μπορεί να συμβεί στις επιφάνειες του φυτού, με αποτέλεσμα έναν μικρο-πίδακα που κατευθύνεται στη στερεή επιφάνεια. Η σπηλαίωση στις κυτταρικές επιφάνειες έχει την ικανότητα να τρυπά το

κυτταρικό τοίχωμα. Κατά προτίμηση, η μικρο-εκτόξευση θα συμβεί σε υδρόφιλες επιφάνειες σωματιδίων.

Η διακύμανση της απόδοσης εκχύλισης από διαφορετικές ποικιλίες φυτών μπορεί να προκύψει από τη δομή, τη σκληρότητα της δομής των σπόρων ή τις διαφορές στη σύνθεση που οδηγούν σε ποικίλους βαθμούς ευαισθησίας σε κύματα κλονισμού υπερήχων και πιθανότητα η φυσαλίδα σπηλαίωσης να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του φυτού προκαλώντας μικρο-εκτόξευση c). Παράγοντες όπως η περιστροφή των φυτικών ιστών και η κινητικότητα σωματιδίων όπως οι κόκκοι αμύλου εντός του κυτταροπλάσματος των κυττάρων αναμένεται να επηρεάσουν την ενεργειακή διασπορά υπερήχων και την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης.

Η επιλογή του διαλύτη βασίζεται συνήθως στην επίτευξη υψηλής μοριακής συγγένειας μεταξύ του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας. Όταν εφαρμόζεται επίσης υπερηχογράφημα, η σπηλαίωση θα επηρεαστεί από τις φυσικές ιδιότητες του διαλύτη. Η ένταση σπηλαίωσης μειώνεται καθώς αυξάνεται η τάση ατμών και η επιφανειακή τάση (Li et al., 2004)

Η υπερκρίσιμη εκχύλιση **διοξειδίου του άνθρακα** προτείνεται ως καλύτερη μέθοδος από την υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση για πολυφαινολικές ενώσεις. Πιστεύεται ότι η χαμηλότερη ανάκτηση κατεχίνης (που χρησιμοποιείται ως μέτρο της φαινολικής περιεκτικότητας) από τη μέθοδο υπερήχων θα μπορούσε να οφείλεται στην ανεπαρκή ισχύ του χρησιμοποιούμενου διαλύτη (υδατική μεθανόλη) ή λόγω της αποικοδόμησης των δειγμάτων κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Η μελέτη τους επικεντρώθηκε στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού (SFE) και όχι σε άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Τα αποτελέσματα της ανάκτησης κατεχίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης σε σύγκριση με έναν μάρτυρα (μόνο εκχύλιση με διαλύτη) δεν ήταν διαθέσιμα, επομένως δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί εάν η θεραπεία με υπερήχους (αν και είχε χαμηλότερη ανάκτηση σε σύγκριση με τη μέθοδο SFE) συνέβαλε στην αύξηση της ανάκτησης κατεχίνης σε σχέση με έναν έλεγχο. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι η συχνότητα των υπερήχων και άλλων συνθηκών εκχύλισης (π.χ. θερμοκρασία) δεν αναφέρθηκε, επομένως δεν ήταν γνωστό εάν χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες συχνότητες ή συνθήκες εφαρμογής. (Vilkhu et al., 2008)

5.2.6 Επιταχυνόμενη Εκχύλιση με Διαλύτη

Όταν η εκχύλιση πραγματοποιείται με διαλύτες σε θερμοκρασία και πίεση χαμηλότερη από τα κρίσιμα σημεία τους, η μέθοδος αυτή ορίζεται ως Accelerated Solvent Extraction (ελ: επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη, abv:ASE) ή Pressurized Liquid Extraction (ελ: υγρή εκχύλιση υπό πίεση, abv: PLE). Αυτή η μέθοδος παρέχει αποτελεσματική διεύδυση του διαλύτη στον φυτικό ιστό σε αυξημένη θερμοκρασία και πίεση υπό ατμόσφαιρα αζώτου και έτσι εμποδίζει την αποικοδόμηση φαινολικών ενώσεων.

Ο εξοπλισμός ASE αποτελείται βασικά από μια ηλεκτροβαλβίδα, ένα θερμοστατούμενο θάλαμο εκχύλισης, μια αντλία, μια μονάδα πίεσης και έναν συλλέκτη. Η ASE έχει αναφερθεί ως ανώτερη τεχνική σε σύγκριση με τη συμβατική

εκχύλιση με διαλύτη λόγω του μικρότερου χρόνου εκχύλισης και της μικρότερης κατανάλωσης διαλύτη.

Η αυξημένη πίεση οδηγεί στη σταθερή υγρή μορφή του διαλύτη, παρόλο που η θερμοκρασία υπερβαίνει το σημείο βρασμού του. Εξασφαλίζει επίσης την ταχεία επαφή του διαλύτη με τη μήτρα του τροφίμου με την κατάρρευση των φυσαλίδων στο δείγμα. Ωστόσο, θεωρείται ότι έχει μικρή επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης. Οι πρακτικές υψηλής θερμοκρασίας στην ASE βοηθούν στην επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων εκχύλισης μέσω δυνάμεων van der Waals, δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων μεταξύ δίπολων. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του διαλύτη και διευκολύνει τη διάχυση. Εκτός από τη θερμοκρασία και την πίεση, άλλοι παράγοντες όπως ο χρόνος εκχύλισης, η επιλογή του διαλύτη, ο ρυθμός ροής του διαλύτη, η ποσότητα του δείγματος, η θέση του αναλύτη στη μήτρα του τροφίμου, ο αριθμός των κύκλων εκχύλισης, ο τρόπος εκχύλισης (δυναμική ή στατική), ο τύπος και η αναλογία των τροποποιητών έχουν αντίκτυπο στην απόδοση της ASE. Επιπλέον, η σύνθεση του δείγματος, η περιεκτικότητα σε υγρασία της μήτρας τροφίμων, το μέγεθος των σωματιδίων, οι συνθήκες προεπεξεργασίας (ξήρανση, άλεση) ανήκουν στους παράγοντες που διέπουν την ASE. Μεταξύ όλων των κρίσιμων παραμέτρων, ο τύπος του διαλύτη και η θερμοκρασία αναφέρονται ως οι πρωτίστως αποτελεσματικοί παράγοντες για την ASE. Αναφορικά, οι λιγνάνες μπορούν να εκχυλιστούν αποτελεσματικά από φυτικό ιστό στους 125°C σε στατικό χρόνο 5 λεπτών, ο οποίος είναι σημαντικά συντομότερος σε σύγκριση με το SOE και το UAE (3 ώρες). Κατά την εκχύλιση των καροτενοειδών, η ASE αναφέρθηκε ως πιο αποτελεσματικό σύστημα εκχύλισης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, δεδομένου ότι απαιτούνται λιγότεροι όγκοι διαλύτη για μικρότερη περίοδο εκχύλισης. Έτσι, προτείνεται ως εναλλακτική λύση της SFE λόγω της ικανότητάς της να εκχυλίζει πολικές ενώσεις. Δεδομένου ότι η SFE είναι μια ικανοποιητική λύση για την εκχύλιση ΒΔ με μη πολικά χαρακτηριστικά και η χρήση ενός επιπλέον διαλύτη είναι απαραίτητη για την εκχύλιση πολικών ενώσεων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κανένας άλλος διαλύτης στην ASE.

Παράλληλα, μπορεί να επιτευχθεί ενισχυμένη μεταφορά μάζας και διαλυτότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες από το ατμοσφαιρικό σημείο βρασμού του διαλύτη. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 100 στους 250°C στα 20 MPa, παρατηρήθηκε ότι η διηλεκτρική σταθερά του νερού μειώθηκε σημαντικά, γεγονός που είναι εμφανές για τη μείωση της πολικότητας του διαλύτη πάνω από το σημείο βρασμού του σε σχέση με την πολικότητα του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, θα μπορούσε κανείς να περιμένει ότι όσο χαμηλότερη είναι η πολικότητα του διαλύτη, τόσο υψηλότερη είναι η διαλυτότητα. Το φαινόμενο της υψηλής διαλυτότητας μπορεί να σχετίζεται με τη χαμηλή διηλεκτρική σταθερά και τη χαμηλή πολικότητα του διαλύτη, δεδομένου ότι υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης επιτεύχθηκαν κατά την εργασία με πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως το χρυσένιο, η προπαζίνη και η χλωροταλονίλη. Όταν το απεσταγμένο νερό χρησιμοποιείται ως διαλύτης στην ASE, η πολικότητα του νερού εμπίπτει στην περιοχή 100-374°C και σε υψηλές πιέσεις. Χάρη σε αυτά τα

χαρακτηριστικά, μπορούν να παρασχεθούν ευνοϊκές συνθήκες που επιτρέπουν την εκχύλιση ενώσεων με υψηλή, μεσαία και χαμηλή πολικότητα. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται υποκρίσιμη εκχύλιση με νερό (Subcritical Water Extraction, abn:SWE). Οι παράγοντες που διέπουν τη SWE μπορούν να συνοψιστούν ως η μάζα του δείγματος, η σύνθεση του δείγματος, ο όγκος και ο ρυθμός ροής του διαλύτη, η θερμοκρασία, η πίεση και η διάρκεια της διεργασίας (Koçak & Pazır, 2018).

5.2.7 Εκχύλιση με τη χρήση ενζύμων

Η ιδιαιτερότητα του ενζύμου έχει αξιοποιηθεί για την εκχύλιση πολύτιμων ενώσεων από διάφορες φυσικές πόροι. Η μέθοδος εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων εμπίπτει στην κατηγορία των πράσινων τεχνολογιών εκχύλισης, καθώς περιλαμβάνει το πλεονέκτημα ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον (πίνακας 2). Η εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του μέσου pH, της θερμοκρασίας, του χρόνου θεραπείας και της επιλογής ενζύμων. Η επιλογή του σωστού ενζύμου εξασφαλίζει την εκχύλιση συγκεκριμένων ενώσεων από μια περίπλοκη μήτρα. Για παράδειγμα, η πηκτινάση βελτίωσε αποτελεσματικά την εκχύλιση μη εκχυλίσιμων πολυφαινόλων, όπως ενσωματωμένες πολυμερείς πολυφαινόλες/φαινολικές υψηλού / χαμηλού μοριακού βάρους, από γλυκό στέμφυλο κερασιού. Η πηκτινάση υδρολύει μακρομόρια πηκτίνης υψηλού μοριακού βάρους, εκθέτοντας έτσι παγιδευμένες πολυφαινόλες/φαινολικές ουσίες στη μήτρα του διαλύτη. Η εκχύλιση πρωτεΐνης από φύλλα ζαχαρότευτλων αυξήθηκε κατά 43,27% χρησιμοποιώντας εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα και αυτό σχετίζεται με τη δραστηριότητα της πηκτινάσης, της κυτταρινάσης και της ημικυτταρίνης που συμμετείχαν στη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και του μεσοκαρπίου. Τα ένζυμα, που χρησιμοποιούνται ως βιολογικά εργαλεία, βοηθούν στην απομόνωση ενώσεων υψηλής καθαρότητας. Το υψηλό κοστολόγιο των ενζύμων είναι ένας σημαντικός περιορισμός της εκχύλισης με τη βοήθεια ενζύμων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρακολούθηση του μέσου pH και της θερμοκρασίας είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της βέλτιστης ενζυμικής δραστηριότητας (Picot-Allain et al., 2021).

5.3 Περιγραφή της Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης

Ως εκχύλιση σε σημείο νέφωσης (CPE) ορίζεται η τεχνική όπου πραγματοποιείται ανάκτηση οργανικών ή ανόργανων ενώσεων από χημικά ή βιοχημικά σύνολα, εφαρμόζοντας μη επιβλαβή μέσα, όπως μη ιονικές ουσίες επιφανειοδραστικής δράσης που στοχεύουν στον διαχωρισμό από το διάλυμα σχηματίζοντας «νέφη», μετά από θέρμανση σε κρίσιμη θερμοκρασία ή ανώτερή της. Συνήθως τα επιφανειοδραστικά απορροφούνται ούτως ώστε να έρθουν σε επαφή μεταξύ τους οι δύο φάσεις. Με τον τρόπο αυτό, η πολική κεφαλή κατευθύνεται προς το υδατικό και η υδρόφοβη ουρά προς το λιπόφιλο μέρος.

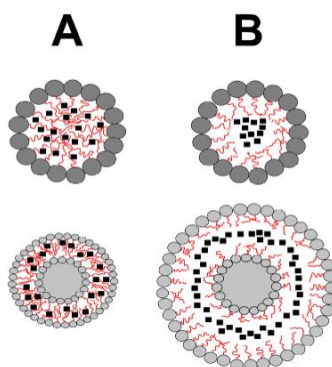
Αναλόγως των συνθηκών του επιφανειοδραστικού και του διαλύματος, διακρίνεται ποικιλία στο σχήμα των μικκυλίων από τραχιά σφαιρική έως ελλειψοειδή. Το πλήθος των επιφανειοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχονται σε ένα μικκύλιο ονομάζεται βαθμός συσσωματωμάτων (nagg). Ο εν λόγω αριθμός, εξαρτάται του τύπου της επιφανειοδραστικής ουσίας, του τρόπου σχηματισμού των ομάδων που υπάρχουν, των

ιδιαιτεροτήτων και της συγκέντρωσης ηλεκτρολυτών, της φύσης του διαλύτη, της θερμοκρασία και του pH του διαλύματος.

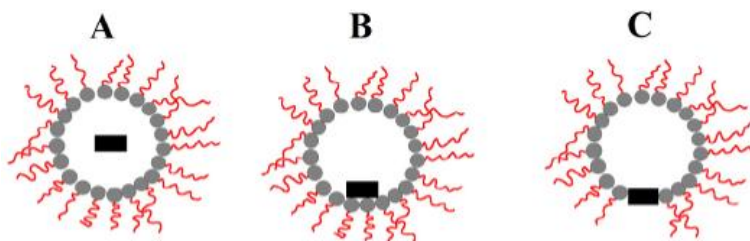
Αναλυτικότερα, κατά την εκπόνηση εκχύλισης CPE, εντάσσεται στο δείγμα μικκυλιακή, δηλαδή πλούσια σε επιφανειοδραστικές ουσίες, φάση η οποία προκύπτει από ομοιογενές διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας. Ένας μη ιονικός πυρήνας προκύπτει ως αποτέλεσμα των ουρών υδρογονανθράκων στο κέντρο σε ένα μικκύλιο (Melnik et al., 2015). Έπειτα, οι βιοχημικά ενεργές ενώσεις διαχωρίζονται στο υδρόφοβο κέντρο των μικκυλίων. Όταν οι προαναφερθείσες ουσίες θερμανθούν, παράγεται «νέφος». Συνεπακόλουθα, αυτά τα νέφη αποδίδουν δύο συνυπάρχουσες ισότροπες καταστάσεις. Σε δεδομένη θερμοκρασία, που καλείται επίσης **θερμοκρασία σημείου νέφωσης (CPT)**, προκύπτει σχηματισμός εμπλουτισμένων με υδρόφοβα συσσωματώματα και υδρόφιλα μέρη καθώς υφίστανται φυσική αλλαγή στα ομοιογενή διαλύματα ουσιών και με τις δύο φάσεις. Εφόσον έλκονται, εμφανίζεται μία συνάθροιση ουσιών. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτός ο διαχωρισμός εξηγείται λόγω της ραγδαίας ανοδικής συσσωμάτωσης των μικκυλίων της επιφανειοδραστικής ουσίας, συναρτήσει της μεγέθυνσης της θερμοκρασίας ή οποιωνδήποτε άλλων σημαντικών παραμέτρων. Από αυτή τη δράση προκαλείται η ελαχιστοποίηση της περιοχής αποτελεσματικότητας όπου και ανήκει η πολική ομάδα στην επιφάνεια του μικκυλίου, με συνέπεια το μέγεθος του μικκυλίου να αυξηθεί τόσο ώστε μπορεί να θεωρείται στο σημείο νέφους έως το άπειρο, με αποτέλεσμα η φάση να διαχωρίζεται. Επειδή υψηλές θερμοκρασίες δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε βιοδραστικές ενώσεις προερχόμενες από τρόφιμα, λ.χ. βιταμίνες, τοκοφερόλες ή άλλα αντιοξειδωτικά, η θέρμανση γίνεται σε ήπιες θερμοκρασίες, επειδή αποφεύγεται η χρήση τοξικών και επιβλαβών χημικών μέσων (Argy et al., 2019).

Ανάλογα με τις συγκεκριμένες συνθήκες επιφανειοδραστικής ουσίας και διαλύματος, τα μικκύλια μπορούν να μορφοποιηθούν σε μια ποικιλία σχημάτων, που κυμαίνονται από περίπου σφαιρικά έως ελλειψοειδή. Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός δεν είναι ακόμη σαφής. Μερικοί συγγραφείς έχουν προτείνει ότι οφείλεται σε αύξηση του αριθμού μικκυλιακής συνάθροισης (αύξηση του μικκυλιακού μεγέθους) όταν αυξάνεται η θερμοκρασία. Ο μηχανισμός του διαχωρισμού των φάσεων θα μπορούσε να πρόκυπτε από μια αλλαγή στις μικκυλιακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι απωθητικές σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά ελκτικές σε υψηλές θερμοκρασίες. Το φαινόμενο του σημείου νέφωσης βασίζεται στη διαδικασία απομάκρυνσης νερού που συμβαίνει στο εξωτερικό στρώμα μικκυλίων μη ιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών όταν αυξάνεται η θερμοκρασία. Η διηλεκτρική σταθερά του νερού μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθιστώντας τον χαμηλότερης δράσης για το υδρόφιλο μέρος των μορίων του επιφανειοδραστικού. Η πρόοδος της δημιουργίας μικκυλίων, συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού της ενθυσιαστικής και των παραγόντων που την επηρεάζουν, εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης. Άλλοι παράμετροι της CPE αποτελούν την CMC, τον αριθμός συσσωμάτωσης (ο αριθμός των μορίων επιφανειοδραστικής ουσίας ανά μικκύλιο) και τις πιο λεπτές δομικές πτυχές (βαθμός τραχύτητας ή ανωμαλίας της επιφάνειας,

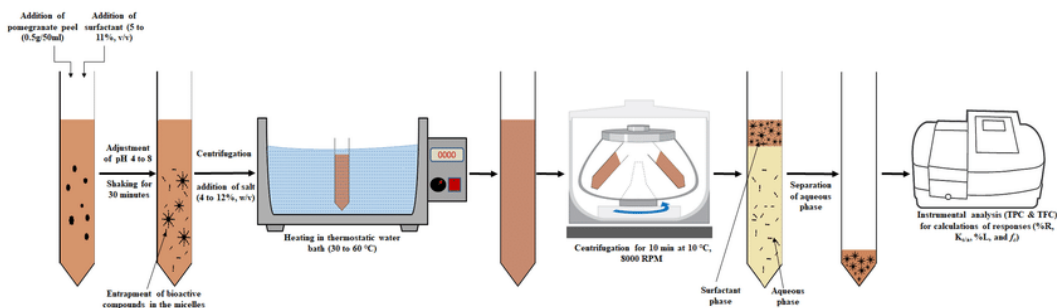
κατανομή μεγέθους και μεγέθους, επιφανειακή τάση κ.λπ.) ανάλογα με τη μικροδομή της μη ιονικής επιφανειοδραστικής ουσίας. Έχει αποδειχθεί ότι οι διαχωρισμοί φάσεων προκύπτουν από τον ανταγωνισμό μεταξύ της εντροπίας (η οποία ευνοεί την ικανότητα ανάμειξης των μικκυλίων στο νερό) και της ενθαλπίας (η οποία ευνοεί τον διαχωρισμό), και έτσι η διαδικασία θόλωσης και διαχωρισμού των φάσεων είναι αναστρέψιμη. Η αποκατάσταση των αρχικών συνθηκών διαλύματος οδηγεί τα μικκύλια να συγχωνευθούν με την υδατική φάση, αναπαράγοντας ένα ομοιογενές σύστημα (Gortzi et al., 2008).



Εικόνα 17: Πιθανές μέθοδοι διαλυτοποίησης σωματιδίων σε μικκύλια. *A* – διαλυτοποιημένα μόρια τοποθετημένα ακριβώς δίπλα στην υδρόφοβη αλυσίδα μικκυλίων, *B* – διαλυτοποιημένα μόρια που βρίσκονται μέσα στα μικκύλια για να σχηματίσουν μια ξεχωριστή φάση (Melnik et al., 2015)



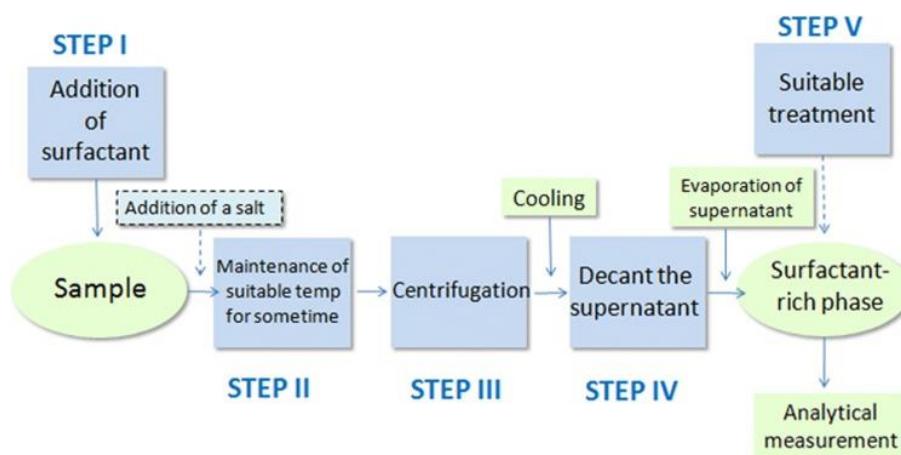
Εικόνα 18: Πιθανή θέση διαλυτοποιημένων μορίων χημικών ενώσεων σε αντίστροφα μικκύλια (Melnik et al., 2015)



Διάγραμμα 9: Διαδικασία εκπόνησης της CPE (Arya et al., 2019)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα κύρια βήματα για την εξαγωγή των σημείων νέφωσης. Παρατηρείται δυσκολία στην αφαίρεση της υδατικής φάσης στον

διαχωρισμό των μικκυλίων που περιείχαν απομονωμένες τις προς ανάλυση ουσίες. Παρ' όλα αυτά, αφού οι φάσεις διαχωριστούν, ψύχονται και έτσι το ιξώδες των μικκυλίων υφίσταται αύξηση, ενώ ύστερα, το υπερκείμενο υφίσταται μετάγγιση. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας όπου απομακρύνονται σωματίδια νερού διεκπεραιώνεται η εξάτμιση με τη βοήθεια ροής ουδέτερου αερίου (για παράδειγμα, άζωτο)(Arya et al., 2019).



Διάγραμμα 10: Κύρια σημεία στην εξαγωγή σημείων νέφωσης (Arya et al., 2019)

Ανάλογα με τους τύπους επιφανειοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση, τα χαρακτηριστικά του συστήματος μικκυλίων αλλάζουν. Διαφορετικοί τύποι συστημάτων επιφανειοδραστικών μικκυλίων συζητούνται εν συντομία(Arya et al., 2019):

1. Μη ιονικά μικκυλιακά μέσα: Η πολική αλυσίδα αυτού του επιφανειοδραστικού περιέχει υδρόφιλες ομάδες που σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με νερό. Οι κρίσιμες τιμές συγκέντρωσης μικκυλίων (CMC) των επιφανειοδραστικών ουσιών μπορούν να μεταβληθούν με πρόσθετα και βελτιωτικά. Ο διαχωρισμός φάσης θα συμβεί πάνω από τη θερμοκρασία του σημείου νέφους (CPT), η οποία αυξάνεται με τη μείωση της μοριακής μάζας και τη διακλάδωση της υδρόφοβης ουράς. Παρατηρείται ότι η CPT μειώνεται με την προσθήκη ουδέτερου ηλεκτρολύτη (θειικά, ανθρακικά) και πολικών οργανικών ενώσεων (αλειφατικές αλκοόλες, λιπαρά οξέα). Αντίθετα, η προσθήκη αλάτωσης σε άλατα τύπου (νιτρικά, θειοκυανικά) αυξάνει την CPT. Τα Triton X-45, Triton X-100 και Triton X-114 είναι μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μη ιοντικά μικκυλιακά μέσα.
2. Σύστημα μικκυλίων Zwitterionic επιφανειοδραστικών: Η συμπεριφορά του Zwitterionic επιφανειοδραστικού χρησιμοποιείται για εκχύλιση. Οι περισσότερες από αυτές τις επιφανειοδραστικές ουσίες υπάρχουν σε ισοτροπική φάση σε υψηλότερη θερμοκρασία και διαχωρίζονται κατά το χρόνο ψύξης. Εφαρμογή αλάτωσης σε άλατα τύπου μειώνουν τα CPT και η προσθήκη θεικών αλάτων αυξάνει τα CPT, η οποία είναι ακριβώς αντίθετη από τα μη

ιοντικά μικκύλια. Λεκιθίνη, οξείδια διμεθυλαλκυλοφωσφόνης, αμρνονοαιθυλοθειικά είναι μερικά από τα Zwitterionic επιφανειοδραστικά.

3. Συστήματα κυκλοδεξτρίνης: Αυτά τα μόρια έχουν υδρόφοβη κοιλότητα μέσα και υδρόφιλες μειονότητες έξω. Δεν υπάρχει απαίτηση ελάχιστης CMC για το σύστημα κυκλοδεξτρίνης λόγω της άκαμπτης δομής τους. Παρόμοια με το μη ιοντικό μικκυλιακό σύστημα, υπάρχουν σε ιστροπική φάση κάτω από τη CPT και στη θέρμανση πάνω από τη CPT διαχωρίζονται, αλλά ολόκληρη η διαδικασία χαρακτηρίζεται από βρόχο υστέρησης. Γενικά, τα παράγωγα της κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζουν διαχωρισμό φάσης. Ο-μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και περμεθυδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη παρουσιάζουν διαχωρισμό φάσης (Arya et al., 2019).

5.4 Εφαρμογές της CPE σε τρόφιμα

5.4.1 Υλοποίηση σε επεξεργασμένα τρόφιμα και φυτικά προϊόντα

Αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφέρει τη θεωρία και την εφαρμογή της τεχνολογίας σε σημείο νέφωσης, ωστόσο πολύ λίγη έμφαση έχει δοθεί στην εφαρμογή της CPE στην επεξεργασία τροφίμων. Ο κύριος στόχος είναι μια λεπτομερής ανασκόπηση της ευκαιρίας της CPE σε διάφορες διαστάσεις σε όλη την επεξεργασία τροφίμων. Μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στα πρόσφατα ερευνητικά ευρήματα που υπογραμμίζουν τα πλεονεκτήματα της CPE στην εξαγωγή, ανάλυση βιοδραστικών και άλλων συστατικών στα τρόφιμα.

Η CPE είναι μία από τις πολλά υποσχόμενες νέες τεχνολογίες για την εξαγωγή λειτουργικών εξαρτημάτων λόγω των ήπιων απαιτήσεων υπό όρους. Όντας μια πολλά υποσχόμενη τεχνική, αυτό μπορεί να συγχωνευθεί με την τεχνολογία τροφίμων για την αποτελεσματική εκχύλιση βιοδραστικών τροφίμων. Υπάρχουν αναφορές σχετικά με την τεχνική σημείων νέφωσης που χρησιμοποιείται ευρέως για την προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση διαφορετικών συστατικών στα τρόφιμα (Arya et al., 2019).

5.4.2 Απομόνωση Βιοδραστικών

Η ειδικότητα, η απόδοση, η χαμηλή θερμοκρασία και οι απαιτήσεις διαλυτών της CPE το καθιστούν αποτελεσματική τεχνολογία για εκχύλιση. Η απαίτηση θερμοευαισθησίας και καθαρισμού για την εκχύλιση βιοδραστικών είναι μία από τις προκλήσεις που αντιμετωπίζει η εκχύλιση των μεγάλων προκλήσεων που αντιμετωπίζει. Η CPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή αυτών των συστατικών με την προσθήκη προσθέτων για τη μείωση της CPT (Arya et al., 2019).

5.4.2.1 Εκχύλιση Βιοδραστικών από υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων

Την τελευταία δεκαετία, η βιοδραστική εκχύλιση με τη βοήθεια CPE δημιούργησε ενδιαφέρον μεταξύ των ερευνητών. Η χρήση της CPE για την εξαγωγή πολυφαινόλων από βιομηχανικά απόβλητα είναι ένας από τους σημαντικότερους τομείς μελέτης (Arya et al., 2019). Οι Παπαϊωάννου και Καραμπέλας (2012) μελέτησαν την εκχύλιση του λυκοπενίου από τα υπολείμματα φλούδας ντομάτας που συνήθως δημιουργούνται από τη βιομηχανία επεξεργασίας τομάτας. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης βελτιώθηκε με ενζυματικές προεπεξεργασίες. Διερεύνησαν 8 επιφανειοδραστικές

ουσίες για εκχύλιση και όπου βρήκαν ότι το SPAN 20 ήταν το πιο κατάλληλο με 6-7 βέλτιστες αναλογίες επιφανειοδραστικών μορίων ανά λυκοπένιο. Η απόδοση εκχύλισης λυκοπενίου βελτιώθηκε με ενζυματική προκατεργασία ακολουθούμενη από εκχύλιση υποβοηθούμενη από επιφανειοδραστική ουσία (Papaioannou & Karabelas, 2012).

Παρόμοιες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για την εκχύλιση φαινολών και καροτενοειδών από χυμό πορτοκαλιού ερυθράς σάρκας και λύματα ελαιολιβερίου με τη χρήση CPE. Οι συγγραφείς συνέκριναν την καταλληλότητα των tween 20 και 80, PEG 400 και span 20 για εκχύλιση. Tween 80 ανέκτησε τα μέγιστα εκχυλίσματα και διατήρησε υψηλή αντιριζική δράση. Η CPE δύο σταδίων διατήρησε φαινόλες έως και 94,4% από τα λύματα των ελαιολιβερίων, ενώ το 79,8% των συνολικών καροτενοειδών ανακτήθηκε από χυμό πορτοκαλιού κόκκινης σάρκας (Arya et al., 2019). Οι El-Abbassi et al. (2014) χρησιμοποίησαν επίσης τεχνικές CPE για τον διαχωρισμό φαινολικών ενώσεων από ελαιολιβερίο λυμάτων. Πριν από την εκχύλιση της CPE, ήταν εξαιρετικά φιλτραρισμένο περνώντας μέσα από μεμβράνη πολυαιθεροσουλφόνης 50 kDa. Η CPE ανέκτησε το 66,5% της φαινολικής περιεκτικότητας χρησιμοποιώντας επιφανειοδραστική ουσία (Triton X-100) όπου θερμάνθηκε πάνω από τη θερμοκρασία του σημείου νέφους. Η θερμική σταθερότητα των πολυφαινολών παρέμεινε ανεπηρέαστη με σταθεροποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιώντας εκχύλιση σημείου σύννεφων με υποβοήθηση αλάτισης με Tween 80 από φύλλα ελιάς, το οποίο είναι ένα υποπροϊόν που λαμβάνεται από τον καθαρισμό των καρπών ελιάς (El-Abbassi et al., 2014).

Η λάσπη κρασιού, η οποία είναι υποπροϊόν της ζύμωσης του κρασιού, είναι πλούσια σε πολυφαινόλες όπως οι προανθοκινιδίνες (Arya et al., 2019). Οι Χατζηλαζάρου και άλλοι (2010) ανέφεραν μια διαδικασία CPE για την απομάκρυνση των πολυφαινολών. Οι πολυφαινόλες ανακτήθηκαν από στέμφυλα κρασιού χρησιμοποιώντας επιφανειοδραστικές ουσίες όπως PEG 8000 και Genapol X-080. Το Genapol X-080 ανέκτησε το 75,8% των φαινολών από τη λάσπη, ενώ το PEG 8000 ανέκτησε το 95,8% (Chatzilazarou et al., 2010). Οι Vichapong et al. (2014) ανέπτυξαν τη διαδικασία CPE για την προετοιμασία δειγμάτων για ποσοτικοποίηση HPLC φαινολικών ενώσεων από επιλεγμένους τοπικούς οίνους της Ταϊλάνδης, όπου εμπλούτισε τη συγκέντρωση φαινολών (Vichapong et al., 2014).

Η ξανθοχουμόλη είναι πολυφαινόλη που έχει θετική επίδραση στην καρκινογένεση ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των αποτοξινωτικών ενζύμων και των προ-καρκινογόνων ενζύμων ενεργοποίησης. Ο λυκίσκος που χρησιμοποιείται στη μύρα είναι μια κύρια διατροφική πηγή. Η CPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή ξανθοχουμόλης από μύρα χρησιμοποιώντας Triton X-114 ως μέσο. Οι συγγραφείς βελτιστοποίησαν τη μέθοδο για την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης. Συνέστησαν τη διαδικασία CPE με γνώμονα τη χαμηλού κόστους και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική, η οποία δεν απαιτεί οργανικούς διαλύτες (Arya et al., 2019).

Οι Mohammadzadeh et al., 2018 ανέκτησαν 80% βεταΐνη από μελάσα τεύτλων χρησιμοποιώντας τεχνική εκχύλισης CPE τριών σταδίων υπό βέλτιστες συνθήκες, όπως συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας 0,5% (w/v), συγκέντρωση μελάσσας 27,5% (w/v), χρόνος επώασης 20 λεπτών στα 6,1 pH και 1,5% (w/v) επιφανειοδραστικής ουσίας. Η φύση της βεταΐνης είναι υδρόφοβη, οπότε διαλυτοποιήθηκε σε επιφανειοδραστική ουσία και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε pH 6. Υπήρξαν διάφορες αναφορές που έδειξαν ουδέτερες μορφές οργανικών ουσιών που εξάγονται κυρίως σε επιφανειοδραστική φάση συγκριτικά στις ιονισμένες μορφές. Επομένως, το pH θα πρέπει να ρυθμίζεται πριν από τη διεξαγωγή του βήματος CPE. Περαιτέρω πλούσια σε επιφανειοδραστικές ουσίες φάση πρέπει να ρυθμιστεί σε pH 2,5 και 40 λεπτά του χρόνου επώασης για να ανακτήσει 100% βεταΐνη ήταν λίγες προτάσεις από τους συγγραφείς (Mohammadzadeh et al., 2018).

Οι Kiai et al. (2018) ανέκτησαν φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιώντας την τεχνική CPE με τρεις διαφορετικές μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Triton X100, Genapol X-080 και Tween 80). Οι φαινολικές ενώσεις ανακτήθηκαν κατά 62% χρησιμοποιώντας 10% Tween 80, 65% χρησιμοποιώντας 10% Triton X100 και 68% χρησιμοποιώντας 10% Genapol X-080 σε βέλτιστες συνθήκες όπως 70 °C, pH 2 και 30 λεπτά χρόνου ισορροπίας. Η μικκυλιακή υδατική φάση ήταν λιγότερο υδρόφοβη από την πλούσια σε επιφανειοδραστικές ουσίες. Ο συγγραφέας παρατήρησε αυξημένο διαχωρισμό για τα καφεϊκά οξέα που είναι ένα υδρόφοβο μόριο. Αυτό οφειλόταν στο γεγονός ότι η πλούσια σε επιφανειοδραστικές ουσίες φάση ήταν ισχυρότερος δέκτης δεσμού υδρογόνου από τη χύδην φάση. Ως εκ τούτου, παρατηρήθηκε αυξημένος διαχωρισμός στην περίπτωση φαινολικών οξέων που είχαν υψηλότερη οξύτητα υδρογόνου (Kiai et al., 2018). Η λεπτομερής επισκόπηση της εφαρμογής της CPE στην εξαγωγή βιοδραστικών από την επεξεργασία τροφίμων σε διάφορα υποπροϊόντα παρουσιάζεται στον Πίνακα 13 (Arya et al., 2019).

Πίνακας 21: Επισκόπηση της εφαρμογής της CPE στην εξαγωγή βιοδραστικών από υποπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων (Arya et al., 2019)

Βιοενεργό εκχυλισμένο	Χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη	Τεχνολογία που χρησιμοποιείται - εξαγωγή μέσω	Συμπέρασμα
Λυκοπένιο	Υπολείμματα φλούδας τομάτας	Ενζυμικά υποβοηθούμενη CPE- SPAN 20	Απόδοση 4 φορές μεγαλύτερη από την EAE και 10 από την SLE)
Φαινόλες και καροτενοειδή	Χυμός πορτοκαλιού κόκκινης σάρκας και λύματα ελαιολαιού	CPE- Tween 80	Ανέκτησε έως και 94,4% διατηρώντας αντιοξειδωτική δράση
Φαινολικές ενώσεις	Λύματα ελαιολαιού	CPE με υπερδιήθηση - Triton X-100	Η υψηλότερη απόδοση στο 10% του Triton X-100 στους 90 °C

Πολυφαινόλες	Φύλλο ελιάς	CPE- Tween 80- Genapol X-080 and PEG 8000	Εκχυλίζεται χωρίς να επηρεάζεται η αντιοξειδωτική δράση
Πολυφαινόλες	Λάσπη κρασιού	CPE- Triton X-114	Υψηλές τιμές ανάκτησης φαινόλης (75,8% και 98,5%)
Φαινολικές ενώσεις	Ταϊλανδέζικα τοπικά κρασιά	CPE	15πλάσιος εμπλουτισμός
Ξανθοχουμόλη	Μπύρα	CPE- Triton X-114	Αυξημένη θερμική σταθερότητα χωρίς να επηρεάζεται η δραστηριότητα του AOX
Θυμόλη	Σπόροι Ajwain	SPAN 80 επιφανειοδραστική ουσία	Η μέγιστη ανάκτηση θυμόλης που παρατηρήθηκε με την επιφανειοδραστική ουσία SPAN 80 σε σύγκριση με τα Triton X-100 και TWEEN 80

5.4.2.2 Εκχύλιση Βιοδραστικών από φυτά φαρμακευτικής δράσης

Τα φαρμακευτικά φυτά είναι μεγάλη πηγή βιοδραστικών. Συνήθως, το συστατικό που ενδιαφέρει τα φαρμακευτικά φυτά θα είναι το βιοδραστικό υπεύθυνο για τις φαρμακευτικές ιδιότητες.(Arya et al., 2019) Ο Huie (2002) εξέτασε διάφορες διαδικασίες εκχύλισης για βιοενεργό διαχωρισμό για ανάλυση. Τα τελευταία χρόνια, η εστίαση στην εκχύλιση βιοδραστικών από φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιώντας CPE αυξήθηκε λόγω των πλεονεκτημάτων της έναντι της συμβατικής εκχύλισης. Η ΚΠΦ μπορεί να υποβοηθηθεί για την απομόνωση της δαΐδαζεΐνης ισοφλαβαβόνης από το *Puerariae radix*. *Puerariae radix* χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του πονοκεφάλου, δυσκαμψία του καρπού, και της γρίπης, είναι επίσης γνωστό για αντιπυρετικές δράσεις και ασκεί ως ηρεμιστικό. Αυτές οι επιδράσεις οφείλονται στη δαΐδαζεΐνη, η οποία είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ως παρουσία συστατικών μήτρας στα εκχυλίσματα. Η CPE υποβοηθείται με υπερήχους για αποτελεσματική εκχύλιση. Χρησιμοποίησαν χλωριούχο νάτριο για τη διευκόλυνση του διαχωρισμού φάσης για προ-συγκέντρωση και αυτό αύξησε τον συντελεστή προ-συγκέντρωσης κατά 13. Η CPE έδειξε υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με τη μεθανόλη, το n-εξάνιο και το κυκλοεξάνιο (Huie, 2002).

H Ardisia japonica είναι ένας θάμνος και γνωστός στην Κίνα που περιέχει βιοδραστικό μόριο, δηλαδή τη βεργενίνη που είναι γνωστή για τις αντιελκωτικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιδιαβητικές, αντιαρρυθμικές και αντιβηχικές δραστηριότητές του (Arya et al., 2019). Η εκχύλιση βεργενίνης με τη βοήθεια CPE έχει διερευνηθεί από τους Xing και Chen (2013). Το Triton X-114 ήταν πολύ

αποτελεσματικό στην εκχύλιση και την προσυμπύκνωση της μπεργκενίνης. CPE συνδυάστηκε με υπερήχους για αποτελεσματική εκχύλιση (Xing & Chen, 2013). Οι Zhou et al. επικεντρώθηκαν επίσης στην ανάπτυξη της εκχύλισης και της προσυγκέντρωσης *δειγμάτων φύλλων Apocynum venetum* για ανάλυση φλαβονοειδών. Το φύλλο του βοτάνου είναι ένα δημοφιλές κινεζικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Χρησιμοποίησαν μικκυλιακό σύστημα μη ιονικής επιφανειοδραστικής ουσίας (βρωμιούχο κετυλο-τριμεθυλαμμώνιο και Genapol X-080) για εκχύλιση. Υπό βελτιστοποιημένες συνθήκες, η CPE θα μπορούσε να εμπλουτίσει και τα έξι φλαβονοειδή κατά 75 φορές (J. Zhou et al., 2015).

Όπως αναφέρθηκε στις παραπάνω ενότητες, ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης με CPE θα αυξήσει την απόδοση της εκχύλισης (Arya et al., 2019). Οι Tang et al. (2017) χρησιμοποίησαν CPE υποβοηθούμενο από μικροκύματα για διαχωρισμό αλκαλοειδών και φλαβονοειδών από *Crotalaria sessiliflora* χρησιμοποιώντας Triton X-100-NaCl-HCl που θα μπορούσε να διαχωριστεί αποτελεσματικά. Αυτό το βιοδραστικό χρησιμοποιείται συνήθως στη θεραπεία του καρκίνου όπως το δέρμα, οισοφάγος, και του τραχήλου της μήτρας. Τα φλαβονοειδή και τα αλκαλοειδή από το κινεζικό οσπριοειδές φυτό (*Crotalaria sessiliflora* L) που χρησιμοποιούνται συνήθως στη θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχουν εξαχθεί. Μια τεχνική εξαγωγής νεφών υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MACPE) χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την εξαγωγή και το διαχωρισμό αυτών των συστατικών (Tang et al., 2017).

Πίνακας 22: Επισκόπηση της εφαρμογής του ΚΠΦ στην εξαγωγή βιοδραστικών από φαρμακευτικά φυτά (Arya et al., 2019)

Εκχυλισμένο Βιοενεργό	Χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη	Τεχνολογία που χρησιμοποιείται - εξαγωγή μέσων	Πόρισμα
Δαιδαζεϊνική Ισοφλαβαόνη	<i>Puerariae radix</i>	CPE υποβοηθούμενη με υπερήχους - Genapol X-080	Υψηλότερη απόδοση σε σύγκριση με meOH, n-hex και cyclo-hex. 13 φορές αύξηση της προσυγκέντρωσης
Βεργενίνη	<i>Ardisia japonica</i>	CPE υποβοηθούμενη με υπερήχους - Triton X-114	Higher yield than methanol extraction
Φλαβονοειδή	φύλλο <i>Apocynum venetum</i>	CPE- Genapol X-080 και CTAB	Ο εμπλουτισμός έξι φλαβονοειδών ήταν μεγαλύτερος

Φλαβονοειδή και αλκαλοειδή	<i>Crotalaria sessiliflora L</i>	CPE με υποβοήθηση μικροκυμάτων- Triton X-100- NaCl-HCl	Τα φλαβονοειδή και τα αλκαλοειδή μπορούν να καθαριστούν από την κάτω και την ανώτερη φάση. 1,5 φορές υψηλότερη απόδοση από την HRE και UAE
----------------------------------	--------------------------------------	--	---

5.3.3 Ανάλυση συστατικών τροφίμων

Τα δείγματα τροφίμων είναι πολύ περίπλοκα ή αραιά για ανάλυση ή για άμεση ανάλυση. Επομένως, η προετοιμασία του δείγματος είναι απαραίτητη. Οι διαδικασίες προετοιμασίας δειγμάτων βελτιώνονται συνεχώς για υψηλότερη ανάκτηση και αναπαραγωγικότητα των αναλυτέων ουσιών. Η αποικοδόμηση των αναλυτέων ουσιών είναι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις κατά την προετοιμασία. Οι ήπιες συνθήκες, η ειδικότητα και οι χαμηλότερες απαιτήσεις των οργανικών διαλυτών στη CPE το καθιστούν μια τέλεια τεχνολογία για την εκχύλιση των αναλυτέων ουσιών από το δείγμα. (Arya et al., 2019)

5.4.4 Ανάλυση προσθέτων τροφίμων

Η ευαισθησία μιας μεθόδου εξαρτάται επίσης από τον συντελεστή εμπλουτισμού της διαδικασίας εκχύλισης. Η CPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον άμεσο εμπλουτισμό και την εξαγωγή των αναλυτέων ουσιών από το δείγμα (Arya et al., 2019). Διαδικασία υποβοηθούμενη από CPE που εφευρέθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κιτρικών αλάτων στη μήτρα τροφίμων. Οι Pourreza et al. 2016 προσδιόρισαν τα κιτρικά άλατα στα τρόφιμα συνδυάζοντας νανοσωματίδια κουρκουμίνης με επιφανειοδραστική ουσία Triton X-100, η οποία υποβοηθείται μέσω εκχύλισης υπερήχων. Η βασική αρχή της ανάλυσης είναι παρουσία ιόντων Fe^{3+} , τα νανοσωματίδια κουρκουμίνης σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που μπορεί να αναλυθεί θερμιδομετρικά. Κιτρικό ιόν το οποίο όταν εκχυλίζεται σε μη ιονική επιφανειοδραστική φάση θα σχηματίσει νέο σύμπλοκο με σύμπλοκο νανοσωματιδίων κουρκουμίνης- Fe^{3+} , το οποίο με τη σειρά του μειώνει την απορρόφηση του συμπλόκου νανοσωματιδίων κουρκουμίνης- Fe^{3+} (Pourreza et al., 2016).

Οι Altunay et al. (2017) ανέπτυξαν μια αποτελεσματική μέθοδο για την εκτίμηση της μαλτόλης ως ενισχυτή γεύσης, η οποία εξάγεται με τη χρήση υπερήχων-CPE και αναλύεται μέσω φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης φλόγας. Σε pH 6,5, η μαλτόλη μετατρέπει το Cu (II) σε Cu (I) που μετρά την ανησυχία της ανάλυσης. Το Cu (I) και η βαθοκουπροΐνη (BCP) εκχυλίστηκαν εύκολα και γρήγορα στη μικκυλιακή φάση του Tween 80 χρησιμοποιώντας υπερήχους με την παρουσία ενός ανιονικού επιφανειοδραστικού όπου το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) αλληλεπιδρά επιλεκτικά. Διάφορα τρόφιμα και ποτά όπως μαύρη σοκολάτα και ποτά με γεύση φρούτων (χυμός λεμονιού, χυμός σταφυλιού και χυμός μήλου) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση

της μαλτόλης που δείχνει αυτή την επιλεκτικότητα και την ευαισθησία για τον γρήγορο, ακριβή και αξιόπιστο προσδιορισμό (Altunay et al., 2017).

5.5 Πλεονεκτήματα, περιορισμοί και προοπτικές εφαρμογής της CPE

Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας εκχύλισης είναι (Melnik et al., 2015):

1. Η κατάργηση ορισμένων διαδικασιών που απαιτούνται για τη συμβατική τεχνική εκχύλισης όπως ο καθαρισμός του εκχυλίσματος, η συμπύκνωση, ο πρόσθετος καθαρισμός κ.λπ.
2. Μη τοξική επιφανειοδραστική ουσία
3. Απαίτηση μικρότερης ποσότητας χημικών ουσιών
4. Δυνατότητα ταυτόχρονης εκχύλισης πολλαπλών ενώσεων
5. Δυνατότητα ήπιων συνθηκών εκχύλισης (χαμηλή θέρμανση, ήπιο pH, ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση κ.α.)
6. Χαμηλότερη πιθανότητα σχηματισμού γαλακτώματος κατά την εκχύλιση
7. Συμβατότητα με ευρύ φάσμα τροφίμων

Από την άλλη, οι περιορισμοί της CPE περιλαμβάνουν:

1. Όριο στην ανίχνευση αναλυτών ουσιών λόγω πολυπλοκότητας των επιφανειοδραστικών
2. Χαμηλότερη απόδοση στην εκχύλιση πολικών συστατικών από μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες
3. Απαίτηση περαιτέρω επεξεργασίας του εκχυλίσματος πριν από την ανάλυση
4. Περιορισμοί θερμοκρασίας για διαχωρισμό φάσεων κατά την εξαγωγή θερμικά ασταθών εξαρτημάτων
5. Δυσκολία στον αυτοματισμό

(Melnik et al., 2015)

5.7 Αξιολόγηση των τεχνικών εκχύλισης των βιοδραστικών τροφίμων

Όταν πρόκειται για μια συνολική αξιολόγηση, θα πρέπει προφανώς να επισημανθεί ότι οι νέες μέθοδοι εκχύλισης τείνουν να μειώνουν το λειτουργικό κόστος εξοικονομώντας χρόνο και διαλύτη. Τεχνολογίες όπως οι Solid-Liquid Extraction, Hydro-Distillation και Soxhlet Extraction μπορεί να χρειαστούν ώρες, ακόμη και μια ημέρα, για να εξαγάγουν πλήρως το βιοδραστικό από τη μήτρα του τροφίμου. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθεί όξινη ή αλκαλική επεξεργασία, η οποία συνεπάγεται σοβαρότερη περιβαλλοντική ρύπανση και διάθεση αποβλήτων. Από την άλλη πλευρά, η ιδιαιτερότητα της αναλυόμενης ουσίας, ο στόχος της μελέτης (αν αποσκοπεί στον προσδιορισμό της μέγιστης απόδοσης εκχύλισης, της μεγάλης ποικιλίας των ΒΑ, της ελάχιστης αλλοίωσης στη μήτρα του τροφίμου και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ή όχι) και η σκοπιμότητα της τεχνικής θα πρέπει να είναι σε συμφωνία μεταξύ τους. Η Accelerated Solvent Extraction μπορεί να επιλεγεί για την εκχύλιση των φλαβονοειδών σε σχέση με τις αποδόσεις εκχύλισης. Το συνολικό κόστος της εξόρυξης μπορεί να ομαδοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, το κόστος επένδυσης και το λειτουργικό κόστος. Επιπλέον, η απόδοση της εκχύλισης ανά μονάδα

μάζας δείγματος επηρεάζει σημαντικά το συνολικό κόστος. Η βοήθεια της μηχανικής ανάδευσης παρέχει μια πιο ομοιόμορφη δομή του εκχυλίσματος και έτσι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Ωστόσο, η κατανάλωση ενέργειας και διαλυτών, μια απαίτηση μετά τη διήθηση μπορεί να αυξήσει σημαντικά το κόστος επεξεργασίας. Επιπλέον, είναι προφανές ότι όσο υψηλότερη είναι η πίεση και η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερες είναι οι δαπάνες για ενέργεια και καθαρισμένα αέρια που καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της ASE ή της SFE. Εκτός αυτού, η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια θερμοευαίσθητων ενώσεων και, κατά συνέπεια, σε χαμηλότερες αποδόσεις εκχύλισης, γεγονός που αυξάνει το μοναδιαίο κόστος ανά δείγμα. (Kozak & Pazir, 2018).

Οι Picot-Allain et al., 2021 προτείνουν τη χρήση **συνδυασμένων** τεχνολογιών για την εκχύλιση από φυτά εδώδιμης ύλης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη συγχώνευση δύο τεχνικών εκχύλισης, λόγου χάριν εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE) μαζί με εκχύλιση υπό πίεση υγρού ή εφαρμογή μιας νέας και μίας συμβατικής μεθόδου, όπως εκχύλιση με υποβοήθηση μικροκυμάτων και υδρο-απόσταξη. Για παράδειγμα, η εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων έχει χρησιμοποιηθεί παράλληλα με άλλες τεχνικές εκχύλισης. Η ενζυματική εκχύλιση σε συνδυασμό με την υπερκρίσιμη εκχύλιση διοξειδίου του άνθρακα έχει χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συζευγμάτων ισοραμεντίνης του είδους *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν απελευθέρωσαν συζεύγματα ισοραμεντίνης από τη φυτική μήτρα, καθιστώντας την προσβάσιμη για εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Είναι σημαντικό να καθοριστούν και να επικυρωθούν οι στόχοι της συγχώνευσης τεχνολογιών χρησιμοποιώντας πειραματικές μεθοδολογίες, όπως αυξημένη απόδοση, μειωμένος χρόνος επεξεργασίας, μειωμένα λύματα, αυξημένη ποιότητα και λιγότεροι ή καθόλου διαλύτες. Συγκριτικά με το έλαιο καμέλιας, συστατικό που λαμβάνεται κυρίως μέσω εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού, η συνδυασμένη χρήση εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού και μοριακής απόσταξης απέδωσε έλαιο υψηλότερης ποιότητας (2.93 και 0,63 mg υδροξυ-ιδίου του καλίου/g ελαίου, για το έλαιο καμέλιας που λαμβάνεται από συνδυασμένη εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού/μοριακή απόσταξη, αντίστοιχα) (Picot-Allain et al., 2021).

Στον παρακάτω Πίνακα παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί των κάθε προαναφερθέντων μεθόδων οικολογικής εκχύλισης:

Πίνακας 23 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των τεχνικών "πράσινης" εκχύλισης βιοδραστικών φυτικής προέλευσης (Picot-Allain et al., 2021)

Green extraction technologies	Advantages	Limitations
Supercritical fluid extraction	✓ Η αυξημένη επιλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της διαλυτικής ισχύος του διαλύτη ελέγχοντας τη θερμοκρασία και την πίεση. το χαμηλό ιξώδες και ο υψηλός ρυθμός	✓ Υψηλό κόστος. ✓ πολύπλοκη διαμόρφωση του συστήματος. ✓ υψηλές επενδύσεις απαιτούμενου κεφαλαίου ✓ απαιτείται εκπαίδευση

Green extraction technologies	Advantages	Limitations
	διάχυσης των υπερκρίσιμων υγρών ενισχύει τη μεταφορά μάζας και την απόδοση, λειτουργώντας σε χαμηλές θερμοκρασίες και επιτρέποντας την ανάκτηση θερμικά ασταθών ενώσεων. ✓ Οι εκχυλισμένες ενώσεις μπορούν να ανακτηθούν με αποσυμπίεση παρουσία ολίγου ή καθόλου διαλύτη. ✓ Η SFE μπορεί να συζευχθεί με NMR ή GC-MS για χαρακτηρισμό ενώσεων. ✓ Οι εφαρμογές κυμαίνονται από εργαστηριακή κλίμακα (>1 g δείγματος), μέχρι και σε βιομηχανική κλίμακα (έως τόνους δείγματος). ✓ Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί (ανάγκη χρήσης φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών)	✓ κακή επιλεκτικότητα προς τις πολικές ενώσεις λόγω της χαμηλής πολικότητας του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα
Pressurized liquid extraction	✓ Σύντομος χρόνος εξόρυξης. ✓ απαιτείται μικρή ποσότητα διαλύτη. ✓ βελτιωμένη απόδοση	✓ Κόστος Εξοπλισμού ✓ Εκπαίδευση για τη χρήση
Microwave assisted extraction	✓ Σύντομος χρόνος εξόρυξης. ✓ χαμηλή κατανάλωση ενέργειας. ✓ ενισχυμένη απόδοση εκχύλισης ✓ χαμηλό κεφάλαιο που απαιτείται για τον εξοπλισμό	✓ Ανομοιόμορφη θέρμανση ή/και υπερθέρμανση του δείγματος που μπορεί να μειώσει την απόδοση της εκχύλισης ή να προκαλέσει θερμική αποδόμηση των φαινολικών οξέων. ✓ μη επιλεκτική. ✓ μικρό βάθος διείσδυσης του φούρνου μικροκυμάτων κατά την κλιμάκωση προς τα πάνω

Green extraction technologies	Advantages	Limitations
Solvent free microwave extraction	✓ Δεν απαιτείται διαλύτης ✓ ταχεία εκχύλιση ✓ υψηλής ποιότητας ενώσεις που λαμβάνονται από αρωματικά φυτά ✓ Διαδικασία καθαρού και ασφαλούς περιβάλλοντος	✓ Η διαλυτοποίηση είναι το περιοριστικό βήμα και η διαλυτότητα των στοχευμένων ενώσεων είναι μια ουσιαστική παράμετρος.
Ultrasound assisted extraction	✓ Χαμηλή ενεργειακή απαίτηση ✓ μικρότερος χρόνος εκχύλισης ✓ λιγότερος διαλύτης ✓ βελτιωμένη απόδοση εκχύλισης	✓ Μη επιλεκτική ✓ Η θερμότητα που παράγεται μπορεί να βλάψει την ασταθή θερμότητα ένωση ✓ γήρανση του οργάνου, μειωμένη ένταση των υπερήχων, μειώνοντας έτσι την αναπαραγωγικότητα
Cold plasma assisted extraction	✓ Αύξηση της απόδοσης εκχύλισης, δε χρησιμοποιούνται χημικά/διαλύτες. ✓ μη θερμική, οικονομική. ✓ Οικολογική μέθοδος	
Enzyme assisted extraction	✓ Υψηλή επιλεκτικότητα ✓ βελτιωμένη απόδοση ✓ οικολογική	✓ Τα ένζυμα είναι ακριβά. ✓ Αυστηρός έλεγχος του ουδέτερου pH και της θερμοκρασίας για τη βέλτιστη δράση των ενζύμων.

5.8 Διερεύνηση των παραμέτρων διεκπεραίωσης της CPE

Η ορθολογικότερη και αποτελεσματικότερη υλοποίηση ενός πρωτόκολλου εκχύλισης με CPE καθορίζεται από τις εφαρμοζόμενες συνθήκες και τον τύπο επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιείται. Οι Chatzilazarou et al., 2010 εφάρμοσαν την τεχνική σε παραπροϊόντα οινοποίησης (ιλύ κρασιού) για την εξαγωγή και ανάλυση των πολυφαινολών τους. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις διαφόρων παραμέτρων, όπως το pH και η θερμοκρασία, στην αποτελεσματικότητά της (πίνακες 16 & 17). Όταν ένα μη ιονικό υδατικό επιφανειοδραστικό διάλυμα θερμαίνεται πάνω από τη θερμοκρασία νέφωσης (CPT), το διάλυμα γίνεται θολό και διαχωρίζεται σε δύο φάσεις: μια ιζώδη επιφανειοδραστική φάση και μια υδατική φάση. Όταν η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών μορίων είναι πάνω από τις κρίσιμες τιμές συγκέντρωσης σχηματισμού μικκυλίων (CMC), σχηματίζονται αυθόρμητα συσσωματώματα κολλοειδών (μικκύλια) διαφόρων

σχημάτων και μεγεθών (ανάλογα με το δεδομένο επιφανειοδραστικό που εφαρμόζεται και τις συνθήκες του διαλύματος). Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για την εξήγηση αυτού του διαχωρισμού, όπως η αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις των μικκυλίων και οι διαδικασίες αφυδάτωσης. Ωστόσο, ο μηχανισμός διαχωρισμού δεν είναι ακόμη σαφής. Η πορεία που ακολουθείται για τη δημιουργία μικκυλίων, συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού ενθυλάκωσης και των παραγόντων που την επηρεάζουν, αποτελεί ακόμη θέμα διερεύνηση· οι παράμετροι CMC, ο βαθμός συσσωμάτωσης και η δομή εξαρτώνται από τη μικροδομή του μη ιονικού επιφανειοδραστικού. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι διαδικασίες νέφωσης και διαχωρισμού των φάσεων είναι **αντιστρεπτές**, ούτως ώστε τα μικκύλια να διασπείρονται ομοιογενώς στην υδατική φάση και σχηματίζουν **εκ νέου ένα ομογενές σύστημα** όταν αποκατασταθούν οι αρχικές συνθήκες του διαλύματος.

Η επίδραση του pH στην αποτελεσματικότητα της CPE εκτιμήθηκε ως εξής:

- i. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της ανακτηθείσας φαινόλης (Ps). Μελετήθηκαν στο εύρος pH 2,5-5,5 με τη χρήση 5% PEG 5000 και 2% Genapol X-080.
- ii. Παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό, στο V_s/V_w και στην ανάκτηση φαινολών από την οινολάσπη.
- iii. Η αλλαγή του pH επιτάχυνε την εκχύλιση για τις περισσότερες διαλυμένες ουσίες, με τις πιο σημαντικές αλλαγές στις πιο πολικές ενώσεις.
- iv. Οι ανακτήσεις φαινολικών και οι τιμές της συγκέντρωσης φαινολών στη διαχωρισμένη επιφανειοδραστική φάση (Ps) σε αυτή την περιοχή pH ήταν οι μέγιστες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι τιμές **pH=2,5-3,5**, για τη χρήση των PEG 8000 και Genapol X-080, είναι οι καταλληλότερες για τη διεκπεραίωση της CPE.

Η επίδραση του pH παρουσιάζεται στον **Πίνακα 24**.

Πίνακας 24: Επίδραση της τιμής pH στην απόδοση της CPE χρησιμοποιώντας 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 (Chatzilazarou et al., 2010)

pH	Ποσοστό ανάκτησης φαινολικών	V_s (όγκος μικκυλίων)/ V_w (όγκος υδατικού διαλύματος)	P_s (συγκέντρωση φαινολών στη διαχωρισμένη επιφανειοδραστική φάση)
PEG 800			
2.5	75.7	0.45	7.8
3.5	75.8	0.42	7.7
4	74.4	0.36	7.5
4.5	65.0	0.46	7.3
5.5	67	0.54	6.7
Genapol X-080			
2.5	60.2	0.35	6.3
3.5	63.6	0.31	6.6
4.0	60.1	0.52	6.4

4.5	57.3	0.59	6.0
5.5	54.9	0.63	5.8

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη διεργασία CPE στο εύρος θερμοκρασιών 25-65°C διερευνήθηκε με την εφαρμογή PEG 5000 και Genapol X-080 σε συγκεντρώσεις 5% και 2% αντίστοιχα. Η τιμή θερμοκρασίας των 55°C είναι η βέλτιστη για τη CPE καθώς συνεισφέρει στη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των φαινολών. Η εκχύλιση στη μίνιμουμ θερμοκρασία (25°C) θεωρήθηκε ανεπαρκής για την ανάκτηση πολυφαινολών, ενώ η υψηλότερη θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε (65°C) επέτρεψε τη διαδικασία, αν και με πολύ χαμηλότερο βαθμό απ' ότι οι άλλες τιμές. Από τις δύο τιμές θερμοκρασίας (45°C και 55°C) που χρησιμοποιήθηκαν, η τιμή της θερμοκρασίας των 55 °C επιλέχθηκε καθώς έδειξε τη μεγαλύτερη επιθυμητή επίδραση στη διαδικασία της CPE (και για τα δύο επιφανειοδραστικά). Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται θερμοκρασία **χαμηλότερη από 60 °C** για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των φαινολικών (Chatzilazarou et al., 2010). Η επίδραση της θερμοκρασίας παρουσιάζεται στον **Πίνακα 25**.

Πίνακας 25: Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της CPE χρησιμοποιώντας 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 (Chatzilazarou et al., 2010)

Θερμοκρασία (°C)	Ποσοστό ανάκτησης φαινολικών	V_s/V_w	P_s (συγκέντρωση φαινολών στη διαχωρισμένη επιφανειοδραστική φάση)
PEG 800			
25	0	-	-
45	71.1	0.20	10.3
55	82.4	0.21	11.3
65	65.0	0.23	6.2
Genapol X-080			
25	0	-	-
45	61.3	0.21	7.2
55	66.2	0.12	8.5
65	55.2	0.27	6.4

Οι παράμετροι: V_s/V_w , ο χρόνος που απαιτείται για το σχηματισμό μικκυλίων, το βέλτιστο pH, η %SC (περιεκτικότητα επιφανειοδραστικού) και η θερμοκρασία αποτέλεσαν τη βάση για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών για την εφαρμογή της CPE. Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης της φαινόλης από την οινολάσπη, χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες (pH 2,5, θερμοκρασία 55 °C και χρόνος 30 λεπτά για το PEG 8000 και pH 3,5, θερμοκρασία 55 °C και χρόνος 30 λεπτά για το Genapol X-080) σε κάθε στάδιο της CPE, με 5% PEG 8000 ή 2% Genapol X-080 να χρησιμοποιούνται στη διαδικασία CPE δύο σταδίων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 26: σε συνολική ενσωμάτωση 10% PEG 8000, η ανάκτηση φαινόλης με CPE διπλής επανάληψης ήταν 98,5%, ενώ το 4% του

Genapol X-080 έφτασε τιμές της τάξεως του 75,8%. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλές αναλογίες όγκου μεταξύ των φάσεων- το PEG 8000 αποδείχθηκε καλύτερο επιφανειοδραστικό από το Genapol X-080 για την απομάκρυνση πολυφαινόλων από την ιλύ οίνου. Ωστόσο, η ποσότητα του PEG 8000 που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερδιπλάσια από εκείνη του Genapol X-080. Η επιλογή του επιφανειοδραστικού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το κόστος στην αγορά (Chatzilazarou et al., 2010).

Πίνακας 26: Αποτελέσματα εφαρμογής CPE διπλής ανάκτησης σε οινολάσπη με χρήση 5% PEG 8000 και 2% Genapol X-080 σε κάθε βήμα σε ποσοστό ανάκτησης φαινόλης και της συγκέντρωσης φαινόλων στη διαχωρισμένη επιφανειοδραστική φάση (mg/L). (Chatzilazarou et al., 2010)

Βήμα CPE	Ποσοστό Ανάκτησης Φαινόλης	Vs /Vw	Ps
PEG 8000			
Πρώτο βήμα (5%)	88.6	0.2	6.6
Second step (5%)	98.5	0.3	5.7
Genapol X-080			
First step (2%)	65.8	0.1	5.6
Second step (2%)	75.8	0.1	5.1

Για την αξιολόγηση της μεθόδου, υπολογίστηκε η **%Ανάκτηση** των φαινολικών που απομονώθηκαν από το δείγμα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ανάκτηση}\% = \frac{C_s V_s}{C_o V_o} \times 100 = \frac{C_o V_o - C_w V_w}{C_o V_o} \times 100,$$

όπου Co: η συγκέντρωση φαινόλης στον όγκο από το αρχικό δείγμα (Vo), Cw: η συγκέντρωση φαινόλης στην υδατική φάση του όγκου (Vw) και Cs αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση φαινόλης στην επιφανειοδραστική φάση με όγκο Vs (Chatzilazarou et al., 2010 & Gortzi et al., 2008).

Όπως αναμενόταν, οι υγρές φάσεις παρουσίασαν χαμηλότερο βαθμό αντίδρασης από τα αρχικά μη επεξεργασμένα δείγματα και τις επιφανειοδραστικές φάσεις. Οι φαινόλες στην οινολάσπη που ανακτήθηκαν από μικκυλιακή διασπορά (μείγμα επιφανειοδραστικού & φαινόλων) είχαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, η ακριβής επίδραση της επιφανειοδραστικής ουσίας ως δεσμευτή ελευθέρων ριζών των ανακτηθέντων φαινόλων δεν μπορεί να αξιολογηθεί με βάση μόνο αυτές τις ενδεικτικές τιμές αναστολής και θα απαιτούσε αντικείμενο περεταίρω διερεύνησης μέσω διάφορων προηγμένων μεθόδων για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι φαινολικές ουσίες που ανακτήθηκαν μέσω των επιφανειοδραστικών είχαν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Η CPE είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση της εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) ή υγρό-στερεό (LSE) διαλύτη φαινόλων λόγω της απλότητάς της, των απαιτήσεων σε χαμηλό χρόνο εκπόρευσης, εξοπλισμού και τη χρήση μη τοξικών ουσιών. Η περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών CPE ή η χρήση άλλων επιφανειοδραστικών ουσιών θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η CPE προσφέρει μια

ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση έναντι άλλων τεχνικών απομόνωσης υποπροϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Με τη χρήση των βέλτιστων συνθηκών (βέλτιστη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών ουσιών, καθώς και βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας, pH, αριθμού επαναλήψεων) για κάθε επιφανειοδραστική ουσία (2 x 2% V/V της Genapol X-080 σε pH= 2,5, θερμοκρασία= 55 °C, χρόνος= 30 λεπτά ή 2 x 5% V/V της PEG 8000 σε pH = 3,5, θερμοκρασία= 55 °C, χρόνος = 30 λεπτά) επιτεύχθηκαν υψηλές τιμές ανάκτησης φαινολικών συστατικών (75,8% ή 98,5%, αντίστοιχα). Οι φαινόλες που ανακτήθηκαν διατήρησαν υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Τέλος, περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών CPE ή η χρήση άλλων επιφανειοδραστικών ουσιών θα μπορούσε να αυξήσει τιμές υψηλότερες από εκείνες που επιτεύχθηκαν στην παρούσα μελέτη και θα πρέπει να διερευνηθεί (Chatzilazarou et al., 2010).

Παρόμοια εφαρμογή του επιφανειοδραστικού Genapol X-080 είχε γίνει και σε παρελθόντα χρόνο για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών από λύματα ελαιουργίας (OMW) από τους Gortzi et al., 2008. Η τεχνική έχει αποδειχτεί ως η προτιμότερη, καθώς τα μη ιονικά (μικκυλιακά) συστήματα αξιοποιούν μη τοξικές επιφανειοδραστικές ουσίες (μη ιονικές, χωρίς διακλαδισμένες αλειφατικές αλυσίδες ή αρωματικά τμήματα), κατάλληλες για την απομόνωση αντιοξειδωτικών φυσικής προέλευσης (φαινόλες), τα οποία στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαιτητικές εφαρμογές, όπως στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων. Τα λύματα ελαιουργίας συνιστούν σοβαρό οικολογικό πρόβλημα στις μεσογειακές χώρες, λόγω της υψηλής έκτασης του ρυπογόνου φορτίου που φέρουν. Σε αυτό εμπεριέχονται βιοδιασπώμενες, δύστροπες και βιοστατικές ενώσεις. Η οργανική ύλη του OMW αποτελείται από ουσίες όπως πολυσακχαρίτες, σάκχαρα, πολυφαινόλες, πολυαλκοόλες, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, έλαια, καθώς και σημαντικές ποσότητες κολλοειδών. Παρά τους υφιστάμενους νόμους, συχνά απορρίπτονται, χωρίς επεξεργασία, είτε στο έδαφος είτε σε υδάτινα ρεύματα. Το φαινόμενο προκαλεί οικολογικά προβλήματα φυτοτοξικότητας (λόγω των πολυφαινολών), όπως καταστροφής καλλιεργειών, δυσοσμία, πολλαπλασιασμό αποικιών εντόμων, μόλυνσης των υπόγειων υδάτων, αύξησης της αλατότητας και μείωσης της διαπερατότητας του εδάφους, γεγονός που μειώνει τον βαθμό του πορώδους.

Το Genapol X-080 επιλέχθηκε για τους ακόλουθους λόγους:

- Ελάχιστη απορρόφηση στην περιοχή κοντά στα 280 nm (το πιο κοινό μήκος κύματος για γενική ανίχνευση φαινολικών με τη μέθοδο HPLC), και
- έλλειψη ανάγκης απομάκρυνσης λιπαρών ουσιών πριν από έναρξη της διαδικασίας CPE, δεδομένου ότι η ισοτριδεκυλική ομάδα του Genapol X-080 καθιστά την επιφανειοδραστική ουσία λιγότερο ελαιδιαλυτή και, επομένως, διευκολύνεται ο επαρκής διαχωρισμός φάσης μετά τη φυγοκέντρωση.

Στα δείγματα προστέθηκε επίσης NaCl (5%) προκειμένου να διευκολυνθεί η διαδικασία διαχωρισμού φάσης αυξάνοντας την πυκνότητα της χύδην υδατικής φάσης. Επιπλέον, το NaCl μειώνει τη θερμοκρασία του σημείου νέφους. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών ουσιών μεταβάλλουν επίσης τον χρόνο που

απαιτείται για τη CPE. Η αύξηση της επιφανειοδραστικής ουσίας αυξάνει επίσης το χρόνο που απαιτείται για τη CPE. Μετά από τη διεκπεραίωση της εκχύλισης βρέθηκε ότι η ελάχιστη κρίσιμη συγκέντρωση (CMC) που απαιτείται για να σχηματίσει το Genapol-X080 μικκύλια ήταν 0,05-0,35 mM και η θερμοκρασία του σημείου νέφωσης ήταν 25-42°C.

Η ικανότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας να ανακτά μεμονωμένες πολυφαινόλες και τοκοφερόλες ή μείγματα σε διάφορες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκε πριν από την εφαρμογή της για την ανάκτηση φαινολών από το νερό λυμάτων ελαιουργείου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι **οι όγκοι V_s (όγκοι της πλούσιας σε επιφανειοδραστικές ουσίες φάσης) και V_w (της υδατικής φάσης) εξαρτώνται από τη συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας σε σταθερή θερμοκρασία. Ο συντελεστής συγκέντρωσης ($F_c = C_s/C_o$) και ο λόγος V_s/V_w είναι σημαντικοί παράγοντες για την απόδοση του διαχωρισμού.** Για τη βέλτιστη απόδοση εκχύλισης, η ανάκτηση αντιοξειδωτικών και η προ-συγκέντρωση πρέπει να φτάσουν τις μέγιστες τιμές. Έτσι, ο F_c θα πρέπει να φέρει **μέγιστες** τιμές, ενώ το V_s/V_w -λόγο **ελάχιστες** τιμές, που σημαίνει ότι ο V_s θα πρέπει να είναι στο ελάχιστο και η C_s στο μέγιστο. **Καθώς η συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας αυξάνεται, αυξάνονται και οι τιμές ανάκτησης.** Όμως, το V_s/V_w μειώνεται ταχέως (από 3,3 σε 0,07) και, κατά συνέπεια, παρατηρείται ανεπιθύμητη μείωση στον F_c . Ο λόγος όγκου φάσης V_s/V_w μετά το στάδιο του διαχωρισμού των φάσεων μπορεί να είναι πολύ χαμηλός, της τάξεως του 0,007-0,04. Συνεπώς, οποιαδήποτε επιθυμητή αναλυόμενη ουσία που είναι συνδεδεμένη στο μικκυλιακό συσσωμάτωμα μπορεί να διαχωριστεί και να εκχυλιστεί στο στοιχείο μικρού όγκου της πλούσιας σε επιφανειοδραστικό φάσης με τρόπο παρόμοιο με ένα συμβατικό στάδιο εκχύλισης υγρού-υγρού. Ωστόσο, δεδομένου ότι υπάρχει ανάγκη διαχείριση του όγκου της φάσης με το επιφανειοδραστικό, πρέπει να επιτευχθεί συμβιβασμός έτσι ώστε η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας να επιτρέπει έναν υψηλό λόγο φάσεων και μια διαχειρίσιμη φάση πλούσια σε επιφανειοδραστικό.

Ο λόγος V_s/V_w αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της προ-συγκέντρωσης και των παραγόντων βελτίωσης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εφαρμογή αυξημένων θερμοκρασιών οδηγεί σε αφυδάτωση του μικκυλίου, αυξάνοντας την αναλογία φάσης-όγκου και συνεπώς την ενίσχυση της ανάκτησης κατά έναν παράγοντα τόσο μεγάλο όσο η τιμή 3. Ως εκ τούτου, ως σημαντικότερη προϋπόθεση κατά τη διάρκεια της εκπόρευσης της CPE, οι θερμοκρασίες θα πρέπει να είναι εντός των ορίων των >60°C για τις φαινόλες.

*Πίνακας 27: Μεμονωμένη ανάκτηση φαινόλης (%) κατά ένα βήμα CPE με 0,2–5% (v/v) Genapol X-080 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινόλης, όπου P υποδεικνύει σημαντική διαφορά ($P \leq 0,05$) των ανακτήσεων μεταξύ διαφορετικών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικών ουσιών, ** υποδεικνύει μη σημαντική διαφορά ($P > 0,05$) και οι ^a τιμές είναι μέσα τριών προσδιορισμών. Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση. (Gortzi et al., 2008)*

Μεμονωμένη ένωση	Συγκέντρωση (ppm)	% (v/v) επιφανειοδραστικό					P*
		0.2	0.5	1.5	2.5	5	
Γαλλικό οξύ	50	39.9 (1.2) ^a	55.9 (1.0)	69.4 (1.6)	73.8 (1.8)	83.8 (1.9)	*
	100	83.0 (2.1)	85.5 (1.1)	87.6 (1.5)	90.2 (1.0)	92.1 (1.9)	**
	300	17.3 (0.9)	21.8 (1.0)	24.7 (1.1)	43.6 (1.4)	56.4 (1.5)	**
Πρωτοκατεχοϊκό οξύ	50	17.6 (1.3)	25.7 (0.6)	41.8 (0.9)	52.4 (1.1)	58.1 (1.0)	*
	100	42.2 (1.5)	47.6 (1.2)	56.7 (1.6)	60.2 (1.3)	69.8 (1.0)	*
	200	29.2 (1.8)	41.1 (1.6)	53.0 (0.6)	68.3 (1.7)	77.8 (1.4)	*
Ελαιοευρωπαϊνή	50	43.1 (0.5)	72.2 (1.9)	83.7 (2.2)	90.1 (2.6)	97.7 (2.0)	*
	300	20.7 (0.2)	46.3 (0.8)	59.2 (0.7)	68.3 (1.1)	77.3 (1.1)	*
ο-Κουμαρικό οξύ	50	29.1 (0.2)	43.8 (0.8)	58.4 (0.9)	78.6 (1.6)	93.9 (1.6)	*
	100	35.5 (1.4)	47.6 (1.7)	56.3 (1.4)	72.4 (1.5)	84.2 (1.2)	*
	300	51.6 (1.8)	61.6 (1.5)	68.5 (1.6)	72.2 (1.0)	77.9 (1.1)	*
p-κουμαρικό οξύ	100	50.7 (1.3)	59.4 (1.1)	82.2 (2.1)	87.2 (2.3)	91.9 (1.9)	*
	300	47.7 (1.7)	64.1 (1.8)	81.7 (1.9)	83.6 (1.6)	85.9 (1.5)	*Εκτός από 1,5–5,0
ρουτίνη	50	41.4 (1.2)	60.1 (1.3)	83.5 (1.0)	93.0 (1.9)	97.4 (1.9)	*
	100	46.6 (2.0)	66.6 (2.1)	74.2 (1.6)	82.3 (1.5)	86.6 (1.9)	*
	300	35.7 (0.6)	53.3 (0.8)	76.2 (1.3)	81.8 (1.5)	87.1 (2.0)	*
Επικατεχίνη	50	18.2 (0.1)	44.6 (0.7)	46.6 (1.0)	62.8 (1.7)	77.8 (1.4)	*
	100	30.6 (1.0)	53.0 (1.2)	76.0 (1.3)	85.2 (1.8)	98.5 (1.4)	*
	300	34.4 (1.0)	37.5 (1.1)	65.2 (2.0)	71.2 (1.2)	75.1 (1.0)	*

Λουτεονίνη	50	93.4 (2.1)	96.7 (2.3)	97.5 (2.0)	97.1 (2.4)	-	**
	100	64.9 (1.6)	67.4 (1.5)	68.4 (1.8)	83.8 (1.9)	-	*Εκτός από 2.5
Συριγγικό οξύ	50	21.9 (0.5)	42.3 (0.4)	62.8 (1.1)	82.7 (1.5)	90.0 (1.4)	*
	100	17.3 (1.0)	30.1 (1.6)	52.1 (1.4)	64.5 (1.8)	86.3 (1.7)	*
	300	34.9 (1.2)	39.0 (1.8)	55.1 (2.0)	66.0 (2.2)	89.6 (2.3)	*
Τυροσόλη	50	20.3 (1.0)	26.6 (1.1)	31.2 (1.8)	36.7 (1.9)	63.3 (2.0)	*
	100	29.0 (1.0)	34.5 (1.4)	43.9 (1.5)	58.5 (1.9)	69.8 (1.7)	*

Είναι προφανές ότι πολλές από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες μπορούν να ανακτηθούν σε υψηλό ποσοστό. Ειδικά, στην περίπτωση της λουτεονίνης, οι χαμηλές συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών ουσιών επαρκούν για τον ποσοτικό διαχωρισμό. Η ανάκτηση των διαφόρων πολυφαινολικών ενώσεων είναι εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας. Ωστόσο, το ποσοστό ανάκτησης κάθε μεμονωμένης πολυφαινόλης εξαρτιόταν από **τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της**. Στην περίπτωση υψηλότερης συγκέντρωσης φαινόλης, η υψηλότερη συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας ήταν απαραίτητη για την ολική απομάκρυνση της φαινόλης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικής ουσίας (Triton X-114), οι ανακτήσεις φαινολών έτειναν σε ένα σταθερό επίπεδο, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη για ένα επιπλέον στάδιο ανάκτησης CPE. Αν και οι ανακτήσεις αυξάνονται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας, οι αλλαγές δεν είναι οι ίδιες για όλες τις ενώσεις. Η ανάκτηση των φαινολών μέσω διαβαθμιζόμενης CPE για μείγμα πολυφαινολών (έκαστη σε συγκέντρωση 50 ppm) με 2, 5 και 20% Genapol X-080 παρουσιάζεται **στον Πίνακα 28**.

Πίνακας 28: Ανάκτηση φαινόλης (%), από μείγμα δέκα φαινολών (50 ppm η καθεμία), κατά ένα βήμα CPE με 2–20% (v/v) Genapol X-080 στην ίδια θερμοκρασία (55 °C), όπου οι ^a τιμές είναι μέσα τριών προσδιορισμών. Η τυπική απόκλιση δίνεται σε παρένθεση (Gortzi et al., 2008).

% (v/v) Επιφανειοδραστικό	Ανάκτηση φαινόλης (%)
2	65.1 (1.0) ^a
5	77.3 (1.1)
20	94.9 (1.8)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάκτηση ήταν ανάλογη με το ποσοστό της επιφανειοδραστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Όπως αναμενόταν, υψηλότερο ποσοστό Genapol X-080 παρήγαγε σημαντικά υψηλότερες ανακτήσεις μεμονωμένων φαινολών. Τα αποτελέσματα της ανάκτησης ολικών φαινολικών με απλή και διαδοχική CPE σε OMW με διάφορες συγκεντρώσεις (2, 5 και 20%, v/v) του Genapol X-080 παρουσιάζονται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 29: Ανάκτηση φαινόλης (%) με CPE δύο ή τριών σταδίων με 2–20% (v/v) Genapol X-080 από λύματα ελαιοτριβείου (Gortzi et al., 2008).

No of steps	% (v/v) Επιφανειοδραστικό			P*
	2	5	20	
1	63.2 (1.1) ^a	68.2 (0.5)	74.8 (2.0)	*
2	73.6 (2.1)	77.1 (0.9)	81.6 (2.3)	*
3	89.5 (1.1)	87.1 (0.6)	88.3 (0.7)	*Μόνο μεταξύ 2 και 5%

Τα πολλαπλά στάδια (1-3) αύξησαν την ανάκτηση κατά περίπου 42, 28 και 18% στην περίπτωση 2, 5 και 20% (v/v) επιφανειοδραστικής ουσίας, αντίστοιχα. Τα πολλαπλά στάδια (ακόμη και όταν χρησιμοποιήθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας) αύξησαν σημαντικά την ανάκτηση φαινολών του OMW. Όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα, η CPE με Genapol X-080 μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων πολυφαινολικών ενώσεων και μπορεί να επιτευχθεί ποσοτική εκχύλιση πολυφαινολών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τιμές ανάκτησης υψηλότερες από 40% φαινόλης (από την υδατική φάση) μπορούν να επιτευχθούν με CPE ενός σταδίου με χαμηλή συγκέντρωση επιφανειοδραστικής ουσίας (1,5%). Οι απώλειες φαινόλης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας CPE αποτρέπονται, καθώς η θερμοκρασία εξισορρόπησης είναι μικρότερη από 60°C. Η CPE φαίνεται να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την προσυγκέντρωση φαινολικών ενώσεων πριν από τον προσδιορισμό της φαινόλης μέσω φωτομετρικής ταυτοποίησης (με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu). Επιπλέον, η CPE θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση φαινολικών ουσιών πριν από τη χρήση του OMW. Η χρήση του Genapol X-080 βελτίωσε την ανάκτηση φαινολών από το OMW σε υψηλότερες τιμές (έως 89,5%) από ό,τι άλλα επιφανειοδραστικά, δηλαδή του Triton X-114 (έως και 66%). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του Genapol X-080 σε σχέση με το Triton X-114 είναι η ελάχιστη απορρόφηση στην περιοχή κοντά στα 280 nm (το πιο κοινό μήκος κύματος για γενική ανίχνευση φαινολικών με HPLC). Επιπλέον, το στάδιο απομάκρυνσης λιπαρών ουσιών πριν από τη CPE δεν είναι απαραίτητο, με σκοπό να αποφευχθεί η ανάμειξη της επιφανειοδραστικής ουσίας με έλαιο (γεγονός που προκαλεί προβλήματα με τον διαχωρισμό των φάσεων με το πέρας της φυγοκέντρωσης). Η ομάδα πολικής κεφαλής του Genapol X-080 είναι παρόμοια με εκείνη του Triton X-114, αλλά οι υδρόφοβες αλυσίδες είναι διαφορετικές. Το Genapol X-080 έχει αλειφατική αλυσίδα άνθρακα με διακλαδισμένη μεθυλομάδα (ισοτριδεκυλική ομάδα), ενώ το Triton X-114 περιέχει ομάδα οκτυλοφαινόλης. Αυτή η ισοτριδεκυλική ομάδα του Genapol X-080 καθιστά την επιφανειοδραστική λιγότερο ελαιοδιαλυτή και επομένως ο επαρκής διαχωρισμός φάσης μετά τη φυγοκέντρωση είναι πολύ ευκολότερος. Η διαδικασία CPE προσφέρει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στην εκχύλιση των φαινολών με υγρό-υγρό ή υγρό στερεό διαλύτη λόγω της απλότητας, των λιγότερων απαιτήσεων χρόνου, εργασίας και εξοπλισμού και της χρήσης μη τοξικών εκχυλισμάτων. Η CPE, ως καθαρή τεχνολογία, θα μπορούσε να

είναι μια απλή και οικονομική λύση για τη μελέτη φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών, για εφαρμογές διαιτητικού ενδιαφέροντος (Gortzi et al., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

6.1 Συνοπτική επεξήγηση

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι να αναδείξει το κακάο ως πολυδύναμο λειτουργικό τρόφιμο, να αποσαφηνίσει τους αντιοξειδωτικούς παράγοντές του, αναφέροντας στις πολυφαινόλες, τη βιοδραστικότητά τους, και τα οφέλη τους στον άνθρωπο. Να προτείνει τους ασφαλέστερους, οικονομικότερους και πιο οικολογικούς τρόπους με τους οποίους αυτές μπορούν να ανακτηθούν, να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους, και να εξεταστεί η ενδεχόμενη περεταίρω αξιοποίησή τους στη βιομηχανία επεξεργασμένων τροφίμων και όχι μόνο (βιομηχανία φαρμάκων και εκτροφές εδωδιμων εντόμων, καλλυντικών κ.α.). Ο τρόπος εκπόνησης της ανάκτησης των πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της **Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης** (αγγ. Cloud Point Extraction, συν.: CPE), ενώ ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους έγινε μέσω εφαρμογής της μεθόδου **Folin-Ciocalteu**. Η εκτίμηση της **αντιβακτηριακής δράσης των ανακτηθέντων πολυφαινολών**, σε ελεύθερη και εγκλεισμένη μορφή, πραγματοποιήθηκε **σε στελέχη βακτηρίων *S. Aureus* και *E. coli***.

6.2 Περιγραφή του τρόπου εκπόνησης

Η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι πειραματικού και ερευνητικού χαρακτήρα.

Στα πλαίσια της πτυχιακής αυτής διατριβής διερευνήθηκαν τα ακόλουθα:

- A. Δημιουργία δομών (μικκυλίων) με στόχο τη δέσμευση των διάφορων πολυφαινολών του κακάο (CPE) με τροποποίηση των παραμέτρων και επανάληψη των βημάτων του πειράματος με στόχο τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.**
- B. Μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής ικανότητας των μυκκιλιακών διασπορών.**
- C. Διερεύνηση των πιθανών χρήσεων των πολυφαινολών του κακάο στη βιομηχανία μεταποίησης (“superfoods” – λειτουργικά τρόφιμα – συμπληρώματα διατροφής).**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

7.1 Υλικά

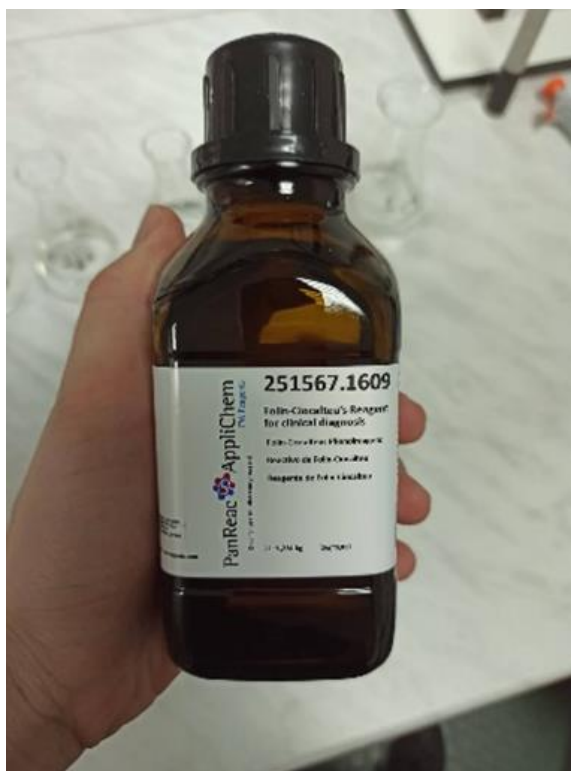
Τα υλικά και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεκπεραίωση του πειράματος έχουν ως ακολούθως:

Εκχύλιση των πολυφαινόλων με τη μέθοδο της CPE:

- ✚ 10g σκόνης κακάο, Γιώτης
- ✚ 50 mL απεσταγμένο νερό
- ✚ Λεκιθίνη Σόγιας 5%, 10%, 15%, 20% w/w του αρχικού μείγματος (lecithin of soya, Carlo Erba >97%)
- ✚ Ασκορβικό οξύ (Ascorbic Acid)
- ✚ Καθαρό άλας (NaCl) 5% w/w

Μέθοδος προσδιορισμού των φαινολικών (Folin-Ciocalteu):

- ✚ Γαλλικό οξύ (Gallic Acid Monohydrate ACS, Penta)
- ✚ Μεθανόλη (Pancreac, 99,9% καθαρότητα)
- ✚ Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu's Reagent DC PanReac Quimica Sau)



- ✚ Απεσταγμένο νερό
- ✚ Ανθρακικό νάτριο Na₂CO₃ (Sodium Carbonate Anhydrous, Reag. USP, Ph. Eur., Barcelona-Spain)

 Σκεύη και Εργαστηριακά Μηχανήματα:

- Φιάλη των 100ml με πώμα
- Δοχεία τύπου falcon των 15ml
- Ζυγός των 2, 4 και 5 δεκαδικών ψηφίων
- Θερμαντική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα
- Φυγόκεντρος (Ortoalresa DIGICEN 20R, Spain)
- Λουτρό Υπερήχων (Sartorius Stedim, Labsonic M, Biochem)
- Πεχάμετρο
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 ml
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml, των 10 ml και των 5 ml
- Ποτήρια ζέσεως
- Σιφόνιο των 5, 10ml
- Σπάτουλα
- Φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους – διπλής δέσμης
- Πιπέτες Pasteur

Πρωτόκολλο εκτίμησης της αντιμικροβιακής δράσης:

- δοχεία τύπου falcon
- τριβλία Petri
- άγαρ (CHEMSOLUTE Nahragar APHA)
- *Eserichia coli* και *Staphylococcus aureus*, 50mL και 100 mL
- Incubator (Heidolph Polymax 1040)
- Επωαστήριο

7.2 Μέθοδοι

Όπως προαναφέρθηκε, η σκόνη κακάο καθιστά ένα σύνθετο μείγμα από επωφελείς θρεπτικές και λειτουργικές ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην ιατρική και τη διατροφολογία. Ο λόγος αυτός οδήγησε στην ιδέα εφαρμογής εκχύλισης των ουσιών αυτών με σκοπό την αξιοποίησή τους. Η εκχύλιση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη CPE και οι ουσίες **Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης** (αγγ. Cloud Point Extraction, συν. CPE). Έπειτα, μετρήθηκαν με την εφαρμογή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu για την αξιολόγηση της πειραματικής διαδικασίας. Οι μέθοδοι αυτοί θα παρουσιαστούν παρακάτω.

7.2.1 Εκχύλιση σε Σημείο Νέφωσης (Cloud Point Extraction)

Πειραματική Πορεία

1. Προσθήκη 10 g σκόνης κακάο και φιάλης νερού με πόμα των 100 ml
2. Θέρμανση στους 45°C και ανάδευση στις 1500 rpm για 30΄
3. Τοποθέτηση του δείγματος στην ακίδα υπερήχων (probe sonicator) για άλλα 30΄
4. Λήψη του υπερκείμενου με πιπέτα, τοποθέτηση σε δοκιμαστικό σωλήνα φυγόκεντρου και ζύγιση
5. Εφαρμόζεται φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, στους 10°C κάνοντας ανά 5΄ έλεγχο έως ότου διαχωριστούν εντελώς οι φάσεις
6. Λήψη του υπερκείμενου με πιπέτα, τοποθέτηση σε ποτήρι ζέσεως και ζύγιση
7. Μέτρηση pH με πεχάμετρο και ρύθμιση του με ασκορβικό οξύ ούτως ώστε να φτάσει την τιμή 3
8. Διαχωρισμός του δείγματος σε 2 ποτήρια ζέσεως και ζύγιση
9. Προσθήκη 5% w/w NaCl
10. Προσθήκη λεκιθίνης σε περιεκτικότητες 5% και 10% w/w στα δύο μίγματα αντίστοιχα
11. Θέρμανση στους 55°C και ανάδευση στις 1500 rpm στην θερμαντική πλάκα για 1 - 2 h (έως ότου διαλυθεί η λεκιθίνη)
12. Εξισορρόπηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5-10 min (τα δείγματα θα πρέπει να είναι θολωμένα)
13. Τοποθέτηση σε Falcon των 50 ml και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm, στους 10 °C για 20 min (μέχρι να διαχωριστούν πλήρως)
14. Λήψη υπερκείμενου τζελ με πιπέτα, τοποθέτηση σε Falcon των 15 ml και αποθήκευση στην κατάψυξη (– 25°C)
15. Δεύτερη ανάκτηση: στην υδατική φάση του προηγούμενου βήματος, επαναλαμβάνεται η διαδικασία από την προσθήκη λεκιθίνης (πρώτα συμπληρώνεται νερό για τελικό όγκο 50 ml)

Σημείωση: Στην δεύτερη ανάκτηση εφαρμόστηκαν 15% & 20% w/w λεκιθίνης, αντί για 5% & 10% w/w.



Εικόνα 19 Ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση του αρχικού μείγματος πριν την εφαρμογή του επιφανειοδραστικού (λεκιθίνη)



Εικόνα 20 Υπερήχηση του αρχικού μείγματος



Εικόνα 21 Ο διαχωρισμός των φάσεων της CPE

7.2.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πολυφαινολών του κακάο με χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος στηρίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin – Ciocalteu reagent) σε φωσφορομολυβδενικό και φωσφοροβολφραμικό φαινολικό σύμπλοκο χρώματος **μπλε** σε αλκαλικό περιβάλλον. Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία γίνεται ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου του δείγματος χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. (Καλαμπόκη & Μαγιάτης, 2016)

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που είναι μίγμα των οξέων φωσφοροβολφραμικό ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφορομολυβδενικό ($H_3PMo_{12}O_{40}$), κατά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων τα οξέα αυτά ανάγονται σε ένα μίγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαίνιου (Mo_8O_{23}). Το προϊόν της αντίδρασης του FC με τα φαινολικά συστατικά είναι σύμπλοκο μολυβδαίνιου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα 725 nm. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε αλκαλικό περιβάλλον και η ένταση του σχηματιζόμενου κυανού χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των φαινολών. Ωστόσο το χρώμα αυτό δεν είναι σταθερό και εξελίσσεται σύμφωνα με το χρόνο. Στα πρώτα 30 min γίνεται κυανό, ενώ στη συνέχεια περνάει στο βαθύ κυανό. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για να είναι τα αποτελέσματά μας συγκρίσιμα, οι μετρήσεις της απορρόφησης πρέπει να γίνονται σε σταθερό χρόνο για όλα τα δείγματα (Miyoshi Ikawa T. D., 2003).

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

- Διάλυμα γαλλικού οξέος: Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν 0,005g γαλλικού οξέος, τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκαν 100ml αφιονισμένου νερού.
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου: Με συνεχή ανάδευση διαλύθηκαν 20g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 80ml αφιονισμένου νερού (25% w/v).

Φασματοφωτομέτρηση

Για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των πολυφαινολών κατασκευάστηκε μία καμπύλη βαθμονόμησης, βάσει της οποίας υπολογίζουμε την περιεκτικότητα των πολυφαινολών σε άγνωστα διαλύματα. Για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης σε 5 ογκομετρικές φιάλες των 50ml προστέθηκε διάλυμα γαλλικού οξέος ώστε να ληφθεί τελική συγκέντρωση στα 50ml από 1 mg/L μέχρι 10mg/L. Στην συνέχεια προστέθηκαν 1ml Folin Ciocalteu, και μετά την πάροδο 3 λεπτών προστέθηκε 2ml διαλύματος Na_2CO_3 . Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε ως τη χαραγή με απιονισμένο νερό και αφέθηκε σε σκοτεινό θάλαμο για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου αναμονής και αφού έχει επιτευχθεί η οξείδωση των πολυφαινολών μετρίεται η απορρόφηση στα 725nm με το φασματοφωτόμετρο (Jasco V-630 BIO).

Για το γαλλικό οξύ συγκέντρωσης 50mg/lt:

1. $0\text{mg/lt} \rightarrow V=0\text{ml}$
2. $1\text{mg/lt} \rightarrow 1\text{mg/lt} * 50\text{ml} = 50\text{mg/lt} * V_{\text{ml}} = 1\text{ml}$
3. $3\text{mg/lt} \rightarrow 3\text{mg/lt} * 50\text{ml} = 50\text{mg/lt} * V_{\text{ml}} = 3\text{ml}$
4. $5\text{mg/lt} \rightarrow 5\text{mg/lt} * 50\text{ml} = 50\text{mg/lt} * V_{\text{ml}} = 5\text{ml}$
5. $8\text{mg/lt} \rightarrow 8\text{mg/lt} * 50\text{ml} = 50\text{mg/lt} * V_{\text{ml}} = 8\text{ml}$
6. $10\text{mg/lt} \rightarrow 10\text{mg/lt} * 50\text{ml} = 50\text{mg/lt} * V_{\text{ml}} = 10\text{ml}$

Πίνακας 30: Βαθμονόμηση της φασματοφωτομέτρησης μέσω της μεθόδου Folin Ciocalteu

Concentration (mg/L)	Absorbance
0	0,012
1	0,134
3	0,362
5	0,575
8	0,721
10	0,981

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

- Γαλλικό οξύ. Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν 0,005g γαλλικού οξέος και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml.
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου. Με συνεχή ανάδευση διαλύθηκαν 20g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 80ml υπερκάθαρου νερού. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου επειδή η αναγωγική δράση των φαινολικών ενώσεων προάγεται σε αλκαλικό.
- Διάλυμα δειγμάτων σε μεθανόλη. Σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας ζυγίστηκαν από κάθε δείγμα 0,5γρ gel, 0,5γρ εκχύλισμα μετά το bath και 0,5γρ υπερκείμενου CPE (σημειώθηκε πόσο ζυγίστηκε και πόσο το αρχικό) και προστέθηκαν στο καθένα 4ml μεθανόλης MeOH και 4ml H₂O, αφέθηκαν για ανάδευση για 30min. Έπειτα προστέθηκαν άλλα 1,5ml MeOH και αφέθηκαν για ανάδευση 30min. Τέλος, προστέθηκαν ξανά 3ml MeOH και 2,5ml H₂O. Μετρήθηκε ο όγκος σε τελικό όγκο 15ml.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1: Προστέθηκαν τόσα ml MeOH καθώς τα διαλύματα εμφανίζουν θολερότητα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2: Εξαιτίας της συνεχούς θολερότητας τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 3500rpm.

❖ Στάδιο μεθόδου Folin Ciocalteu για τα δείγματα

Αριθμήθηκαν ογκομετρικές φιάλες των 25ml όσα και τα δείγματα μας και προστέθηκαν περίπου 15ml νερό υπερκάθαρο. Μετρήθηκαν για:

- Δείγματα μετά τη φυγοκέντρωση (εκχύλισμα μετά την υπερήχηση) 100μl
- Τα διηθήματα (υγρό, υπερκείμενο CPE) 350μL
- Τα gel (μικκύλια) 100μL

Στην συνέχεια προστέθηκαν 1ml Folin σε όλες τις φιάλες κρατώντας χρόνο από την πρώτη προσθήκη. Μετά την πάροδο 3 λεπτών από την πρώτη προσθήκη προστέθηκαν 2ml διαλύματος (Na_2CO_3) και συμπληρώθηκαν με υπερκάθαρο νερό μέχρι τη χαραγή. Έπειτα αφέθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο για 1ώρα. Μετά την οξείδωση των πολυφαινολών μετρήθηκε η απορρόφηση στα 725nm στο φασματοφωτόμετρο.



Εικόνα 22 Προετοιμασία των μειγμάτων για τη δοκιμασία της Folin-Ciocalteu



Εικόνα 23 Δείγματα έτοιμα προς φασματοφωτομέτρηση

7.2.3 Ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανακτηθέντων πολυφαινολών των μειγμάτων μέσω της αξιολόγησης της Αντιβακτηριακής ιδιότητάς

Πορεία Πειράματος

- 1) Διαχωρισμός και ονομασία των δοχείων τύπου falcon που εμπεριέχουν τις υπερκείμενες (υδατικής) και τις λιπαρές (μικκυλιακής) φάσεις βάσει των ξεχωριστών περιεκτικοτήτων σε επιφανειοδραστικό (λεκιθίνη) ως εξής:
 - a. A₁= μικκυλιακή με 5% w/w λεκιθίνη
 - b. A₂= υπερκείμενη από 5% w/w λεκιθίνη
 - c. B₁= μικκυλιακή με 10% w/w λεκιθίνη

Σημείωση: θεωρήσαμε ότι η B₂ (δηλ. υπερκείμενη από 10% w/w λεκιθίνη), επειδή είναι μικρής συγκέντρωσης, ως αμελητέα. Επομένως το B είναι εξ' ολοκλήρου μικκυλιακή φάση.
- 2) Λήψη 10mL από κάθε δοχείο falcon.
- 3) Τοποθέτηση των μειγμάτων σε τριβλία για έλεγχο τυχόν επιμόλυνσής τους.
- 4) Τοποθέτηση κάθε φάσης σε 4 δοχεία, όπου ανά 2 θα χορηγηθούν υγρό με αποικίες δυο διαφορετικών ειδών βακτηρίων, *Eserichia coli* και *Staphylococcus aureus*, σε συγκεντρώσεις των 50mL και 100 mL. Σε 4 από τα διαθέσιμα δοχεία δεν εφαρμόζουμε κανένα από τα μείγματα για να αξιοποιηθούν ως control για την καταμέτρηση των αποικιών.
- 5) Ανάδευση των δοχείων σε ειδικό αναδευτήρα (incubator) σε 20rpm στους 37°C για 48h.
- 6) Τοποθέτηση των μειγμάτων σε κατάλληλα τριβλία με άγαρ και διασπορά.
- 7) Επώαση όλων των τριβλίων στους 37°C για 2 μέρες.
- 8) Καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε τριβλίο, λήψη των αποτελεσμάτων και σύγκριση



Εικόνα 24 Εφαρμογή και διασπορά των φάσεων και των βακτηρίων στα τριβλία για δοκιμασία



Εικόνα 25 Ανάδευση σε incubator



Εικόνα 26 Επώαση στο επωαστήριο



Εικόνα 27 Καταμέτρηση των αποικιών που προέκυψαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

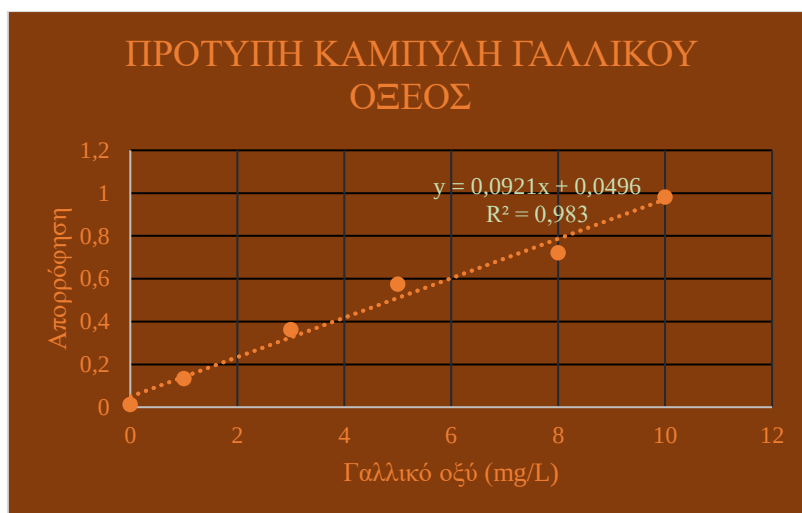
8.1 Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης των πολυφαινολών που ανακτήθηκαν μέσω Εκχύλισης σε Σημείο Νέφωσης (CPE) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Τα παρακάτω αποτελέσματα του **Πίνακα 31** μας δίνουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για κάθε μέτρηση (n=3) καθώς, επίσης τον μέσο όρο (MO) και τη μεταξύ τους τυπική απόκλιση (SD):

Πίνακας 31: Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu, όπου MO: μέσος όρος, SD: Τυπική Απόκλιση

Cloud Point Extraction	Συγκέντρωση (mg/L)				
	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	3η Μέτρηση	MO	SD
Εκχύλισμα μετά την υπερήχηση (1 ml)	1,72	1,80	1,86	1,79	0,07
Υγρό υπερκείμενο 5% λεκιθίνη (100 µlt)	8,73	8,51	8,85	8,70	0,18
Υγρό υπερκείμενο 10% λεκιθίνη (100 µlt)	10,12	10,04	10,23	10,13	0,10
Μικκήλια 5% λεκιθίνη (100 µlt)	8,00	8,17	8,03	8,06	0,09
Μικκήλια 10% λεκιθίνη (100 µlt)	9,05	9,11	9,17	9,11	0,06
Μικκήλια 15% λεκιθίνη (100 µlt)	9,57	9,52	9,68	9,59	0,08

Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ανακτηθέντων φαινολικών με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu (**πίνακας 30**) έδειξαν ότι η μεγαλύτερη απορρόφηση και συγκέντρωση των πολυφαινολικών συστατικών προσδιορίστηκε για τις διασπορές με περιεκτικότητα σε λεκιθίνη 10% και 15%. Όσο αυξανόταν η ποσότητα του επιφανειοδραστικού στο διάλυμα τόσο αυξάνονταν τα ανακτηθέντα ολικά φαινολικά στις μικκυλιακές φάσεις, με ανώτατη τιμή ανάκτησης («πλατό») κατά την προσθήκη λεκιθίνης με συγκέντρωση 15%. Παράλληλα, στις υδατικές φάσεις μειώνονταν, ανάλογα, οι συγκεντρώσεις των ανακτηθέντων βιοδραστικών με την αύξηση της περιεκτικότητας λεκιθίνης στα δείγματα. Εν κατακλείδι, θεωρήθηκε ότι με βάσει την εκτίμηση του ποσοστού ανάκτησης των πολυφαινολών στη μικκυλιακή φάση για περιεκτικότητες επιφανειοδραστικού (λεκιθίνης) 10 & 15% δεν μετρήθηκαν σημαντικές διαφορές, άρα δεν κρίθηκε αναγκαία η μελέτη μεγαλύτερων τιμών περιεκτικότητας του επιφανειοδραστικού για την επίτευξη της CPE.



Διάγραμμα 11 Καμπύλη απορρόφησης Γαλλικού Οξέος για τη βαθμονόμηση της μεθόδου Folin Ciocalteu

Σύμφωνα με τον τύπο % Ανάκτησης των φαινολικών στα μικκύλια στον **πίνακα 32** βρίσκουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 32: Η % Ανάκτηση των φαινολικών στις μικκυλιακές δομές

Ανάκτηση % = $(C_s \cdot V_s / C_o \cdot V_o) \cdot 100$				
	1η Μέτρηση	2η Μέτρηση	3η Μέτρηση	Mean
Μυκκήλια 5% λεκιθίνη (100 μ l)	46,51	45,39	43,17	45,03 $\pm$ 4,37
Μυκκήλια 10% λεκιθίνη (100 μ l)	52,62	50,61	49,30	50,89 $\pm$ 4,37
Μυκκήλια 15% λεκιθίνη (100 μ l)	55,64	52,89	52,04	53,58 $\pm$ 4,37

8.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης

Τα αποτελέσματα στον **Πίνακα 33** απεικονίζουν την αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολικών συστατικών του κακάο:

Πίνακας 33 Αποτελέσματα Βακτηριακής Δοκιμής

	<i>Eserichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				Δράση
Τεταρτημόριο τριβλίου	A'	B'	Γ'	Δ'	A'	B'	Γ'	Δ'	
Πλήθος αποικιών σε Control	100	100	100	100	100	100	100	100	Καμία δράση
Πλήθος αποικιών σε A1 50mL	100	100	100	100	30	20	30	30	μόνο στον <i>S. aureus</i>
Πλήθος αποικιών σε A1 100mL	100	100	100	100	0	0	0	0	μόνο στον <i>S. aureus</i>
Πλήθος αποικιών σε A2 50mL	40	70	50	100	0	0	0	0	και στα δύο
Πλήθος αποικιών σε A2 100mL	30	40	20	0	0	0	0	0	και στα δύο
Πλήθος αποικιών σε B 50mL	100	100	100	100	100	100	100	100	Καμία δράση
Πλήθος αποικιών σε B 100mL	100	100	100	100	100	100	100	100	Καμία δράση

Από όλες τις δοκιμές καλύτερη επίδοση βρέθηκαν στις μυκκυλιακές και υδατικές φάσεις από το δείγμα με 5% λεκιθίνη (A₁ & A₂). Το δείγμα A₂ ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των αποικιών και των δυο στελεχών βακτηρίων. Στα τεταρτημόρια των τριβλίων προέκυψαν λιγότερες αποικίες, με το *S. aureus* να δείχνει πιο ευαίσθητο στην αναστολή των πολυφαινολών του κακάο από ότι το *E. coli*.

Καθώς η δέσμευση των φαινολικών ήταν ισχυρή στη μυκκυλιακή διασπορά (δείγμα B) με βάσει το πλήθος των καταγεγραμμένων αποικιών των μικροοργανισμών *E. coli* και *S. aureus* δεν παρατηρήθηκε καμία δράση. Στην περίπτωση του σταφυλόκοκκου, τόσο το υπερκείμενο όσο και οι μυκκυλιακές διασπορές στα 100ml απέδωσαν πλήρη δραστικότητα έναντι του μικροοργανισμού, ενώ στα 50ml απέδωσαν μειωμένη δραστικότητα. Επομένως, με την αύξηση της δόσης, αυξανόταν και η δραστικότητα, όπως αυτή εκτιμήθηκε βάσει του αριθμού των αποικιών. Έτσι, λοιπόν, χρήζει περεταίρω διερεύνησης η λύση των μυκκυλιακών διασπορών και η απελευθέρωση των βιοδραστικών (πολυφαινολών) για την εμφάνιση της αντιμικροβιακής δράσης.

Τα αποτελέσματα αξιοποιήθηκαν προς στατιστική ανάλυση με ANOVA, όπως φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 34: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (one way-ANOVA) μεταξύ των μικροοργανισμών. της μεταχείρισης και της μεταξύ τους συσχέτισης

ANOVA - Growth					
Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Microorganism	19314.286	1	19314.286	265.967	<.001
Treatment	62767.857	6	10461.310	144.057	<.001
Microorganism * Treatment	20660.714	6	3443.452	47.418	<.001
Residuals	3050.000	42	72.619		

Note. Type III Sum of Squares

Από τον **Πίνακα 34** παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές ($p < 0.001$) τόσο μεταξύ των μικροοργανισμών και των μεταχειρίσεων όπου εφαρμόστηκαν, όσο και στη μεταξύ τους συσχέτιση.

Πίνακας 35: Post hoc σύγκριση μικροοργανισμών – μεταχείρισης

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	pTukey
Escherichia coli A1 50mL	Staphylococcus aureus A1 50mL	72.500	6.026	12.032	< .001
	Escherichia coli A1 100mL	-2.576×10 ⁻¹⁴	6.026	4.275×10 ⁻¹⁵	1.000
	Staphylococcus aureus A1 100mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli A2 50mL	35.000	6.026	5.808	< .001
	Staphylococcus aureus A2 50mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli Control	-2.665×10 ⁻¹⁵	6.026	4.422×10 ⁻¹⁶	1.000
	Staphylococcus aureus Control	1.865×10 ⁻¹⁴	6.026	3.095×10 ⁻¹⁵	1.000

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	pTukey
	Escherichia coli A2 100mL	77.500	6.026	12.861	< .001
	Staphylococcus aureus A2 100mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli B 100mL	2.931×10^{-14}	6.026	4.864×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 100mL	2.931×10^{-14}	6.026	4.864×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli B 50mL	-1.421×10^{-14}	6.026	2.358×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 50mL	0.000	6.026	0.000	1.000
Staphylococcus aureus A1 50mL	Escherichia coli A1 100mL	-72.500	6.026	-12.032	< .001
	Staphylococcus aureus A1 00mL	27.500	6.026	4.564	0.003
	Escherichia coli A2 50mL	-37.500	6.026	-6.223	< .001
	Staphylococcus aureus A2 50mL	27.500	6.026	4.564	0.003
	Escherichia coli Control	-72.500	6.026	-12.032	< .001
	Staphylococcus aureus Control	-72.500	6.026	-12.032	< .001
	Escherichia coli A2 100mL	5.000	6.026	0.830	1.000
	Staphylococcus aureus A2 100mL	27.500	6.026	4.564	0.003
	Escherichia coli B 100mL	-72.500	6.026	-12.032	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-72.500	6.026	-12.032	< .001

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	pTukey
	Escherichia coli B 50mL	-72.500	6.026	-12.032	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-72.500	6.026	-12.032	< .001
Escherichia coli A1 100mL	Staphylococcus aureus A1 00mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli A2 50mL	35.000	6.026	5.808	< .001
	Staphylococcus aureus A2 50mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli Control	2.309×10^{-14}	6.026	3.832×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus Control	4.441×10^{-14}	6.026	7.370×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli A2 100mL	77.500	6.026	12.861	< .001
	Staphylococcus aureus A2 100mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli B 100mL	5.507×10^{-14}	6.026	9.139×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 100mL	5.507×10^{-14}	6.026	9.139×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli B 50mL	1.155×10^{-14}	6.026	1.916×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 50mL	2.576×10^{-14}	6.026	4.275×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli A2 50mL	-65.000	6.026	-10.787	< .001
Staphylococcus aureus A1 100mL	Staphylococcus aureus A2 50mL	-2.309×10^{-14}	6.026	3.832×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli Control	-100.000	6.026	-16.595	< .001

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	pTukey
	Staphylococcus aureus Control	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Escherichia coli A2 100mL	-22.500	6.026	-3.734	0.032
	Staphylococcus aureus A2 100mL	-8.882×10 ⁻¹⁵	6.026	-	1.000
	Escherichia coli B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Escherichia coli B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
Escherichia coli A2 50mL	Staphylococcus aureus A2 50mL	65.000	6.026	10.787	< .001
	Escherichia coli Control	-35.000	6.026	-5.808	< .001
	Staphylococcus aureus Control	-35.000	6.026	-5.808	< .001
	Escherichia coli A2 100mL	42.500	6.026	7.053	< .001
	Staphylococcus aureus A2 100mL	65.000	6.026	10.787	< .001
	Escherichia coli B 100mL	-35.000	6.026	-5.808	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-35.000	6.026	-5.808	< .001
	Escherichia coli B 50mL	-35.000	6.026	-5.808	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-35.000	6.026	-5.808	< .001

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	pTukey
Staphylococcus aureus A2 50mL	Escherichia coli Control	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus Control	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Escherichia coli A2 100mL	-22.500	6.026	-3.734	0.032
	Staphylococcus aureus A2 100mL	1.421×10^{-14}	6.026	2.358×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Escherichia coli B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
Escherichia coli Control	Staphylococcus aureus Control	2.132×10^{-14}	6.026	3.538×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli A2 100mL	77.500	6.026	12.861	< .001
	Staphylococcus aureus A2 100mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli B 100mL	3.197×10^{-14}	6.026	5.306×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 100mL	3.197×10^{-14}	6.026	5.306×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli B 50mL	-1.155×10^{-14}	6.026	1.916×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 50mL	2.665×10^{-15}	6.026	4.422×10^{-16}	1.000
Staphylococcus aureus Control	Escherichia coli A2 100mL	77.500	6.026	12.861	< .001

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	Ptukey
	Staphylococcus aureus A2 100mL	100.000	6.026	16.595	< .001
	Escherichia coli B 100mL	1.066×10^{-14}	6.026	1.769×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 100mL	1.066×10^{-14}	6.026	1.769×10^{-15}	1.000
	Escherichia coli B 50mL	-3.286×10^{-14}	6.026	5.454×10^{-15}	1.000
	Staphylococcus aureus B 50mL	-1.865×10^{-14}	6.026	3.095×10^{-15}	1.000
Escherichia coli A2 100mL	Staphylococcus aureus A2 100mL	22.500	6.026	3.734	0.032
	Escherichia coli B 100mL	-77.500	6.026	-12.861	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-77.500	6.026	-12.861	< .001
	Escherichia coli B 50mL	-77.500	6.026	-12.861	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-77.500	6.026	-12.861	< .001
Staphylococcus aureus A2 100mL	Escherichia coli B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 100mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Escherichia coli B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
	Staphylococcus aureus B 50mL	-100.000	6.026	-16.595	< .001
Escherichia coli B 100mL	Staphylococcus aureus B 100mL	0.000	6.026	0.000	1.000
	Escherichia coli B 50mL	-4.352×10^{-14}	6.026	7.222×10^{-15}	1.000

Post Hoc Comparisons - Microorganism * Treatment					
		Mean Difference	SE	t	Ptukey
Staphylococcus aureus B 100mL	Staphylococcus aureus B 50mL	-2.931×10 ⁻¹⁴	6.026	-4.864×10 ⁻¹⁵	1.000
	Escherichia coli B 50mL	-4.352×10 ⁻¹⁴	6.026	-7.222×10 ⁻¹⁵	1.000
	Staphylococcus aureus B 50mL	-2.931×10 ⁻¹⁴	6.026	-4.864×10 ⁻¹⁵	1.000
Escherichia coli B 50mL	Staphylococcus aureus B 50mL	1.421×10 ⁻¹⁴	6.026	2.358×10 ⁻¹⁵	1.000

Note. P-value adjusted for comparing a family of 14

Από τον Πίνακα 35 δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προαναφερθείσες συγκρίσεις:

Για την *Escherichia coli* A1 50 mL δεν είναι στατιστικά σημαντικές (p=1.00) οι διαφορές με:

- *Escherichia coli* A1 100 mL
- Control τριβλία και των δύο οργανισμών και
- Ως προς το μίγμα B και για τις δύο δόσεις (50 & 100 mL)

Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των μεταχειρίσεων A1 50mL στον *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli* A2 100 mL. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων A1 100mL των B μιγμάτων (και για τις 2 δόσεις) καθώς και των Control τριβλίων (και για τα 2 μίγματα). Η μεταχείριση A1 100 mL στον *Staphylococcus aureus* είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλες τις μεταχειρίσεις που εμπεριείχαν το μίγμα B (p<0.001) αλλά όχι όμως με το A2 στον ίδιο οργανισμό (p=1.00).

Το B για όλες τις μετρήσεις, δεν είχε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των υπολοίπων διαχειρίσεων, επομένως, συμπεραίνεται πως υπάρχει μείωση της αντιβακτηριακής ιδιότητας του καθώς δεν κατάφερε να αναστείλει στατιστικά σημαντικά (p=1.00) της βακτηριακές διασπορές για όλα τα τριβλία. Αντιθέτως, το μίγμα A2 και για τις 2 δόσεις ανέστειλε στατιστικά σημαντικά τις αποικίες και των 2 βακτηρίων, γεγονός που αναδεικνύει τα προαναφερθέντα πορίσματα ως εμπεριστατωμένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ, ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

9.1 Ανακεφαλαίωση της πειραματικού μέρους και γενική θεώρηση

Στο πειραματικό μέρος, μέσω τροποποιημένου πρωτόκολλου των Chatzilazarou et al., 2010 & Gortzi et al., 2008, στην εκχύλιση μέσω της τεχνικής CPE, ανακτήθηκαν, σε σημαντικό ποσοστό (έως και περίπου 53,6%), οι πολυφαινόλες του κακάο. Το πρωτόκολλο ήταν απλό και μη χρονοβόρο. Για την τεχνική, δεν χρειάστηκε κάποιου είδους προετοιμασία των δειγμάτων, καθώς εισάχθηκαν απευθείας ως υδατικό διάλυμα. Η τεχνική βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση ακίδας υπερήχων, για την απελευθέρωση των πολυφαινολών από τη σκόνη του κακάο, με την εφαρμογή της λεκιθίνης ως επιφανειοδραστικού, την παραμετροποίηση των συγκεντρώσεων της (5, 10, 15%) και την εφαρμογή ασκορβικού οξέος ως σταθεροποιητή οξύτητας (pH=3). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συστατικά του πειράματος φυσικής προέλευσης και εγκεκριμένης χρήσης στα τρόφιμα.

Ο προσδιορισμός των ανακτημένων πολυφαινολών και, κατ' επέκταση, η αποτελεσματικότητα της CPE στα μείγματα της μικκυλιακής και υγρής φάσης με πραγματοποιήθηκε με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu. Η απορρόφηση βαθμονομήθηκε σε διάγραμμα πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα εμφάνισαν μια σταδιακή αύξηση της περιεκτικότητας των πολυφαινολών μέχρι τη συγκέντρωση 15% λεκιθίνης. Θεωρήθηκε ως βέλτιστη τιμή συγκέντρωσης 15% w/w λεκιθίνης. Παράλληλα, υπολογίστηκε η αποτελεσματικότητα ανάκτησης για τις συγκεντρώσεις 5, 10 και 15% λεκιθίνης και προσδιορίστηκε στα 45,03, 50,89 και 53,58% αντίστοιχα.

Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής ιδιότητας, επαναλήφθηκε η διαδικασία της εκχύλισης CPE, με μείγματα από περιεκτικότητα λεκιθίνης 5% (μείγματα Α) και 10% λεκιθίνης (μείγματα Β) αντίστοιχα. Τα δείγματα υδατικής και μικκυλιακής φάσης, εκτός από το Β που ήταν μόνο μικκυλιακή, υποβλήθηκαν προς εξέταση σε δοκιμαστικά τριβλία. Σε κάθε τριβλίο, εφαρμοζόταν η φάση από κάθε μείγμα με όγκο 50 ή 100ml μαζί με ποσότητα από τα βακτήρια *S. aureus* και *E. coli*, τα οποία απλώνονταν με διάχυση. Μετά από ανάμειξη στο incubator και επώαση σε ειδικό επωαστήριο, τα τριβλία εξήχθησαν προς καταμέτρηση των προκύπτωμενων αποικιών.

9.2 Αξιολόγηση της CPE ως «πράσινης» τεχνικής εκχύλισης βιοδραστικών και μέτρα βελτιστοποίησής της

9.1.1 Μέτρα βελτιστοποίησης της CPE

9.1.1.1 Χρήση ακίδας υπερήχων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η CPE θα μπορούσε να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές οικολογικής εκχύλισης, όπως την εκχύλιση μέσω υπερήχων ή μικροκυμάτων (Picot-Allain et al., 2021, & Motikar et al., 2021) για το καλύτερο δυνατό και σύντομο αποτέλεσμα. Συνεπώς, στη μελέτη ακολουθήθηκε το προαναφερθέν πρωτόκολλο (σελ. 105) για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και του χρόνου διεκπεραίωσης μέσω

υπερήχησης (sonification). Η υπερήχηση βοήθησε στην διάσπαση των περιεχόμενων φαινολικών από τη μικροδομή στην σκόνη κακάο. Όπως αποδεικνύεται από μελέτες, όπως των Jafari et al., 2023 και των Motikar et al., 2021, η υπερήχηση έχει αποδειχτεί ως η δραστικότερη μέθοδος εξαγωγής φυτικών βιοδραστικών, τόσο μόνη της όσο και σε συνδυασμό με τη CPE. Η αποδέσμευση των φαινολικών συστατικών τους φυτικούς ιστούς με υπερήχηση ενισχύει τον σχηματισμό μικκυλίων, λόγω του ότι οι ελεύθερες πολυφαινόλες μπορούν να συμπλέκονται αποτελεσματικότερα με το επιφανειοδραστικό (Motikar et al., 2021).

9.1.1.2 Χρήση λεκιθίνης ως επιφανειοδραστικού

Η χρήση της λεκιθίνης ως φυσικού επιφανειοδραστικού έχει ενσωματωθεί σε πρωτόκολλα άλλων μελετών ίδιου ενδιαφέροντος με όμοια αποτελέσματα σε σύγκριση άλλα επιφανειοδραστικά (π.χ. Genapol X-080, PEG 8000) (Giovanoudis et al., 2023). Οι λόγοι που χρησιμοποιήθηκε η λεκιθίνη είναι χαμηλή τιμή αγοράς, edώδιμο προϊόν (εγκεκριμένο από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών), υψηλή διαθεσιμότητα στο εμπόριο, φυσικής προέλευσης, κυρίως από το φυτό της σόγιας, χρησιμοποιείται σε πολλά επεξεργασμένα τρόφιμα ως γαλακτωματοποιητής, χημικώς καθαρό με όμοια δράση συγκριτικά με άλλα επιφανειοδραστικά (Giovanoudis et al., 2023), η οποία παρατηρήθηκε να είναι άμεση, μη απαιτητική και αποτελεσματική προς σχηματισμό μικκυλίων (η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύντομα και εύκολα).

9.1.2 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της τεχνικής CPE

Μετά από τις εργαστηριακές δοκιμές της διατριβής διαπιστώθηκε ότι:

-  Ανήκει στις «πράσινες» τεχνικές εκχύλισης βιοδραστικών καθώς χαρακτηρίζεται ως:
- ❖ οικονομική,
 - ❖ γρήγορη,
 - ❖ χημικώς καθαρή και
 - ❖ αποτελεσματική
 - ❖ δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμός για την εφαρμογή της,
 - ❖ δεν απαιτείται διαχωρισμός των πολυφαινολικών συστατικών από τις μυκκιλιακές διασπορές στις οποίες εγκλωβίστηκαν και συνεπώς
 - ❖ μας δίνεται η δυνατότητα άμεσης αξιοποίησης τους

Από την άλλη, οι περιορισμοί της CPE, έπειτα από τις εργαστηριακές δοκιμές και σύγκρισή τους με τη βιβλιογραφία, περιλαμβάνουν:

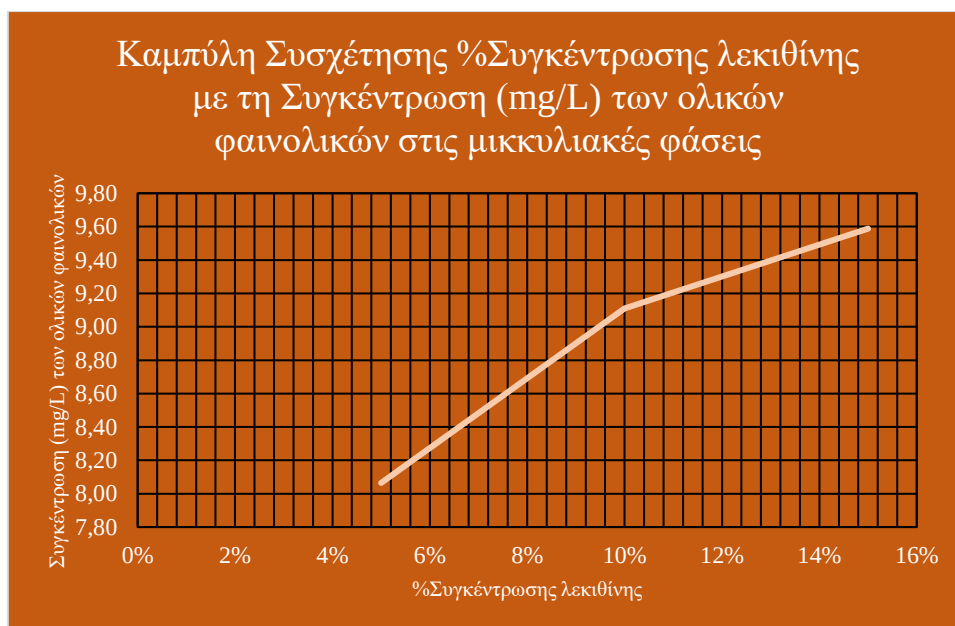
- Όριο στην ανίχνευση αναλυτών ουσιών λόγω πολυπλοκότητας των επιφανειοδραστικών, καθώς η δέσμευση επηρεάζεται σημαντικά από την εφαρμοζόμενη συγκέντρωσή τους, το CMC και τις συνθήκες (Arya et al., 2019, Chatzilazarou et al., 2010 & Gortzi et al., 2008)
- Χαμηλότερη απόδοση στην εκχύλιση πολικών συστατικών από μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες
- Απαίτηση περαιτέρω επεξεργασίας του εκχυλίσματος πριν από την ανάλυση

- Περιορισμοί θερμοκρασίας για διαχωρισμό φάσεων κατά την εξαγωγή θερμικά ασταθών ενώσεων
- Δυσκολία στον αυτοματισμό (Melnyk et al., 2015)

9.3 Εκτίμηση της ανακτηθείσας συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών του κακάο

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνονται από προηγούμενες έρευνες. Σύμφωνα με τους Arya et al., 2019, Chatzilazarou et al., 2010 & Gortzi et al., 2008, η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού και συνεπώς το CMC είναι ένα από τα βασικότερα κριτήρια για την εφαρμογή της τεχνικής της CPE. Στη μελέτη εξετάστηκε η ποσοστιαία ανάκτηση των ολικών φαινολικών της εμπορικής σκόνης κακάο θέτοντας ως τροποποιημένο παράγοντα τη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού. Η τιμή 15% w/w λεκιθίνης φαίνεται να οδηγεί τη μέγιστη δέσμευση των πολυφαινολών στον σχηματιζόμενο μικκύλια. Η χορήγηση επιπλέον συγκέντρωσης επιφανειοδραστικού (δηλαδή >15%) μειώνει την αποδοτικότητα μικκυλιοποίησης ή και, εν συνεχεία, της αποδέσμευσης των εκχυλιζόμενων ουσιών και κρίνεται, συνεπώς, άσκοπη και σπάταλη. Από τον πίνακα 31, οι τιμές 8,03mg/L (για 5% λεκιθίνης), 9,17mg/L (για 10% λεκιθίνης) και 9,68mg/L (για 15% λεκιθίνης), που αντιστοιχούν στο Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο των μικκυλιακών φάσεων, δείχνουν να είναι μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες στις υδατικές φάσεις, που είναι 8,73 και 10,12mg/L (για 5% και 10% λεκιθίνης), ενώ για 15% λεκιθίνης οι υδατικές φάσεις ήταν σε μικρή ποσότητα και συνεπώς μη διαχειρίσιμες. Κρίνεται, λοιπόν, αναγκαία η περεταίρω διερεύνηση εφαρμογής δεύτερων βημάτων εκχύλισης CPE (second step), στις περιπτώσεις όπου τα φαινολικά συστατικά δεν δεσμεύονται εξ' ολοκλήρου στα μικκύλια.

Στα παρακάτω διαγράμματα δίνεται η σχέση %Συγκέντρωσης επιφανειοδραστικού με τη Συγκέντρωση (mg/L) των ολικών φαινολικών (**Διάγραμμα 12**) και την %Ανάκτηση των ολικών φαινολικών στις μικκυλιακές δομές (**Διάγραμμα 13**):



Διάγραμμα 12 Καμπύλη συσχέτισης της %Συγκέντρωσης λεκιθίνης με τη Συγκέντρωση (mg/L) των ολικών φαινολικών στις μικκυλιακές φάσεις



Διάγραμμα 13 Καμπύλη γραμμικής συσχέτισης %Ανάκτησης των ολικών φαινολικών και της %Συγκέντρωσης w/w λεκιθίνης

Παράλληλα, τα δεδομένα της διατριβής είναι ελλιπή σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των Indrianingsih et al., 2021, Jafari et al., 2023, Ramos-Escudero et al., 2021, & Bubonja-Sonje et al., 2011 που δείχνουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών (άνω των 10mg/L). Αυτό μπορεί να οφείλεται, διότι στις προαναφερθείσες μελέτες χρησιμοποιήθηκε κακάο ανώτερης ποιότητας ως πρώτη ύλη, καθώς αποτελεί, (στην πλειοψηφία των παραπάνω ερευνών) γηγενές φυτό των χωρών όπου και διεξήχθησαν οι έρευνες αυτές. Συνεπώς, φαίνεται ότι παράγοντες όπως: η προέλευση και η ποικιλία του κακάο (Ramos-Escudero et al., 2021), ο τρόπος καλλιέργειας (L.

Russell Cook, 2023) και η διαδικασία επεξεργασίας και κατεργασίας (Ching lik Hii et al., 2009) επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος και πόσο μάλλον δε την ολική φαινολική περιεκτικότητα.

9.4 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης

Από τον **Πίνακα 31** φαίνεται να υπάρχει υποτίμηση της αντιμικροβιακής δράσης, η οποία οφείλεται σε περιορισμένη απελευθέρωση των φαινολικών των μικκυλιακών φάσεων. Η διαπίστωση ότι υπήρξε μειωμένη αντιβακτηριακή ιδιότητα μπορεί να εξηγηθεί στο γεγονός του ότι η ενσωμάτωση περισσότερου επιφανειοδραστικού θα συνεπαγόταν με μειωμένη δράση έναντι των βακτηρίων. Βλέπουμε ότι οι ελεύθερες φαινολικές ενώσεις των μειγμάτων υδατικής φάσης, για τις οποίες δεν επιτευχθεί επαρκής μικκυλιοποίηση με την λεκιθίνη, αναστέλλουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,01$) τη βακτηριακή ανάπτυξη στα τριβλία, κάτι το οποίο αποδεικνύει την αντιβακτηριακή και την αντιοξειδωτική ιδιότητα του κακάο (Ching lik Hii et al., 2009; Indrianingsih et al., 2021; Jafari et al., 2023; Vladimir-Knežević et al., n.d.). Το γεγονός αποδίδεται στο επιπλέον επιφανειοδραστικό που προστέθηκε. Σημαντικό είναι να λάβουμε υπόψιν ότι πιθανώς, πέραν των φαινολικών, και άλλα συστατικά του κακάο, όπως λιπαρά οξέα, ή πηκτίνες, λαμβάνουν χώρα στην αδρανοποίηση της ανάπτυξης των αποικιών βακτηρίων, όπως ανέφεραν οι Bubonja-Sonje et al., 2011 και Indrianingsih et al., 2021 (βλ. 4.2 «Η αντιμικροβιακή δράση των πολυφαινολών του κακάο»). Επιπλέον, η ευπάθεια που εμφανίστηκε στον σταφυλόκοκκο στο εκχύλισμα πολυφαινολών του κακάο είναι πολλά υποσχόμενη και θα μπορούσε να προταθεί για περεταίρω μελέτες, όπως και αποδεικνύεται και από τους Indrianingsih et al., 2021. Εν κατακλείδι, κρίνεται απαραίτητο να διερευνηθεί περεταίρω η αντιμικροβιακή ιδιότητα του κακάο, καθώς και άλλων προϊόντων, για την αξιολόγηση και αξιοποίηση των ωφέλιμων συστατικών του κακάο έναντι βακτηρίων και άλλων μικροβίων.

9.5 Διερεύνηση της αξιοποίησης των αντικειμένων της μελέτης στη βιομηχανία λειτουργικών τροφίμων και φαρμάκων

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε η προσπάθεια αξιοποίησης των πολυφαινολών του κακάο μέσω ωφέλιμης προς το περιβάλλον και οικολογικής μεθόδου ανάκτησής τους, την Εκχύλιση σε Σημείο Νέφωσης. Αποδείχθηκε, όπως και με άλλες εφαρμογές της CPE σε άλλα προϊόντα, όπως το ρόδι (Motikar et al., 2021), το βερίκοκο (Giovanoudis et al., 2023), το ελαιόλαδο ή το κρασί και τα υποπροϊόντα επεξεργασίας τους (Chatzilazarou et al., 2010; El-Abbassi et al., 2014; Gortzi et al., 2008; Kiai et al., 2018), ότι μπορούν σε σημαντικό ποσοστό (~53%) να ανακτηθούν και να μελετηθούν προς την ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων και φαρμάκων. Η CPE είναι μία εν δυνάμει κατάλληλη μεθοδολογία εκχύλισης συστατικών από το κακάο και συνεπώς είναι ανάγκη να εξεταστεί τόσο σε αυτό όσο και σε άλλα φυτικά προϊόντα. Οι μικκυλιακές δομές που μελετήθηκαν έδωσαν επιθυμητά αποτελέσματα έναντι των στελεχών των βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus*. Έχουν, ήδη, πραγματοποιηθεί προσπάθειες ενσωμάτωσης των μικκυλίων με τις εκχυλισμένες πολυφαινόλες μέσω της ανάπτυξης ενός αθλητικού ροφήματος για τη βελτίωση της επίδοσης αθλητών από τους Kolonas et al., 2023 του με αντιοξειδωτικές και

αντιβακτηριακές ιδιότητες. Επίσης, άλλος πιθανός τρόπος αξιοποίησης, παρόμοιας μεθοδολογία των Jafari et al, 2021, θα μπορούσε να συνιστά η παραγωγή ροφήματος ή μικροκάψουλων για τη δημιουργία φαρμακευτικών σκευασμάτων έναντι βακτηριακών λοιμώξεων.

Βιβλιογραφία

- 7 elements Βιολογικό Cacao Butter (200 gr) - NATANS. (2020). <https://natans.gr/product/7-elements-viologiko-cacao-butter-200-gr/>
- Abdeltaif, S. A., Sirelkhatim, K. A., & Hassan, A. B. (2018). Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan. *Recycling* 2018, Vol. 3, Page 27, 3(2), 27. <https://doi.org/10.3390/RECYCLING3020027>
- Agudelo, C., Bravo, K., Ramírez-Atehortúa, A., Torres, D., Osorio, E., & Carrillo-Hormaza, L. (2021). Chemical and Skincare Property Characterization of the Main Cocoa Byproducts: Extraction Optimization by RSM Approach for Development of Sustainable Ingredients. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 7429, 26(24), 7429. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26247429>
- Altunay, N., Gürkan, R., & Orhan, U. (2017). Indirect determination of the flavor enhancer maltol in foods and beverages through flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-cloud point extraction. *Food Chemistry*, 235, 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.066>
- Andres-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N., Izquiterdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J., & Lamuela-Raventós, R. M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3111–3117. <https://doi.org/10.1021/JF0728754>
- Aprotosoiaie, A., Miron, A., Trifan, A., Luca, V., & Costache, I.-I. (2016). The Cardiovascular Effects of Cocoa Polyphenols—An Overview. *Diseases*, 4(4), 39. <https://doi.org/10.3390/diseases4040039>
- Arya, S. S., Kaimal, A. M., Chib, M., Sonawane, S. K., & Show, P. L. (2019). Novel, energy efficient and green cloud point extraction: technology and applications in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 524. <https://doi.org/10.1007/S13197-018-3546-7>
- Balzer, J., Rassaf, T., Heiss, C., Kleinbongard, P., Lauer, T., Merx, M., Heussen, N., Gross, H. B., Keen, C. L., Schroeter, H., & Kelm, M. (2008). Sustained Benefits in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients. A Double-Masked, Randomized, Controlled Trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(22), 2141–2149. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.01.059>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.1998.TB01670.X>

- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821–1827. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.071>
- Cacao, A Mesoamerican Treasure | Chocolate Class. (2018). <https://chocolateclass.wordpress.com/2018/03/09/cacao-a-mesoamerican-treasure/>
- Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Gortzi, O., Lalas, S., Paraskevopoulos, Y., Dourtoglou, E., & Tsaknis, J. (2010). Removal of polyphenols from wine sludge using cloud point extraction. *Journal of the Air & Waste Management Association* (1995), 60(4), 454–459. <https://doi.org/10.3155/1047-3289.60.4.454>
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305. <https://doi.org/10.5344/AJEV.2006.57.3.298>
- Ching lik Hii, Chung Lim Law, Suzannah Sharif, Misnawi Jati, & Cloke M. (2009). Polyphenols in cocoa. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* . https://www.researchgate.net/publication/284800915_Polyphenols_in_cocoa_Theobroma_cacao_L
- Cocoa (cacao) | Diseases and Pests, Description, Uses, Propagation. (n.d.). Retrieved September 23, 2022, from <https://plantvillage.psu.edu/topics/cocoa-cacao/infos>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018a). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018b). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2018.00087>
- Delgadillo-Puga, C., Torre-Villalvazo, I., Noriega, L. G., Rodríguez-López, L. A., Alemán, G., Torre-Anaya, E. A., Cariño-Cervantes, Y. Y., Palacios-Gonzalez, B., Furuzawa-Carballeda, J., Tovar, A. R., & Cisneros-Zevallos, L. (2023). Pecans and Its Polyphenols Prevent Obesity, Hepatic Steatosis and Diabetes by Reducing Dysbiosis, Inflammation, and Increasing Energy Expenditure in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/NU15112591>
- El-Abbassi, A., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A. (2014). Cloud point extraction of phenolic compounds from pretreated olive mill wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), 1480–1486. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2014.06.024>

- Engels Jonathon. (2022). *5 Magical Ways to Enjoy Healthy Cacao Beans - One Green Planet*. <https://www.onegreenplanet.org/natural-health/magical-ways-to-enjoy-healthy-cacao-beans/>
- Eran Nagar, E., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2020). Digestive fate of polyphenols: updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Current Opinion in Food Science*, 31, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.10.009>
- Food-Info.net : Ποια είναι η (φυσική και χημική) σύσταση των κόκκων, του βουτύρου, της μάζας και της σκόνης του κακάο;* (2021). <http://www.food-info.net/gr/qa/qa-fp48.htm>
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289–297. <https://doi.org/10.5344/AJEV.2006.57.3.289>
- Giovanoudis, I., Athanasiadis, V., Chatzimitakos, T., Kalompatsios, D., Bozinou, E., Gortzi, O., Nanos, G. D., & Lalas, S. I. (2023). Implementation of Cloud Point Extraction Using Surfactants in the Recovery of Polyphenols from Apricot Cannery Waste. *Eng*, 4(2), 1225–1235. <https://doi.org/10.3390/ENG4020072>
- Gortzi, O., Lalas, S., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Papaconstandinou, S., & Dourtoglou, E. (2008). Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(2), 133–140. <https://doi.org/10.1007/S11746-007-1180-Z>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 547. <https://doi.org/10.3390/IJMS19030686>
- History of Cacao: Where does Chocolate Come From And How Is It Made?* (2021). <https://www.somatechnology.com/blog/wednesday-wisdom/a-brief-history-of-cacao-where-does-chocolate-come-from-and-how-is-it-made/>
- History of Cocoa*. (n.d.). Retrieved September 20, 2022, from <http://apps.worldagroforestry.org/treesandmarkets/inaforesta/history.htm>
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1007/S00216-002-1265-3>
- Indrianingsih, A. W., Wulanjati, M. P., Windarsih, A., Bhattacharjya, D. K., Suzuki, T., & Katayama, T. (2021). In vitro studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of Theobroma cacao, Annona muricata and Clitoria

- ternatea. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101995. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.101995>
- Ingle, K., Deshmukh Krishi Vidyapeeth, P., Mangesh Moharil Biotechnology Centre, I. P., Vaibhav Khelurkar Biotechnology Centre, I. C., Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhare, M. S., Moharil, M. P., & Khelurkar, V. C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts Cite this paper Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1).
- Jafari, S., Karami, Z., Shiekh, K. A., Kijpatanasilp, I., Worobo, R. W., & Assatarakul, K. (2023). Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cocoa Shell and Their Encapsulation in Gum Arabic and Maltodextrin: A Technology to Produce Functional Food Ingredients. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 412, 12(2), 412. <https://doi.org/10.3390/FOODS12020412>
- Jensen, S. J. K. (2003). Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666–667, 387–392. <https://doi.org/10.1016/J.THEOCHEM.2003.08.037>
- Kiai, H., Raiti, J., El-Abbassi, A., & Hafidi, A. (2018). Recovery of phenolic compounds from table olive processing wastewaters using cloud point extraction method. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 1569–1575. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2018.05.007>
- Kirk S. Kealy, Rodney M. Snyder, Leo J. Romanczyk Jr., Hans M. Geyer, Mary E. Myers, Eric J. Whitacre, John F. Hammerstone Jr., & Harold H. Schmitz. (1997). *Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses*.
- Koçak, E., & Pazır, F. (2018). Effect of Extraction Methods on Bioactive Compounds of Plant Origin. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 6(6), 663–675. <https://doi.org/10.24925/TURJAF.V6I6.663-675.1527>
- Kolonas, A., Vareltzis, P., Kiroglou, S., Goutzourelas, N., Stagos, D., Trachana, V., Tsadila, C., Mossialos, D., Mourtakos, S., & Gortzi, O. (2023). Antioxidant and Antibacterial Properties of a Functional Sports Beverage Formulation. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 3558, 24(4), 3558. <https://doi.org/10.3390/IJMS24043558>
- L. Russell Cook. (2023). cacao | Description, Cultivation, Pests, & Diseases | Britannica. In L. Russell Cook (Ed.), *Britannica*. <https://www.britannica.com/plant/cacao>

- Lapčíková, B., Lapčík, L., Salek, R., Valenta, T., Lorencová, E., & Vašina, M. (2022). Physical characterization of the milk chocolate using whey powder. *LWT*, 154, 112669. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112669>
- Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731–738. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2004.02.016>
- Liczbiński, P., & Bukowska, B. (2022). Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Industrial Crops and Products*, 175. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.114265>
- Martin, K. R. (2009). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 1. <https://doi.org/10.2147/NDS.S6422>
- McMahan Liz. (2014, November 11). *History | A Food of the Gods*. <https://plantbioblog.wordpress.com/2014/11/11/history/>
- Melnyk, A., Namieśnik, J., & Wolska, L. (2015). Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 282–292. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.03.013>
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., Mchale, N. L., Flanagan, J. A., Boxin, O. U., & Hurst, W. J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4062–4068. <https://doi.org/10.1021/JF060290O>
- Mohammadzadeh, M., Honarvar, M., Zarei, A. R., Mashhadi Akbar Boojar, M., & Bakhoda, H. (2018). A new approach for separation and recovery of betaine from beet molasses based on cloud point extraction technique. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1215. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2999-4>
- Motikar, P. D., More, P. R., & Arya, S. S. (2021). A novel, green environment-friendly cloud point extraction of polyphenols from pomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwave-assisted extraction. *Separation Science and Technology*, 56(6), 1014–1025. <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1746969>
- Olas, B. (2020). Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/NU12020283>
- Papaioannou, E. H., & Karabelas, A. J. (2012, March 17). *Lycopene recovery from tomato peel under mild conditions assisted by enzymatic pre-treatment and non-ionic surfactants - PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22428128/>

- Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144–156. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.02.009>
- Pourreza, N., Sharifi, H., & Golmohammadi, H. (2016). Curcumin nanoparticles combined with cloud point extraction for citrate determination in food and drug samples. *Microchemical Journal*, 129, 213–218. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2016.06.023>
- Pycia, K., Kapusta, I., & Jaworska, G. (2019). Impact of the Degree of Maturity of Walnuts (*Juglans regia* L.) and Their Variety on the Antioxidant Potential and the Content of Tocopherols and Polyphenols. *Molecules*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24162936>
- Pycia, K., Kapusta, I., & Jaworska, G. (2020). Changes in Antioxidant Activity, Profile, and Content of Polyphenols and Tocopherols in Common Hazel Seed (*Corylus avellana* L.) Depending on Variety and Harvest Date. *Molecules*, 25(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010043>
- Ramos-Escudero, F., Casimiro-Gonzales, S., Fernández-Prior, Á., Cancino Chávez, K., Gómez-Mendoza, J., Fuente-Carmelino, L. de la, & Muñoz, A. M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT*, 147, 111629. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111629>
- Sangeetha Karunanithi, Gnana Moorthy Eswaran, & Proshanta Guha. (2022). *Novel Cold Plasma Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Agricultural By-Products for the Food Industry*. <https://www.foodinfotech.com/novel-cold-plasma-assisted-extraction-of-bioactive-compounds-from-agricultural-by-products-for-the-food-industry/>
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl). <https://doi.org/10.1093/AJCN/81.1.215S>
- Shahidian, A., Afshar, H., Habibi, M. R., & Ghassemi, M. (2016). Therapeutic Nanostructures: Application of Mechanical Engineering in Drug Delivery. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*, 3–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47347-7.00001-X>
- Tang, X., Zhu, D., Huai, W., Zhang, W., Fu, C., Xie, X., Quan, S., & Fan, H. (2017). Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. *Separation and Purification Technology*, 175, 266–273. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2016.11.038>

- The history of chocolate* - Deanna Pucciarelli - YouTube. (2017). <https://www.youtube.com/watch?v=ibjUpk9Iagk>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Vichapong, J., Santaladchaiyakit, Y., Burakham, R., & Srijaranai, S. (2014). Cloud-point extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography for analysis of phenolic compounds and their antioxidant activity in Thai local wines. *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 664. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0556-0>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.04.014>
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., Babac, M., Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., & Babac, M. (2012). Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/27843>
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I. S., & Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2013.09.001>
- Xing, W., & Chen, L. (2013). Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration of bergenin from *Ardisia japonica*. *Separation and Purification Technology*, 110, 57–62. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2013.03.004>
- Zhou, J., Sun, J. B., Xu, X. Y., Cheng, Z. H., Zeng, P., Wang, F. Q., & Zhang, Q. (2015). Application of mixed cloud point extraction for the analysis of six flavonoids in *Apocynum venetum* leaf samples by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 273–279. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2015.01.003>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. Bin. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients* 2016, Vol. 8, Page 515, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/NU8080515>
- Καλαμπόκη, Η., & Μαγιάτης, Π. (2016). ΝΕΑ ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΝΘΑΛΗΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΑΣΙΝΗΣ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ NMR ΚΑΙ FOLIN-CIOCALTEU [ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ].
<https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/frontend/file/lib/default/data/1327598/theFile>

Μπαλαμώτη, Χ., & Ανδρικόπουλος, Ν. (2004). “Μικροσυστατικά σε ελληνικά βότανα και αφεψήματα” [ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ].
<https://estia.hua.gr/browse/1868>

Νταλέ Κατερίνα. (2023, January 6). *Ρεσβερατρόλη: Τι είναι, οφέλη, ιδιότητες, παρενέργειες - fmh.gr*. <https://www.fmh.gr/resveratrol/>

Ο κατακτητής του Μεξικού Ερνάν Κορτές - Newsbeast. (2013).
<https://www.newsbeast.gr/portrait/arthro/520844/o-kataktitis-tou-mexikou-ernan-kortes>

Παπαχρήστος Πάρης, & Κόκκαλη Αναστασία. (2006, March 12). *Κακάο, ποια είναι η διατροφική του αξία;* <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/1080-kakao-ena-ploysio-diatrofiko-afepsima>

Συρίμπεη, Χ., Καραθάνος, Β., Χίου, Α., & Καλιώρα, Α. (2006). *Μεταβολές στο αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και στην αντιοξειδωτική δράση ελληνικών λευκών κρασιών κατά την ωρίμανση Πτυχιακή Μελέτη Χρυσάνθη Συρίμπεη Τριμελής επιτροπή: Επιβλέπων Καθηγητής.*
<https://estia.hua.gr/file/lib/default/data/4142/theFile>

ΧΡΗΤΗ, Α., & ΒΑΡΖΑΚΑΣ, Θ. (2017). *Επεξεργασία κόκκων κακάο προς παραγωγή διαφορετικών ειδών σοκολάτας-νομοθεσία, διαθρεπτική αξία.* ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ.