



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Επιστήμης
Τροφίμων και Διατροφής

Πτυχιακή Εργασία με Θέμα:

**«Βελτιστοποίηση ανάκτησης αντιοξειδωτικών ουσιών από
υποπροϊόντα συγκομιδής βάμβακος (βλαστοί) με υδροαιθανολικά
μίγματα και αλκαλική κατάλυση»**

Φοιτήτριες: Ζαρνάβαλου Βασιλική Αικατερίνη (Α.Μ. : 2819004)

Παπαδημητρίου Γεωργία (Α.Μ. : 2819031)

Εισηγητής: Μακρής Δημήτρης , Αναπληρωτής καθηγητής

Καρδίτσα, 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βλαστοί βαμβακιού είναι το φυτικό υλικό που απομένει μετά τη συγκομιδή του καρπού του βαμβακιού και αποτελείται κυρίως από λιγνοκυτταρινική ύλη. Αυτό το υλικό έχει τη δυνατότητα να αποτελέσει πηγή οφέλιμων πολυφαινολικών ενώσεων. Στην παρούσα εργασία, διεξήχθη μια μελέτη για να προσδιοριστεί εάν μια διεργασία οργανικού διαλύματος με βάση την αιθανόλη και χρήση αλκαλικού περιβάλλοντος (υδροξείδιο του νατρίου/ανθρακικό νάτριο) θα μπορούσε να εκχυλίσει αποτελεσματικά τις πολυφαινόλες. Οι έρευνες για τη δριμύτητα της κατεργασίας έδειξαν ότι και οι δύο καταλύτες θα μπορούσαν να είναι το ίδιο αποτελεσματικοί στην ανάκτηση πολυφαινόλης, αν και δεν παρατηρήθηκε σταθερή συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της κατεργασίας και της συνολικής απόδοσης της πολυφαινόλης στις περισσότερες περιπτώσεις. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης και οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν και για τις δύο θεραπείες είναι συγκεντρώσεις καταλύτη 0,67% για το υδροξείδιο του νατρίου και 4% για το ανθρακικό νάτριο. Σε σταθερή θερμοκρασία 80°C και χρόνο παραμονής 300 λεπτά, οι επεξεργασίες με υδροξείδιο του νατρίου και ανθρακικό νάτριο απέδωσαν ολικές ποσότητες πολυφαινόλης $18,39 \pm 0,98$ και $15,57 \pm 1,85$ mg CAE g⁻¹ DM, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποκάλυψαν ότι η επεξεργασία που καταλύθηκε με ανθρακικό νάτριο, παρήγαγε εκχυλίσματα ιδιαίτερα πλούσια σε δύο υδροξυκινηματικά παράγωγα όπως το φερουλικό και το π-κουμαρικό οξύ, τα οποία εμφάνισαν επίσης ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι βλαστοί βαμβακιού ενδείκνυται να χρησιμεύσουν ως πολύτιμη πηγή λειτουργικών ενώσεων και η επεξεργασία του οργανικού διαλύματος με ήπια αλκαλικά καταλύσιμη αιθανόλη, υπόσχεται αποτελεσματικά εκχυλίσματα εμπλουτισμένα με υδροξυκινηματικά οξέα.

Abstract

Cotton stalks are the leftover plant material remaining after cottons' harvest which is consisting mainly of lignocellulosic material. This material holds potential as a source of beneficial polyphenolic compounds. To explore this potential, a study was conducted to determine whether an ethanol-based organosolv treatment could effectively extract polyphenols. Alkali catalysis was utilized, testing two catalysts, sodium hydroxide and sodium carbonate. Initial investigations into treatment severity indicated that both catalysts could be equally effective in polyphenol recovery, although no consistent correlation between treatment severity and total polyphenol yield was observed in most cases. Subsequent studies using response surface methodology identified optimized conditions for both treatments, recommending catalyst concentrations of 0.67% for sodium hydroxide and 4% for sodium carbonate. At a constant temperature of 80°C and residence time of 300 minutes, the treatments with sodium hydroxide and sodium carbonate yielded total polyphenol amounts of 18.39 ± 0.98 and 15.57 ± 1.85 mg CAE g⁻¹ DM, respectively. However, high-performance liquid chromatography analyses revealed that the sodium carbonate-catalyzed treatment produced extracts particularly rich in two hydroxycinnamate derivatives, ferulic and p-coumaric acid, which also exhibited enhanced antioxidant activity. These findings suggest that cotton stalks could serve as a valuable source of functional compounds, and mild alkali-catalyzed ethanol organosolv treatment holds promise for effectively extracting hydroxycinnamate-enriched extracts.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	
1.1. Βαμβάκι	6
1.1.1. Ιστορία	6
1.1.2. Το βαμβάκι ως φυτό – Ποικιλίες	6
1.1.3. Καλλιέργεια – Επεξεργασία	8
1.1.4. Προϊόντα Βαμβακιού	10
1.2. Υποπροϊόντα Βαμβακιού.....	11
1.2.1. Τα υποπροϊόντα βαμβακιού	11
1.2.2. Τρόποι επεξεργασίας υποπροϊόντων βαμβακιού.....	11
1.2.3. Συστατικά των υποπροϊόντων βαμβακιού	13
1.3. Πολυφαινόλες	15
1.3.1. Ορισμός – Χημική δομή	15
1.3.2. Φαινόλες.....	16
1.3.3. Υδροξυκινηματικά οξέα	17
1.3.4. π-κουμαρικό οξύ	17
1.3.5. Φερουλικό οξύ	18
1.3.6. Φλαβονοειδή – Φλαβανόλες	19
1.3.7. Αντιοξειδωτικά	20
1.4. Εκχύλιση – Τρόποι παραλαβής πολυφαινολικών ουσιών.....	21
1.4.1. Ορισμός	21
1.4.2. Μέθοδοι εκχύλισης – Εξοπλισμός	21
1.4.3. Διαλύτες.....	25
1.4.4. Πλεονεκτήματα των οργανικών διαλυτών.....	27
1.4.5. Τρόποι βελτιστοποίησης εκχύλισης	28
2. Υλικά και μέθοδοι	
2.1. Χημικά.....	31
2.2. Βλαστοί βαμβακιού.....	31
2.3. Επεξεργασία με υδροαλκοολικά διαλύματα υπό αλκαλική κατάλυση.....	32

2.4.	Εξέταση με βάση την δριμύτητα	32
2.5.	Βελτιστοποίηση κατεργασίας με οργανικούς διαλύτες	33
2.6.	Μέτρηση απόδοσης ολικών πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής δράσης	34
2.7.	Χρωματογραφικοί προσδιορισμοί	34
2.8.	Στατιστικός χειρισμός και επεξεργασία	35
3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	
3.1.	Η δριμύτητα της κατεργασίας και η επίδραση του καταλύτη	35
3.2.	Βελτιστοποίηση κατεργασίας	38
3.3.	Πολυφαινολική σύνθεση	42
3.4.	Αντιοξειδωτική δράση	45
4.	Συμπεράσματα	46
5.	Βιβλιογραφία	47

1. Εισαγωγή

1.1.Βαμβάκι

1.1.1. Ιστορία

Το βαμβάκι ή cotton (στα αγγλικά από το αραβικό *quoton*) χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως για την παραγωγή υφασμάτων και γενικότερα ινών. Παγκόσμια, η συγκεκριμένη καλλιέργεια λαμβάνει χώρα σε σχεδόν 75 χώρες και συμβάλλει σημαντικά στον οικονομικό προϋπολογισμό των χωρών αυτών [28]. Η ιστορία της βαμβακοκαλλιέργειας είναι τουλάχιστον 3000 ετών αλλά γενικά οι πρώτες καλλιέργειες βαμβακιού έχουν χρονολογηθεί κοντά στο 7000 π.Χ. στην ινδική υποήπειρο, όπου οι άγριες ποικιλίες βαμβακιού εξημερώθηκαν για τις πολύτιμες ίνες τους. Η καλλιέργεια του βαμβακιού εξαπλώθηκε σταδιακά σε άλλες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της Μέσης Ανατολής και της Αφρικής, μέσω του εμπορίου. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι ήταν από τους πρώτους πολιτισμούς που αναγνώρισαν την οικονομική και πολιτιστική σημασία του βαμβακιού [33].

Η ιστορία του βαμβακιού πήρε μια μεταμορφωτική τροπή κατά την Εποχή της Εξερεύνησης και τον αποικισμό της Αμερικής. Οι Ευρωπαίοι άποικοι ανακάλυψαν γηγενείς ποικιλίες βαμβακιού στον Νέο Κόσμο και αναγνώρισαν τις οικονομικές του δυνατότητες. Η καλλιέργεια βαμβακιού εισήχθη στον αμερικανικό νότο και το κλίμα της περιοχής αποδείχθηκε ιδανικό για την καλλιέργεια. Η βιομηχανία βαμβακιού άνθισε με την εφεύρεση των εκκοκκιστηρίων από τον Eli Whitney το 1793, που ανέπτυξε δραματικά την επεξεργασία των ινών βαμβακιού. Αυτή η καινοτομία αύξησε σημαντικά την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού των σπόρων από τις ίνες, καθιστώντας τη μεγάλης κλίμακας παραγωγή βαμβακιού πιο βιώσιμη. Η παγκόσμια ζήτηση για το βαμβάκι συνέχισε να αυξάνεται, μετατρέποντάς το σε ζωτικό αγαθό τον 19ο και τον 20ο αιώνα, διαμορφώνοντας σε ένα βαθμό την οικονομία και τις εμπορικές σχέσεις παγκοσμίως [6,55].

1.1.2. Το βαμβάκι ως φυτό – Ποικιλίες

Το βαμβάκι είναι η πιο γνωστή καλλιεργήσιμη ίνα και ανήκει στην οικογένεια Malvaceae, το γένος *Gossypium* και έχει περίπου 50 διαφορετικά είδη. Τα είδη που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια είναι το *Gossypium hirsutum* L. το οποίο κατέχει περισσότερο από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής βαμβακιού, το *Gossypium barbadense* L. (Αιγυπτιακό βαμβάκι), το *Gossypium herbaceum* L. (Ασιάτικο βαμβάκι) και το *Gossypium arboreum* L. (Ασιάτικο βαμβάκι) [28].

Το συγκεκριμένο φυτό είναι αρκετά ευαίσθητο και η ανάπτυξή του επηρεάζεται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες. Η συνεχής έκθεση του φυτού

σε αντίξοες συνθήκες έχει αρνητικές επιπτώσεις όπως μειωμένη ανάπτυξη, αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και της αναπαραγωγής [36].



Εικόνα 1 : Ποικιλία βαμβακιού *Gossypium hirsutum* L. [33].

Το *Gossypium hirsutum* L., κοινώς γνωστό ως Upland cotton, συνήθως εμφανίζεται ως θάμνος με μια καλά καθορισμένη δομή διακλάδωσης. Οι ινώδεις μίσχοι του φυτού του δίνουν σταθερότητα και στήριξη, επιτρέποντάς του να αντέχει σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως ο άνεμος και η βροχή. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του *Gossypium hirsutum* είναι τα φύλλα του, τα οποία είναι πλατιά και σε σχήμα καρδιάς. Αυτά εναλλάσσονται κατά μήκος των στελεχών του φυτού, παρέχοντας άφθονη επιφάνεια για φωτοσύνθεση και απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Η διάταξη των φύλλων επιτρέπει να γίνει αποτελεσματική φωτοσύνθεση η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του φυτού. Τα λουλούδια του συνήθως ανθίζουν σε ομάδες κατά μήκος των κλαδιών του. Τα άνθη είναι σχετικά μικρά και απαραίτητα για τον αναπαραγωγικό κύκλο του φυτού καθώς περιέχουν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα, διευκολύνοντας την επικονίαση και την επακόλουθη ανάπτυξη των σπόρων [28,47].

Το *Gossypium barbadense* L., κοινώς γνωστό ως βαμβάκι Pima ή αιγυπτιακό βαμβάκι, είναι ένα είδος βαμβακιού που φημίζεται για τις εξαιρετικής ποιότητας ίνες του. Το *Gossypium barbadense* είναι ένας πολυετής θάμνος που αναπτύσσεται κάθετα φτάνοντας σε ύψος έως και περίπου δύο μέτρα. Χαρακτηριστικό της ανάπτυξής του είναι ο εύρωστος κεντρικός βλαστός που διακλαδίζεται σε μικρότερους μίσχους, δημιουργώντας τη θαμνώδη εμφάνιση. Αυτό το μοτίβο ανάπτυξης επιτρέπει στο φυτό να υποστηρίξει αποτελεσματικά το βάρος των αναπτυσσόμενων ανθών και του φυλλώματος του. Οι μίσχοι του *Gossypium barbadense* είναι ινώδεις και στιβαροί, παρέχοντας δομική υποστήριξη στο φυτό. Τα φύλλα του είναι πλατιά και ωοειδή, με μυτερές και οδοντωτές άκρες. Διατάσσονται εναλλάξ κατά μήκος των μίσχων και εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες στη φωτοσύνθεση και τη διαπνοή. Τα άνθη γονιμοποιούνται από έντομα, κυρίως μέλισσες, που μεταφέρουν τη γύρη μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών αναπαραγωγικών οργάνων των λουλουδιών [28,47].



Εικόνα 2 : Ποικιλία βαμβακιού *Gossypium barbadense* L. [33].



Εικόνα 3 : Ποικιλία βαμβακιού *Gossypium herbaceum* L. [33].

Το *Gossypium herbaceum* L., κοινώς γνωστό ως βαμβάκι Levant ή ινδικό βαμβάκι. Τυπικά παρουσιάζεται ως θάμνος, αν και μπορεί ορισμένες φορές να εμφανίζει μοτίβο ανάπτυξης που μοιάζει με αυτό του αμπελιού. Η ανάπτυξη του διακρίνεται από ένα κεντρικό βλαστό που δημιουργεί πολυάριθμα κλαδιά, με αποτέλεσμα μια πυκνή και θαμνώδη εμφάνιση. Τα φύλλα του βαμβακιού Levant είναι πλατιά και λοβωτά, με τρεις έως πέντε λοβούς ανά φύλλο και είναι τοποθετημένα εναλλάξ κατά μήκος των μίσχων ώστε να εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες στη φωτοσύνθεση και τη διαπνοή. Οι ίνες που παράγονται είναι σχετικά κοντές σε σύγκριση με εκείνες άλλων ειδών βαμβακιού, με τυπικό μήκος περίπου ένα έως δύο εκατοστά [28,47]

Το *Gossypium arboreum* L., είναι κοινώς γνωστό ως βαμβάκι δέντρων. Είναι ένας πολυετής θάμνος ή μικρό δέντρο που αναπτύσσεται κατά ύψος, φτάνοντας από 2 έως 3 μέτρα. Η ανάπτυξη του χαρακτηρίζεται από ένα ενιαίο κύριο βλαστό από το οποίο αναδύονται πολλαπλά κλαδιά, δημιουργώντας ένα απλωμένο θόλο φυλλώματος. Οι ξυλώδεις μίσχοι του φυτού παρέχουν δομική στήριξη και σταθερότητα, επιτρέποντάς του να αντέχει στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Οι μίσχοι του είναι ξυλώδεις και σχετικά εύρωστοι σε σύγκριση με αυτούς των υπόλοιπων ειδών βαμβακιού. Τα φύλλα του είναι σχετικά μικρά σε σύγκριση με τα άλλα είδη βαμβακιού και εναλλάσσονται από τρίλοβα ή πεντάλοβα φύλλα με οβάλ σχήμα. [28,47].



Εικόνα 4 : Ποικιλία βαμβακιού *Gossypium arboreum* L. [33].

1.1.3 Καλλιέργεια – Επεξεργασία

Η καλλιέργεια του βαμβακιού περιλαμβάνει διάφορα στάδια, από την προετοιμασία του εδάφους έως τη συγκομιδή. Πιο συγκεκριμένα, πριν από τη φύτευση του βαμβακιού, οι αγρότες κάνουν διάφορες κατεργασίες προετοιμασίας του εδάφους για να δημιουργήσουν βέλτιστες συνθήκες. Αυτό συνήθως περιλαμβάνει το όργωμα του χωραφιού, για τη διάσπαση του συμπιεσμένου εδάφους και τη βελτίωση του αερισμού, καθώς και την ισοπέδωσή του για να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του νερού [30].

Το βαμβάκι είναι μια καλλιέργεια θερμής εποχής που ευδοκimeί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15°C έως 35°C κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Απαιτεί συνθήκες χωρίς παγετό για επιτυχημένη καλλιέργεια. Ιδανικά, οι θερμοκρασίες θα πρέπει να είναι σταθερά ζεστές για να προάγουν τη βλάστηση, την ανάπτυξη και την καρποφορία. Σε περιοχές με ψυχρότερα

κλίματα, οι αγρότες μπορούν να επιλέξουν ποικιλίες βαμβακιού μικρής περιόδου που μπορούν να ωριμάσουν σε μικρότερο χρονικό διάστημα ανάπτυξης [3].

Η επιλογή της ποικιλίας του βαμβακιού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι συνθήκες καλλιέργειας και οι τελικές χρήσεις για τις οποίες προορίζεται. Αναλυτικότερα, το είδος *Gossypium hirsutum* L. (Upland Cotton) είναι γνωστό για την προσαρμοστικότητά του σε ένα ευρύ φάσμα κλιμάτων και τύπων εδάφους. Μπορεί να ευδοκιμήσει σε εύκρατες και υποτροπικές περιοχές με καλά στραγγιζόμενα εδάφη. Ακόμη, απαιτεί επαρκή υγρασία καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, ιδιαίτερα κατά τα στάδια της ανθοφορίας και της ανάπτυξης των καρπών [17].

Παράλληλα, το είδος *Gossypium barbadense* L. καλλιεργείται κυρίως σε περιοχές με ζεστές θερμοκρασίες, άφθονο ηλιακό φως και καλά στραγγιζόμενο έδαφος. Το βαμβάκι Pima φυτεύεται συνήθως την άνοιξη, παρόμοια με το βαμβάκι Upland, αλλά μπορεί να έχει μεγαλύτερη περίοδο ανάπτυξης λόγω του βραδύτερου ρυθμού ωρίμανσης. Η πυκνότητα και η απόσταση φύτευσης προσαρμόζονται ανάλογα, ώστε να ευδοκιμή η καλύτερη ανάπτυξη των φυτών, να βελτιστοποιείται η ροή του αέρα και η διείσδυση του ηλιακού φωτός. Η επαρκής άρδευση είναι επίσης απαραίτητη για την καλλιέργεια [30].

Επιπρόσθετα, το *Gossypium herbaceum* L. φυτεύεται συνήθως την άνοιξη ή στις αρχές του καλοκαιριού, ανάλογα με τις τοπικές κλιματικές συνθήκες. Γενικά ισχύουν παρόμοιες πρακτικές διαχείρισης με το *Gossypium hirsutum* L. , ωστόσο, το βαμβάκι Levant μπορεί να έχει συγκεκριμένες απαιτήσεις για το pH του εδάφους και τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών, τα οποία θα πρέπει να αντιμετωπιστούν μέσω δοκιμών εδάφους και τροποποιήσεων, όπως απαιτείται [30].

Ομοίως, το *Gossypium arboreum* L. είναι προσαρμοσμένο σε ζεστά, υποτροπικά κλίματα και συχνά καλλιεργείται σε περιοχές με μεγάλες, ζεστές περιόδους ανάπτυξης. Μπορεί να είναι πιο ανεκτικό σε ξηρές συνθήκες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη βαμβακιού, όμως το καλό πότισμα εξακολουθεί να είναι απαραίτητο σε άνυδρες ή ημίξηρες περιοχές. Ακόμα, το *Gossypium arboreum* L. μπορεί να ωφεληθεί από περιστασιακό κλάδεμα για την αφαίρεση των νεκρών ή κατεστραμμένων κλαδιών και την ενθάρρυνση της νέας ανάπτυξης. Το κλάδεμα μπορεί επίσης να βοηθήσει στη διαχείριση του μεγέθους των φυτών και στη βελτίωση της ροής του αέρα εντός του θόλου, μειώνοντας τον κίνδυνο μυκητιακών ασθενειών [30].

Μετά την επιλογή της κατάλληλης ποικιλίας ακολουθεί το στάδιο της σποράς κατά το οποίο προσδιορίζεται το βέλτιστο ποσοστό σπόρων με βάση το μέγεθός τους, τη μέθοδο φύτευσης και τον επιθυμητό πληθυσμό φυτών ανά στρέμμα. Η σωστή απόσταση μεταξύ των φυτών είναι σημαντική, ώστε να αφήσει στα φυτά χώρο να αναπτυχθούν και να διευκολυνθεί η μηχανική συγκομιδή. Μετά τη φύτευση, παρακολουθείται τακτικά το χωράφι για σημάδια ανάδυσης, εμφάνιση παρασίτων και ζιζανίων ώστε να καταπολεμηθούν έγκαιρα [30].

Στην συνέχεια, έπεται η φάση ανάπτυξής του, η οποία ξεκινάει από την στιγμή που βλαστάνει ο σπόρος έως και την έναρξη την ανθοφορίας των καρπών. Τα διάφορα αυτά στάδια είναι διακριτά και χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες φυσιολογικές και μορφολογικές αλλαγές. Στο αρχικό στάδιο της βλάστησης, ο σπόρος απορροφά νερό

και διογκώνεται. Ύστερα, το φυτό επικεντρώνεται στην ανάπτυξη των φύλλων, των βλαστών, και τη δημιουργία ενός γερού ριζικού συστήματος. Η βλαστική ανάπτυξη είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία της φωτοσυνθετικής ικανότητας και των ενεργειακών αποθεμάτων του φυτού [30].

Ακολουθεί το στάδιο της παραγωγής των οφθαλμών, οποίοι στη συνέχεια θα εξελιχθούν σε άνθη. Μετά την επικονίαση, το λουλούδι κλείνει και αρχίζει να εξελίσσεται σε καρπό. Οι καρποί του βαμβακιού ονομάζονται καρύδια. Όταν τα καρύδια ωριμάσουν, τα καρπόφυλλα σχίζονται στο σημείο όπου ενώνονται ενώ παράλληλα το σύσπορο βαμβάκι (σπόροι και ίνες) παραμένει στη βάση τους. Η καλή συγκράτηση του σύσπορου είναι επιθυμητή ώστε να αποφευχθούν τυχόν απώλειες λόγω δυσμενών καιρικών συνθηκών όπως η βροχή ή ο δυνατός αέρας. Αντίθετα, η υπερβολική συγκράτηση είναι ανεπιθύμητη διότι δυσκολεύει τη συγκομιδή [3].

Ο χρόνος συγκομιδής ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του βαμβακιού, το τοπικό κλίμα και την ημερομηνία φύτευσης. Το βαμβάκι συλλέγεται συνήθως όταν οι καρποί έχουν φτάσει σε πλήρη ωριμότητα και έχουν αρχίσει να ανοίγουν, αποκαλύπτοντας τις λευκές ίνες στο εσωτερικό. Σε πολλές περιοχές, η συγκομιδή ξεκινά στα τέλη του καλοκαιριού ή στις αρχές του φθινοπώρου. Υπάρχουν κυρίως δύο μέθοδοι συγκομιδής βαμβακιού, η μηχανική συγκομιδή η οποία είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη και η χειροκίνητη συγκομιδή η οποία χρησιμοποιούταν παλιότερα κατά κόρον ή χρησιμοποιείται ακόμα σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου δεν υπάρχει ακόμα ο κατάλληλος εξοπλισμός [3].

1.1.4. Προϊόντα βαμβακιού

Το βαμβάκι είναι μια από τις πιο ευέλικτες και ευρέως χρησιμοποιούμενες φυσικές ίνες στον κόσμο. Μετά τον εκκοκκισμό αντιστοιχούν περίπου στο 35%-40% του συνολικού εκκοκκισμένου βαμβακιού κατά βάρος. [17] Τα κύρια συστατικά των ινών βαμβακιού είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η λιγνίνη, αλλά περιέχουν και άλλες χημικές ενώσεις και συστατικά σε μικρότερες ποσότητες που έχουν επίσης ρόλο στη δομή, τα χαρακτηριστικά και την προσαρμοστικότητα των ινών. Οι τεχνικές επεξεργασίας των ινών βαμβακιού ποικίλουν με στόχο τη μεγιστοποίηση των δυνατοτήτων τους για ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών χρήσεων και σε αυτές ανήκουν ο διαχωρισμός των ινών βαμβακιού από τον βαμβακόσπορο, ο καθαρισμός τους μέσω διαδικασιών λαναρίσματος και χτενίσματος και τέλος η κλώση και η ύφανση τους που τις μετατρέπει σε νήμα ή ύφασμα.

Οι ίνες βαμβακιού αποτελούν κύρια πρώτη ύλη για ποικίλα προϊόντα σε διάφορες βιομηχανίες και χρησιμοποιείται κυρίως στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας και ένδυσης για την κατασκευή ενδυμάτων και υφασμάτων [20]. Είναι πολύτιμο για την απαλότητα και την άνεσή του, καθιστώντας το ιδανικό για καθημερινή χρήση. Ακόμη είναι κατάλληλο για οικιακά υφάσματα λόγω της άνεσης και της αντοχής του και ταυτόχρονα είναι κατάλληλο για προϊόντα ιατρικής και προσωπικής φροντίδας λόγω των υποαλλεργικών ιδιοτήτων και της απορροφητικότητας του ενώ δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί η χρήση του σε

βιομηχανικές και τεχνικές εφαρμογές λόγω της απορροφητικότητας και των θερμομονωτικών ιδιοτήτων του [17].

Η ποιότητα του συλλεγόμενου βαμβακιού, συμπεριλαμβανομένου του μήκους, της αντοχής και της ομοιομορφίας των ινών, επηρεάζει την καταλληλότητά του για διάφορες τελικές χρήσεις και την αξία που έχει στην αγορά. Με προσεκτική διαχείριση κάθε σταδίου από την επιλογή της καταλληλότερης ποικιλίας έως τον χειρισμό μετά τη συγκομιδή και το εκκοκκισμό, η τελική αξία του βαμβακιού μπορεί να μεγιστοποιηθεί όπως και η ποιότητά του, καθιστώντας την καλλιέργεια βαμβακιού κερδοφόρα. Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι το βαμβάκι είναι βιοαποικοδομήσιμο, καθιστώντας το μια φιλική προς το περιβάλλον επιλογή σε σύγκριση με τις συνθετικές ίνες που προέρχονται από πετροχημικά. Τα προϊόντα βαμβακιού αποσυντίθενται φυσικά με την πάροδο του χρόνου, μειώνοντας τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και συμβάλλοντας στις παγκόσμιες προσπάθειες για αύξηση της βιωσιμότητας [20,58].

1.2. Υποπροϊόντα βαμβακιού

1.2.1. Τα υποπροϊόντα βαμβακιού

Το βαμβάκι είναι μια καλλιέργεια με πολλές χρήσεις και η επεξεργασία του αποδίδει ποικίλα υποπροϊόντα. Μεταξύ των πιο σημαντικών υποπροϊόντων του είναι ο βαμβακόσπορος, από τον οποίο μπορεί να εξαχθεί λάδι και άλλα παραπροϊόντα για ποικίλες χρήσεις, οι βλαστοί του φυτού βαμβακιού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορους τρόπους, όπως για την παραγωγή χαρτιού και επίπλων, ως πηγή βιομάζας για παραγωγή ενέργειας καθώς και ως λίπασμα στη γεωργία από τα απόβλητα εκκοκκισμού του βαμβακιού [1,17].

1.2.2. Τρόποι επεξεργασίας υποπροϊόντων βαμβακιού

➤ Βαμβακόσπορος

Ο βαμβακόσπορος είναι το κύριο υποπροϊόν του εκκοκκισμένου βαμβακιού, αποτελώντας το 55% του συνόλου του και η επεξεργασία του συνεπάγεται με την παραλαβή χρήσιμων παραπροϊόντων. Αρχικά, οι ίνες βαμβακιού διαχωρίζονται από το βαμβακόσπορο με μια διαδικασία που ονομάζεται εκκοκκισμός, η οποία αφαιρεί αποτελεσματικά τις ίνες από τον σπόρο χρησιμοποιώντας μηχανικές μεθόδους. Ο βαμβακόσπορος υποβάλλεται στη συνέχεια σε απολέπιση προκειμένου να εξαλειφθούν τυχόν υπολείμματα ινών και να βελτιωθεί η ποιότητα του σπόρου για τα επόμενα στάδια επεξεργασίας. Το βαμβακέλαιο είναι ένα από τα κύρια προϊόντα που παρασκευάζονται από βαμβακόσπορο και χρησιμοποιείται ευρέως σε μια ποικιλία ειδών διατροφής, μαγειρικής και βιομηχανικής χρήσης. Ο καθαρισμός, η αφαίρεση του περιβλήματος, το μαγείρεμα, η συμπίεση, η εκχύλιση, ο εξευγενισμός και η

συσκευασία είναι μερικές από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην εξαγωγή βαμβακέλαιου.

Επιπλέον, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες και της θρεπτικής του αξίας, το άλευρο βαμβακόσπορου [54], που προκύπτει από την άλεση του υπολειπόμενου υλικού του σπόρου μετά την εξαγωγή του λαδιού, χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή. Χρησιμοποιώντας διαδικασίες όπως εκχύλιση με διαλύτη, καθίζηση, φυγοκέντρηση και διήθηση, γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα άλλα συστατικά του βαμβακόσπορου. Το προϊόν απομονωμένης πρωτεΐνης που προκύπτει, είναι ένα θρεπτικό συστατικό που μπορεί να προστεθεί σε μια ποικιλία προϊόντων διατροφής. Γενικά, οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία του βαμβακόσπορου είναι ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα των επιχειρήσεων βαμβακιού, καθώς εξάγουν πολύτιμα αγαθά όπως λάδι και ζωοτροφές, ενώ ταυτόχρονα παράγονται λιγότερα απορρίμματα [17,24].

➤ Βλαστοί βαμβακιού

Το φυτικό υλικό που απομένει μετά τη συγκομιδή του βαμβακιού είναι ο βλαστός βαμβακιού. Αποτελεί περίπου το 10% του συνολικού εκκοκκισμένου βαμβακιού κατά βάρος [17] και μπορεί να υποστεί επεξεργασία με διάφορους τρόπους για να αυξηθεί η αξία αυτού του γεωργικού υποπροϊόντος. Οι βλαστοί βαμβακιού θεωρούνται γενικά ως γεωργικά απόβλητα, αν και στην πραγματικότητα περιέχουν χρήσιμα συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διάφορους τρόπους [45].

Παράλληλα, οι βλαστοί βαμβακιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιοκαύσιμα όπως η βιοαιθανόλη και το βιοέλαιο μέσω βιοχημικών ή θερμοχημικών διαδικασιών όπως η αεριοποίηση και η πυρόλυση. Η ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης και ημικυτταρίνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία βιοχημικής μετατροπής, η οποία μετέπειτα μπορεί να παράξει βιοκαύσιμο.

Οι ίνες κυτταρίνης που βρίσκονται στους βλαστούς βαμβακιού είναι εξαιρετικές για την παραγωγή χαρτοπολτού και χαρτιού. Στους βλαστούς βαμβακιού γίνεται ο διαχωρισμός των ινών κυτταρίνης από τη λιγνίνη και άλλων συστατικών χρησιμοποιώντας μηχανικές ή χημικές τεχνικές πολτοποίησης. Ακόμη, οι μοριοσανίδες και οι ινοσανίδες μέσης πυκνότητας (MDF) μπορούν να κατασκευαστούν, από βλαστούς βαμβακιού ως πρώτη ύλη. Οι βλαστοί βαμβακιού μπορούν να υποστούν επεξεργασία σε μικρότερα σωματίδια και να συνδυαστούν με ρητίνες για να δημιουργήσουν ελαφριά και ισχυρά σύνθετα πάνελ που χρησιμοποιούνται στους τομείς επίπλων, κατασκευών και συσκευασίας. Τέλος, οι βλαστοί βαμβακιού μπορούν να κομποστοποιηθούν για την παραγωγή οργανικού λιπάσματος ή τροποποίησης εδάφους για γεωργικούς σκοπούς. Οι μεμβράνες, τα βιοπλαστικά και τα υλικά συσκευασίας είναι μερικά μόνο από τα βιοαποδομήσιμα προϊόντα που μπορούν να κατασκευαστούν από τους βλαστούς βαμβακιού, μειώνοντας το περιβαλλοντικό αντίκτυπο του προϊόντος και υποστηρίζοντας την κυκλική οικονομία.

Η χρήση των βλαστών βαμβακιού για την παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί μια υποσχόμενη προοπτική. Στους βλαστούς του βαμβακιού περιέχονται φυσικές πλούσιες πηγές χημικών ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες οι οποίες έχουν ευρύ

φάσμα δραστηριοτήτων. Αυτές οι ενώσεις προσελκύουν το ενδιαφέρον για τις πολλαπλές τους δράσεις, περιλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, των αντιφλεγμονωδών, των αντικαρκινικών και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, η αξιοποίηση αυτών των ενώσεων μπορεί να παρέχει νέες δυνατότητες στον τομέα της υγείας και της βιοτεχνολογίας [17].

➤ *Απορρίμματα εκκοκκισμού βαμβακιού*

Η επεξεργασία των απορριμμάτων εκκοκκισμού βαμβακιού περιλαμβάνει τη μετατροπή των απορριμμάτων που παράγονται κατά τη διαδικασία εκκοκκίσματος σε πολύτιμους πόρους μέσω διαφόρων μεθόδων. Αυτό το υπόλειμμα τυπικά περιλαμβάνει φύλλα, βλαστούς, κοντές ίνες και άλλα υπολείμματα που απομένουν μετά τον διαχωρισμό του χνουδιού και των σπόρων. Ενώ αυτά τα υλικά θεωρούνται συνήθως απόβλητα, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν με περιβαλλοντικά επωφελείς τρόπους. Μια κοινή προσέγγιση είναι η κομποστοποίηση, όπου τα απορρίμματα εκκοκκισμού βαμβακιού αναμειγνύονται με άλλη οργανική ύλη για να δημιουργηθεί κομπόστ πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά για την ενίσχυση του εδάφους. Άλλες μέθοδοι είναι η μετατροπή τους σε ενέργεια από βιομάζα, όπως πέλλετ ή μπρικέτες, μέσω πυρόλυσης ή αεριοποίησης, η εξαγωγή κυτταρίνης για χρήση σε βιομηχανίες όπως το χαρτί και τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης ή της χημικής επεξεργασίας και τέλος η χρήση αυτών ως σκευάσματα ζωοτροφών για την παροχή φυτικών ινών και θρεπτικών συστατικών [17].

1.2.3. *Συστατικά των υποπροϊόντων βαμβακιού*

➤ *Βαμβακόσπορος*

Η βιομηχανική και διατροφική σημασία του βαμβακόσπορου προέρχεται από ένα ευρύ φάσμα συστατικών και χημικών ενώσεων. Μεταξύ αυτών είναι το βαμβακέλαιο, το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι μια εξαιρετική πηγή διαιτητικών λιπαρών, ιδιαίτερα ελαϊκού οξέος (ωμέγα-9) και λινολεϊκού οξέος (ωμέγα-6). Η πρωτεΐνη είναι το επόμενο βασικό συστατικό και αποτελεί περίπου το 20-25% του βάρους του. Ο φλοιός του βαμβακόσπορου αποτελείται κυρίως από φυτικές ίνες και πιο συγκεκριμένα κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Γενικά στο φυτό του βαμβακιού αλλά ιδιαίτερα στο βαμβακόσπορο, οι χρωστικοί αδένες περιέχουν μια φυσική πολυφαινολική χημική ουσία που ονομάζεται γκοσσυπόλη, η οποία λειτουργεί ως φυσικός φραγμός ενάντια σε μολύνσεις και παράσιτα. Η γκοσσυπόλη είναι δηλητηριώδης για μονογαστρικά θηλαστικά, όπως τον άνθρωπο και τα μη μηρυκαστικά ζώα. Για τον λόγο αυτό χρειάζεται να εξαλειφθεί ή να μειωθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές επεξεργασίας όπως η εκχύλιση με διαλύτη και η θερμική επεξεργασία, καθιστώντας τον βαμβακόσπορο αποδεκτό για τη διατροφή των ζώων. Στο βαμβακέλαιο, που είναι παραπροϊόν της επεξεργασίας του βαμβακόσπορου, περιέχονται τοκοφερόλες και φυτοστερόλες οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη και βοηθούν στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης

αντίστοιχα. Τέλος, άλλες θρεπτικές ουσίες που περιέχει ο βαμβακόσπορος σε πολύ μικρότερη ποσότητα είναι τα μέταλλα, οι βιταμίνες και οι υδατάνθρακες [23,24].

➤ *Βλαστοί βαμβακιού*

Οι βλαστοί βαμβακιού περιέχουν ποικιλία συστατικών και χημικών ενώσεων που συμβάλλουν στη σύνθεση και τις πιθανές εφαρμογές του. Αυτά τα στοιχεία μπορεί να διαφέρουν βάσει μεταβλητών όπως ο τύπος του βαμβακιού, οι τεχνικές καλλιέργειας και οι διαδικασίες μετά τη συγκομιδή. Τα κύρια στοιχεία των βλαστών είναι η κυτταρίνη, ένα σύνθετο πολυμερές υδατανθράκων, που αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του ξηρού του βάρους και χρησιμεύει ως δομικό στοιχείο. Έπειτα, η ημικυτταρίνη είναι ένας ακόμα πολυσακχαρίτης και πιο ποικιλόμορφος σχετικά με τη σύνθεση και τη δομή από την κυτταρίνη και στοχεύει στην ευκαμψία των κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα κενά στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών μεταξύ κυτταρίνης και ημικυτταρίνης είναι γεμάτα με λιγνίνη, ένα πολύπλοκο αρωματικό πολυμερές, χαρίζοντας στους βλαστούς βαμβακιού δομική σταθερότητα και αντοχή στο νερό και αυξάνοντας την ανθεκτικότητά. Οι ώριμοι βλαστοί βαμβακιού έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε λιγνίνη, η οποία τους δίνει την ξυλώδη αίσθηση. Το πρωτεύον και το μεσαίο έλασμα των φυτικών κυττάρων περιέχουν τον σύνθετο υδατάνθρακα πηκτίνη, η οποία λειτουργεί ως δομικός παράγοντας, δηλαδή ενώνει γειτονικά κύτταρα και ενισχύει τη γενική συνοχή των φυτικών ιστών. Επιπρόσθετα περιέχουν, πρωτεΐνες και αμινοξέα, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με άλλα τα υπόλοιπα μέρη του φυτού, όπως οι σπόροι και τα φύλλα. Τέλος, οι βλαστοί βαμβακιού περιέχουν μέταλλα και ιχνοστοιχεία τα οποία τα απορροφούν κατά την ανάπτυξή τους [17,45].

➤ *Απορρίμματα εκκοκκισμού βαμβακιού*

Τα απορρίμματα εκκοκκισμού βαμβακιού περιλαμβάνουν μια ποικιλία συστατικών και ουσιών που προέρχονται τόσο από το ίδιο το φυτό βαμβακιού όσο και από τη διαδικασία εκκοκκισμού. Σε αυτά τα στοιχεία ανήκουν η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η λιγνίνη και διάφορες οργανικές ενώσεις. Επιπλέον, τα απορρίμματα εκκοκκισμού βαμβακιού ενδέχεται να διατηρήσουν υπολειμματικές ποσότητες φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων και άλλων γεωργικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά την καλλιέργεια βαμβακιού. Ενώ η ακριβής σύνθεση των απορριμμάτων εκκοκκισμού βαμβακιού μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες, όπως οι μέθοδοι καλλιέργειας και οι διαδικασίες εκκοκκισμού, γενικά περιλαμβάνει άφθονο οργανικό υλικό και ουσίες που προέρχονται από κυτταρίνη. Ο κατάλληλος χειρισμός και η επανατοποθέτηση τους μπορεί να διευκολύνει την ανάκτηση πολύτιμων πόρων, ενώ παράλληλα μετριάζουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις [17].

1.3. Πολυφαινόλες

1.3.1. Ορισμός - Χημική δομή

Οι πολυφαινόλες είναι ουσίες οι οποίες βρίσκονται σε διάφορα φυτικά προϊόντα όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, το κακάο, το πράσινο και το μαύρο τσάι και για τον λόγο αυτό υπάρχει και ο συνώνυμος όρος «φυτικές φαινόλες». Στη φύση, οι φαινολικές ουσίες συνήθως συνδέονται με σάκχαρα ή οργανικά οξέα με τη μορφή γλυκοζιδίων [11]. Το 1994 ο βρετανός χημικός Edwin Haslam επέκτεινε τους ορισμούς των Bate-Smith, Swain και White και τον απέδωσε ως εξής : «ο όρος «πολυφαινόλες» θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την περιγραφή υδατοδιαλυτών φυτοφαινολικών ενώσεων με μοριακές μάζες που κυμαίνονται από 500 έως 3000-4000 Da και διαθέτουν 12 έως 16 φαινολυδροξύ ομάδες σε πέντε έως επτά αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000 Da σχετικής μοριακής μάζας» [46].

Οι κοινές κατηγορίες πολυφαινολών περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή - όπως οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβανόνες και οι ανθοκυανίνες-, τα φαινολικά οξέα - όπως υδροξυβενζοϊκά οξέα και υδροξυκινναμικά οξέα-, τα στυλβένια -όπως η ρεσβερατρόλη- και λιγνάνες. Κάθε κατηγορία πολυφαινολών έχει τη δική της μοναδική χημική δομή και βιολογικές ιδιότητες[37]. Έως τώρα στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις και γενικότερα είναι γνωστές περισσότερες από 8000 πολυφαινόλες.

Το πιο πολυσυζητημένο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η δυνατότητά τους να αντιδρούν με δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}$, H_2O_2 , $^1O_2$, $HOCl$, καθώς και ελεύθερες ρίζες $RO^{\cdot}$ που δημιουργούνται με οξειδωση $^{\cdot}$ και $ROO^{\cdot}$, ενώσεις οι οποίες πιθανότατα έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών αναφέρεται συνήθως ως η βασική τους ιδιότητα που βασίζεται στην πρόληψη ή/και τη μείωση των χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και των διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η καρκινογένεση, ο νευροεκφυλισμός, καθώς και γήρανση του δέρματος. Σημειώνεται ότι η δομική ποικιλομορφία των φυτικών πολυφαινολών είναι μεγάλη και ότι ο τρόπος με τον οποίο έχουν την δυνατότητα να αλληλοεπιδρούν (συγκεκριμένα ή όχι) με τις πρωτεΐνες, εξαρτάται έντονα τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όσο και από τα πρωτεϊνικά τους χαρακτηριστικά [46].

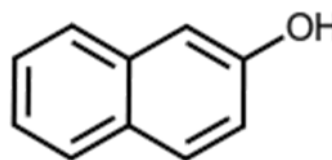
Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν απορροφώνται όλες οι πολυφαινόλες το ίδιο αποτελεσματικά. Οι επιπτώσεις των πολυφαινολών στην υγεία εξαρτώνται τόσο από την ποσότητα που καταναλώνεται όσο και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα περιλαμβάνουν το μοριακό μέγεθος, τη διαλυτότητα, την πολικότητα και τη σταθερότητα. Επιπλέον, η παρουσία γλυκοζυλίωσης ή άλλων συζεύξεων μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς απορρόφησης. Συμπληρώνεται ότι οι περισσότερες πολυφαινόλες που βρίσκονται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοσιδίων ή πολυμερών δεν έχουν την ικανότητα να απορροφηθούν στη φυσική τους μορφή. Μεταβολίζονται εκτενώς από εντερικά και ηπατικά ένζυμα και από την εντερική μικροχλωρίδα. Μόλις απορροφηθούν, οι πολυφαινόλες εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται σε διάφορους ιστούς και

όργανα. Η γνώση της βιοδιαθεσιμότητας και του μεταβολισμού των διαφόρων πολυφαινόλων είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της βιολογικής τους δραστηριότητας [37].

Η περιεκτικότητα των φυτών σε πολυφαινόλες εξαρτάται όχι μόνο από το είδος και την ποικιλία του, αλλά και από άλλους παράγοντες όπως τους περιβαλλοντικούς, το στάδιο ωρίμανσης τη στιγμή της συγκομιδής, την επεξεργασία και την αποθήκευση. Η αποθήκευση επηρεάζει την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες που οξειδώνονται εύκολα. Οι αντιδράσεις οξείδωσης έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό περισσότερο ή λιγότερο πολυμερισμένων ουσιών, οι οποίες οδηγούν σε αλλαγές στην ποιότητα των τροφίμων, ιδιαίτερα στο χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά [37].

1.3.2. Φαινόλες

Η έννοια του χημικού όρου «φαινόλη» περιλαμβάνει τον δακτύλιο αρενίου και τους υδροξυ υποκαταστάτες του. Οι φαινόλες μπορούν να θεωρηθούν σταθεροποιημένα ταυτομερή ενόλης με μαλακό πυρηνόφιλο χαρακτήρα, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε σκληρότερα πυρηνόφιλο με αποπρωτονίωση φαινολικών ανιόντων. Οι φαινόλες και τα φαινολικά ανιόντα είναι επίσης ευαίσθητα στις διαδικασίες οξείδωσης. Η σχετικά ασθενής ενέργεια διάστασης δεσμού του φαινολικού δεσμού O-H επιτρέπει την παραγωγή φαινοξυ ριζών ($\text{PhO}^\cdot$) με άντληση υδρογόνου [11].

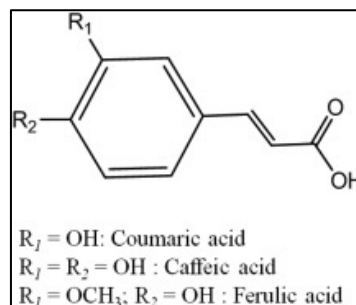


Εικόνα 5 : Χημική δομή της φαινόλης [27].

Τα φαινολικά οξέα είναι η πιο σημαντική ομάδα βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν σε διάφορες πηγές τροφίμων. Διακρίνονται σε παράγωγα υδροξυβενζοϊκού και υδροξυκινναμικού οξέος [14]. Αν και τα φαινολικά οξέα είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, οι ρίζες φαινοξυλίου που παράγονται κατά τη διάρκεια της ενζυμικής διαδικασίας ή των μηχανισμών άμεσης δέσμευσης ριζών, μπορούν να εμφανίσουν προοξειδωτικές δραστηριότητες. Η δράση αυτή αναφέρεται ότι είναι ευεργετική για τις κυτταροτοξικές δραστηριότητες καθώς μπορούν να επιδείξουν εκλεκτική κυτταροτοξικότητα προς τα καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας δραστικά είδη οξυγόνου. Η αντιοξειδωτική ή η προ-οξειδωτική συμπεριφορά των φαινολικών οξέων αναφέρεται ότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τα δομικά χαρακτηριστικά, συγκεντρώσεις, παρουσία μετάλλων κ.λπ. [16].

1.3.3. Υδροξυκινναμικά οξέα

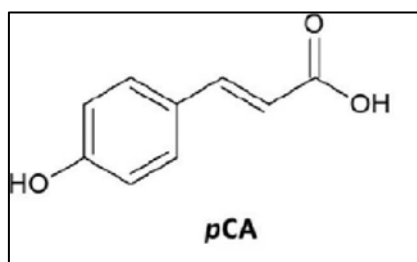
Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι πιο κοινά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και αποτελούνται κυρίως από το *p*-κουμαρικό, το *o*-κουμαρικό, το *m*-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το κινναμικό και το σιναιπικό οξύ. Τα οξέα αυτά, σε ελάχιστες περιπτώσεις βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή[16]. Συνήθως υπάρχουν σε γλυκοζυλιωμένες δεσμευμένες μορφές ή ως εστέρες κινικού, σικιμικού και τρυγικού οξέος [37]. Ακόμη, είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά, αποτελεσματικοί δεσμευτές των ελεύθερων ριζών και έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων [52].



Εικόνα 6: Χημική δομή υδροξυκινναμικού οξέος και τα παράγωγά του [14].

Τα ελεύθερα υδροξυκινναμικά οξέα απορροφώνται εύκολα και γρήγορα σε όλο το γαστρεντερικό σωλήνα. Υδρολύονται ως εστέρες ή δεσμεύονται στα κυτταρικά τοιχώματα, από πεπτικές εστεράσες πριν από την απορρόφηση. Η βιοδιαθεσιμότητα των υδροξυκινναμικών οξέων εξαρτάται από το υπόστρωμα από το οποίο προσλαμβάνονται, καθώς και από το εάν λαμβάνονται ως ελεύθερη ή εστεροποιημένη μορφή. Κατά την απορρόφηση, μεταβολίζονται εκτενώς κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στο λεπτό έντερο και στο κόλον, με θείωση, *O*-μεθυλίωση/απο-*O*-μεθυλίωση, γλυκουρονίωση, υδρογόνωση/αφυδρογόνωση, ισομερισμό, αφυδροξυλίωση και σύζευξη γλυκίνης. Η *O*-μεθυλίωση και η θείωση φαίνεται να είναι η προτιμώμενη οδός του μεταβολισμού των υδροξυκινναμικών οξέων τόσο στα γαστρεντερικά όσο και στα ηπατικά κύτταρα [49].

1.3.4. *p*-κουμαρικό οξύ



Εικόνα 7: Χημική δομή *p*-κουμαρικού οξέος [29].

Το *p*-κουμαρικό οξύ, επίσης γνωστό και ως 4-υδροξυκινναμικό οξύ, είναι ένας τύπος υδροξυκινναμικού οξέος, το οποίο ανήκει σε μια κατηγορία φαινολικών ενώσεων ευρέως διανεμημένη στα φυτά. Υπάρχει τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή στους φυτικούς ιστούς. Η χημική του δομή αποτελείται από έναν δακτύλιο φαινυλίου με μια ομάδα υδροξυλίου και μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος στη θέση πάρα μεταξύ τους. Η συγκεκριμένη του δομή είναι υπεύθυνη για τις αντιοξειδωτικές, τις αντιφλεγμονώδεις και τις αντικαρκινικές ιδιότητες. Ο μεταβολισμός του *p*-κουμαρικού οξέος υφίσταται κυρίως στο ήπαρ, μέσω διαφόρων οδών, συμπεριλαμβανομένης της γλυκουρονιδίωσης, της θείωσης και της οξείδωσης. Οι μεταβολίτες του *p*-κουμαρικού οξέος απεκκρίνονται στα ούρα και τη χολή. Η βιοδιαθεσιμότητα του εξαρτάται από παράγοντες όπως η πηγή του, η διατροφική πρόσληψη και ο μεταβολισμός ενώ φαίνεται πως όταν βρίσκεται σε άθικτη μορφή, απορροφάται γρηγορότερα από τον οργανισμό [22,52].

Επιπροσθέτως, έχει μελετηθεί για τον πιθανό ρόλο του στη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι το π-κουμαρικό οξύ μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και της αρτηριακής πίεσης, στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και στην προστασία από τη βλάβη του DNA. Λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων και των πιθανών πλεονεκτημάτων για την υγεία, το π-κουμαρικό οξύ χρησιμοποιείται σε διάφορες εφαρμογές τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων [22,34,51].

1.3.5. Φερουλικό οξύ

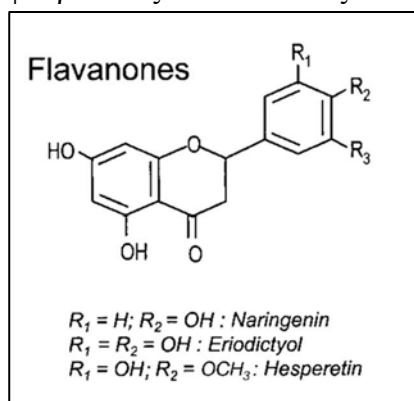
Το φερουλικό οξύ, γνωστό και ως 4-υδροξυ-3-μεθοξυκινναμικό οξύ, είναι μια φαινολική ένωση ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο. Ανήκει στην ομάδα του υδροξυκινναμικού οξέος και δομικά σχετίζεται με το π-κουμαρικό οξύ. Η χημική του δομή αποτελείται από ένα τμήμα υδροξυκινναμικού οξέος με ένα δακτύλιο φαινυλίου, μια ομάδα υδροξυλίου και μια ομάδα μεθοξυλίου.

Έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες έρευνες οι οποίες δείχνουν ότι το φερουλικό οξύ μπορεί να προσφέρει πολλά οφέλη για την υγεία. Ένα από αυτά είναι ο πιθανός ρόλος του στην προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά επιπλέον, μπορεί να βοηθήσει στη ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και να προσφέρει νευροπροστατευτική δράση μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή στον εγκέφαλο. Το φερουλικό οξύ αναφέρεται ότι ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση όχι μόνο με τη δέσμευση των ελεύθερων ριζών, αλλά και με την αναστολή των διαφορετικών ενζύμων που εμπλέκονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών [16].

Στον άνθρωπο, το φερουλικό οξύ απορροφάται στο λεπτό έντερο και ο μεταβολισμός του λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ. Μεταβολίζεται και απεκκρίνεται με τον ίδιο τρόπο με το π-κουμαρικό οξύ. Η βιοδιαθεσιμότητα του φερουλικού οξέος εξαρτάται από παράγοντες όπως η πηγή του, η διατροφική πρόσληψη και ο μεταβολισμός. Επίσης, το φερουλικό οξύ χρησιμοποιείται σε ποικιλία εφαρμογών στον τομέα των τροφίμων και των φαρμάκων λόγω των αντιοξειδωτικών του ικανοτήτων και των οφελειών που έχει στην ανθρώπινη υγεία [52].

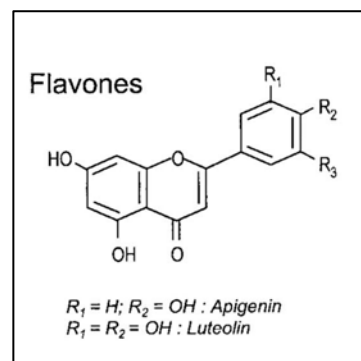
1.3.6. Φλαβονοειδή – Φλαβανόλες

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από 2 αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο (δακτύλιος C). Τα ίδια μπορούν να χωριστούν σε 6 υποκατηγορίες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες, τις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβανόλες [37]. Σε σύγκριση με τις φλαβονόλες και τις φλαβανόνες, οι φλαβόνες έχουν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα, η οποία δείχνει να σχετίζεται με ευκολότερη απορρόφηση από τον εντερικό σωλήνα. Οι φλαβονόλες είναι ενώσεις που περιέχουν 2-φαινυλ-3-

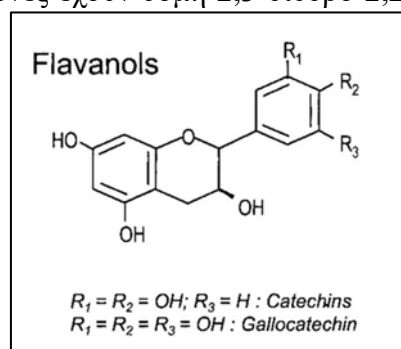


Εικόνα 9 : Χημική δομή φλαβανονών [46].

υδροξυλ (ή υποκατεστημένη με οξυγόνο) βενζογανυλ-πυρανόνη (2-φαινυλ-3-υδροξυ-χρωμογόνες κετόνες). Είναι η πιο άφθονη και ευρέως διαδεδομένη ένωση φλαβονοειδών. Είναι συνήθως πιο δραστικές από τις φλαβόνες, με την προϋπόθεση ότι η 3-υδροξυ ομάδα στον δακτύλιο C τους παραμένει μη γλυκοζυλιωμένη [46]. Σύμφωνα με τις θέσεις των φαινολικών υδροξυλομάδων, οι φλαβονόλες μπορούν να χωριστούν σε κερσετίνη, καμπερόλη και μυρικετίνη. Η κερσετίνη είναι η πιο διαδεδομένη και σημαντική φλαβονόλη στο φυτικό βασίλειο. Δεδομένου ότι τα φλαβονοειδή στη φύση σπάνια υπάρχουν σε ελεύθερη μορφή, η κερσετίνη υπάρχει κυρίως με τη μορφή γλυκοσιδών, συγκεκριμένα της ρουτίνης. Οι φλαβανόνες έχουν δομή 2,3-διυδρο-2,2-φαινυλοχρωμοκετόνη-4-1. Ακολούθως, η βασική δομή της ισοφλαβόνης είναι παρόμοια με αυτή των φλαβονών και των φλαβονολών, αλλά διαθέτουν έναν μοναδικό σκελετό ισοφλαβόνης, που αποτελείται από δύο δακτυλίους βενζολίου που ενώνονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρανίου. Είναι γνωστά για την οιστρογονική τους δράση καθώς δρουν ως φυτοοιστρογόνα στο σώμα δεσμεύοντας τους υποδοχείς οιστρογόνων και ασκώντας επιδράσεις που μοιάζουν με οιστρογόνα. Ακόμη, η τυπική δομή της ανθοκυανίνης είναι παρόμοια με αυτή των πολυφαινολών, δηλαδή C₆ – C₃ – C₆ επίπεδων μορίων, που συμμορφώνεται με τη βασική δομή του γενικού τύπου. Γενικά, υπάρχουν πολύ λίγες ελεύθερες ανθοκυανίνες, οι οποίες συχνά εμφανίζονται μέσω σχηματισμού γλυκοσιδικού δεσμού. Η δομική ποικιλομορφία των ανθοκυανινών βασίζεται σε περισσότερες από 30 αγλυκόνες - ανθοκυανιδίνες με τις κυριότερες στα τρόφιμα να είναι η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη και η πελαργονιδίνη, οι οποίες διαφέρουν ως προς το μοτίβο υδροξυλίωσης και μεθυλίωσης του φλαβονοειδούς σκελετού, το οποίο επηρεάζει την χρωματική χροιά που κυμαίνεται από πορτοκαλί-



Εικόνα 8 : Χημική δομή της φλαβόνης [37].



Εικόνα 10 : Χημική δομή φλαβανολών και παραγώγων του [37].

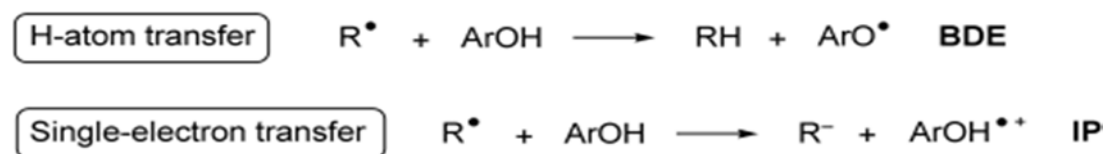
ερυθρό (πελαργονιδίνη) σε κυανό-βιολετί (δελφινιδίνη) [11]. Η δομική διαφορά μεταξύ φλαβανολών και φλαβανονών είναι ότι η καρβονυλική ομάδα αφαιρείται από τον C4. Οι αντιπροσωπευτικές ουσίες των φλαβανολών είναι η κατεχίνη (C), η επικατεχίνη (EC), η επιγαλλοκατεχίνη, η γαλάτη και οι προανθοκυανιδίνες. Σε αντίθεση με άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, οι φλαβανόλες δεν γλυκοζυλιώνονται στα τρόφιμα [37].

1.3.7. Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που βοηθούν στην εξουδετέρωση των βλαβερών επιπτώσεων των ενεργών δραστικών μορφών οξυγόνου και των ελεύθερων ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου, σταθεροποιώντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέποντας το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και τους ιστούς. Τόσο οι άνθρωποι όσο και τα φυτά διαθέτουν αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς για την εξουδετέρωση των ROS και την πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης αλλά με διαφορετικό τρόπο. Στους ανθρώπους οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν κυρίως ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και λιγότερο μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη, οι βιταμίνες C και E και τα φυτοχημικά. Αντίθετα, τα φυτά έχουν αναπτύξει κυρίως εξειδικευμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις για την αντιμετώπιση των ROS όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα (π.χ. το φερουλικό οξύ) και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Έχουν προταθεί δύο αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Ο πρώτος βασίζεται στην ικανότητα της λειτουργικής ομάδας της φαινόλης να δίνει ένα άτομο υδρογόνου σε μια ελεύθερη ρίζα $R\cdot$, όπως οι ρίζες υπεροξυ $LOO\cdot$ που δημιουργούνται κατά την αυτοοξείδωση των λιπιδίων (LH) (υπεροξείδωση, $LH \rightarrow L\cdot$, μετά $L\cdot + 3 O_2 \rightarrow LOO\cdot$). Σε αυτή την περίπτωση, οι πολυφαινόλες δρουν ως αντιοξειδωτικά που σπάνε την αλυσίδα. Μέσω του συγκεκριμένου μηχανισμού μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT), το ίδιο το φαινολικό αντιοξειδωτικό (ArOH) γίνεται μια ελεύθερη ρίζα ($ArO\cdot$). Η αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης βασίζεται ουσιαστικά στην ταχύτητα της μεταφοράς του ατόμου H στο $LOO\cdot$ ($ArOH + LOO\cdot \rightarrow ArO\cdot + LOOH$) και σχετικά με τη σταθερότητα της προκύπτουσας ρίζας φαινοξυ $ArO\cdot$, το οποίο δεν θα πρέπει ούτε να αντιδράσει ξανά με το LOOH ούτε να αντιδράσει με το υπόστρωμα LH, τερματίζοντας έτσι τη διάδοση της ριζικής αλυσιδωτής αντίδρασης ($LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$). Η ευκολία σχηματισμού και η σταθερότητα του $ArO\cdot$ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα δομικά χαρακτηριστικά της αρχικής ένωσης ArOH. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες είναι η παρουσία, ο αριθμός και η σχετική θέση των επιπρόσθετων φαινολικών υδροξυ ομάδων, η εμπλοκή τους στο σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, και η διαμορφωτικά εξαρτώμενη δυνατότητα να επιτρέπεται η ηλεκτρονική μετεγκατάσταση σε όλο το μέρος του μορίου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη BDE του φαινολικού δεσμού O-H: και όσο πιο αδύναμος είναι ο δεσμός O-H, τόσο πιο εύκολη θα είναι η μεταφορά του ατόμου H. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (SET) από το ArOH σε μια ελεύθερη ρίζα $R\cdot$ με σχηματισμό ενός σταθερής κατιονικής ρίζας $ArOH^{+\cdot}$. Το δυναμικό ιοντισμού (IP) του ArOH είναι επομένως μια άλλη φυσικοχημική παράμετρος για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής

αποτελεσματικότητας των φυτικών πολυφαινολών με κριτήριο ότι όσο χαμηλότερη είναι η BDE , τόσο πιο εύκολη είναι η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου [46].



Εικόνα 11: Η μεταφορά ατόμου υδρογόνου (HAT) και η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (SET) είναι οι κύριοι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι φυτικές πολυφαινόλες εκφράζουν την αντιοξειδωτική τους δράση που βασίζεται στη δέσμευση ριζών. Η ενέργεια διάστασης (BDE) και το δυναμικό ιονισμού (IP) της φαινόλης είναι οι δύο κύριες φυσικοχημικές παράμετροι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της πιθανής αποτελεσματικότητας κάθε διεργασίας, αντίστοιχα [37].

1.4. Εκχύλιση – Τρόποι παραλαβής πολυφαινολικών ουσιών

1.4.1. Ορισμός

Γενικά, η εκχύλιση είναι η διαδικασία χρήσης ενός κατάλληλου διαλύτη ή τεχνικής για την μετακίνηση ή την απομόνωση από μια φάση—όπως υγρή ή στερεή—σε άλλη—όπως αέριο ή υγρό ενός χημικού συστατικού ή από ένα μείγμα. Είναι μια βασική μέθοδος που χρησιμοποιείται σε πολλούς κλάδους, όπως η φαρμακολογία, η επιστήμη των τροφίμων, η βιοχημεία και η χημεία. Η εκχύλιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό διακριτών συστατικών ενός μείγματος ανάλογα με τη διαλυτότητά τους ή άλλα χαρακτηριστικά, ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό μιας επιθυμητής χημικής ουσίας.

1.4.2. Μέθοδοι εκχύλισης - Εξοπλισμός

Για την εξαγωγή των πολυφαινολών από φυτικές πηγές χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι - τεχνικές με βάση τις ιδιότητες των πολυφαινολών και του φυτικού υποπροϊόντος στο οποίο περιέχονται. Στον τομέα των τεχνικών εκχύλισης, διακρίνονται οι συμβατικές τεχνικές, όπως η διαβροχή, η διήθηση, η μηχανική εκχύλιση με συμπίεση, η εκχύλιση μέσω Soxhlet και η απόσταξη, καθώς και οι μη συμβατικές τεχνικές ή αλλιώς καινοτόμες, όπως η εκχύλιση με υπερήχους (UAE), η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (SFE), εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE), εκχύλιση με επιταχυνόμενο διαλύτη (ASE) και υποβοηθούμενη εκχύλιση με ένζυμα (EAE). Ορισμένες τυπικές τεχνικές για την εκχύλιση πολυφαινολών είναι [5] :

➤ Εκχύλιση στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού, που μερικές φορές αναφέρεται ως εκχύλιση με διαλύτη ή απλώς εκχύλιση, είναι μια δημοφιλής τεχνική για την αφαίρεση πολυφαινολών από φυτικές πηγές. Το λεπτόκοκκο φυτικό υλικό συνδυάζεται συνήθως

με έναν διαλύτη που επιλέγεται για την πολικότητα και την ικανότητά του να διαλύει πολυφαινόλες στη συγκεκριμένη εκχύλιση. Αρχικά, το φυτικό υλικό εμποτίζεται στον επιλεγμένο διαλύτη για να ξεκινήσει η διαδικασία εκχύλισης και αν είναι επιθυμητή η βελτίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του διαλύτη και του φυτικού υλικού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανάδευση. Μετά από κατάλληλη διάρκεια εκχύλισης, το μίγμα υφίσταται διήθηση προκειμένου να διακριθεί το υγρό εκχύλισμα από τα στερεά φυτικά υπολείμματα. Αφού αφαιρεθούν τα αδιάλυτα σωματίδια, αφήνεται πίσω ένα ακατέργαστο εκχύλισμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Για να γίνει απαλλαγή από τυχόν τελευταίους ρύπους ή υπολείμματα σωματιδίων, μπορούν να εφαρμοστούν στο εκχύλισμα και άλλες διαδικασίες καθαρισμού, όπως φυγοκέντρηση ή επιπλέον διήθηση. Για να αυξηθεί η συγκέντρωση πολυφαινολών ανά μονάδα όγκου, το πλούσιο σε πολυφαινόλες εκχύλισμα μπορεί να συμπυκνωθεί.

Η εκχύλιση στερεού-υγρού παρουσιάζει μια σειρά από πλεονεκτήματα για τις πολυφαινόλες, όπως ποικιλία επιλογής διαλυτών, επεκτασιμότητα για εμπορική παραγωγή και σχετικά απλή βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Ωστόσο, για να επιτευχθούν βιώσιμες και οικονομικές εργασίες παραλαβής πολυφαινολών, πρέπει να εξεταστούν προσεκτικά και να βελτιωθούν μεταβλητές, όπως η τοξικότητα των διαλυτών, η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες [39, 19].

➤ *Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE)*

Η εξαγωγή πολυφαινολών από φυτικές πηγές με χρήση εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE) θεωρείται μια καινοτόμος τεχνική. Χρησιμοποιώντας τις ειδικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών, για παράδειγμα το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), αυτή η μέθοδος εξάγει τις χημικές ουσίες-στόχους αποτελεσματικά και επιλεκτικά.

Στην συγκεκριμένη μέθοδο εκχύλισης, το CO_2 θερμαίνεται και πιέζεται σε ένα σημείο όπου εισέρχεται σε μια υπερκρίσιμη κατάσταση, η οποία ορίζεται από μια ισορροπία μεταξύ του ιξώδους που μοιάζει με αέριο και της πυκνότητας που μοιάζει με υγρό. Σε αυτή την κατάσταση, το CO_2 παρουσιάζει βελτιωμένη διαχυτικότητα και ικανότητα διαλυτοποίησης, γεγονός που το καθιστά εξαιρετικό διαλύτη για την εκχύλιση ποικίλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολών. Τα χαρακτηριστικά διαλυτοποίησης του CO_2 μπορούν να χειριστούν με ακρίβεια και να εξάγουν επιλεκτικά συγκεκριμένες πολυφαινόλες, ενώ αφαιρούν ανεπιθύμητα στοιχεία από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με την πίεση και τη θερμοκρασία. Αυτή η επιλεκτικότητα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη λήψη εκχυλισμάτων πολυφαινόλης υψηλής καθαρότητας. Επιπλέον, η SFE καθιστά δυνατή την εξαγωγή τόσο πολικών όσο και μη πολικών πολυφαινολών, προσφέροντας ευελιξία σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας τροφίμων, των διατροφικών προϊόντων και των φαρμάκων.

Επιπλέον, η SFE έχει μια σειρά από ευδιάκριτα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Ελαχιστοποιεί τη θερμική καταστροφή των ευαίσθητων στη θερμότητα πολυφαινολών λειτουργώντας σε πολύ ήπιες συνθήκες, συνήθως κάτω από 60°C . Επιπλέον, το CO_2 είναι μια ασφαλής και περιβαλλοντικά

ευνοϊκή επιλογή διαλύτη επειδή είναι εύκολα προσβάσιμο, μη τοξικό και μη εύφλεκτο. Επιπλέον, διασφαλίζει την καθαρότητα και την ασφάλεια του τελικού προϊόντος παράγοντας εκχυλίσματα χωρίς υπολείμματα διαλυτών. Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα, η SFE έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα και περιορισμούς. Η τεχνολογία της απαιτεί συγκεκριμένα όργανα και γνώσεις, που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα ένα κάπως υψηλό αρχικό κόστος εγκατάστασης. Επιπλέον, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, η κινητική εκχύλισης μπορεί να είναι πιο αργή, απαιτώντας μεγαλύτερης διάρκειας εκχυλίσσεις για να επιτευχθούν οι καλύτερες αποδόσεις [18,19].

➤ *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE)*

Προσφέροντας διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, η UAE έχει αναδειχθεί ως βιώσιμη τεχνολογία για την εξαγωγή πολυφαινολών από φυτικές πηγές. Το μείγμα διαλύτη-φυτικού υλικού επεξεργάζεται με υπερηχητικά κύματα, γεγονός που βελτιώνει την απόδοση της μεταφοράς της μάζας και κατ' επέκταση της εκχύλισης. Αυτή η διαδικασία καταστρέφει τα κυτταρικά τοιχώματα και αυξάνει την ποσότητα του διαλύτη που διεισδύει στους ιστούς των φυτών εκμεταλλευόμενος τις μηχανικές επιδράσεις των υπερήχων, όπως η σπηλαιώση, η μικροροή και η ακουστική ροή.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της UAE είναι η ικανότητα να μειώνει σημαντικά τους χρόνους εκχύλισης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές με ταυτόχρονη αύξηση της απόδοσης, ελαχιστοποίηση καταστροφής των θερμοευαίσθητων ουσιών και διατήρηση της θρεπτικής τους αξίας. Παράλληλα, επιτυγχάνει υψηλότερες αποδόσεις στοχευμένων ενώσεων λόγω της βελτιωμένης μεταφοράς μάζας που χρησιμεύουν στην ιατρική ή τα διατροφικά προϊόντα. Παρά τα οφέλη του, η UAE έχει και μειονεκτήματα. Προκειμένου να επιτευχθεί η απαιτούμενη απόδοση και επιλεκτικότητα, με ταυτόχρονη μείωση της κατανάλωσης ενέργειας και πιθανής βλάβης σε ευαίσθητα χημικά, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης είναι απαραίτητη. Η ευρεία χρήση της UAE μπορεί επίσης να παρεμποδιστεί από το κόστος του εξοπλισμού και την απαίτηση για εργαζόμενους με τις ανάλογες δεξιότητες, ειδικά σε μικρομεσαίες επιχειρήσεις.

Βέβαια, είναι αξιοσημείωτη για την επεκτασιμότητα και την προσαρμοστικότητα της. Αυτή η μέθοδος λειτουργεί καλά για μια ποικιλία βιομηχανιών, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών, επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών υλικών, όπως φρούτα, λαχανικά, βότανα και μπαχαρικά [5,2,19].

➤ *Εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (MAE)*

Για την εξαγωγή πολυφαινολών από ποικιλία φυτικών πηγών, η υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση (MAE) έχει δείξει ότι είναι πολλά υποσχόμενη. Χρησιμοποιώντας την ενέργεια των μικροκυμάτων για τη βελτίωση της διαδικασίας εκχύλισης, η MAE προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Στην συγκεκριμένη μέθοδο, το μείγμα διαλύτη-

φυτικού υλικού θερμαίνεται γρήγορα με ενέργεια μικροκυμάτων, η οποία ενθαρρύνει την απελευθέρωση πολυφαινολών από το υπόστρωμα του φυτού. Λόγω της εσωτερικής θερμότητας που παράγεται από την ενέργεια μικροκυμάτων, οι ρυθμοί μεταφοράς μάζας του δείγματος και η απόδοση εξαγωγής βελτιώνονται. Η MAE είναι μια αποδοτική τεχνολογία λόγω της γρήγορης και σταθερής θέρμανσης, η οποία μειώνει δραστηρικά τους χρόνους εξαγωγής σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους.

Κύριο πλεονέκτημα της MAE είναι η ικανότητά της να διατηρεί τις θερμοευαίσθητες πολυφαινόλες, επιτυγχάνοντας καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης. Ακόμη, η MAE έχει την δυνατότητα να διατηρεί τα βιοενεργά συστατικά του εκχυλίσματος και κατ' επέκταση των διατροφικών και θεραπευτικών πλεονεκτημάτων των πολυφαινολών. Παράλληλα, μπορεί να γίνει προσαρμογή των συνθηκών εκχύλισης και επιλογή ποικιλίας διαλυτών με στόχο την εκχύλιση συγκεκριμένων πολυφαινολών με διαφορετική πολικότητα. Συνήθως, χρησιμοποιείται λιγότερη ενέργεια και διαλύτης, γεγονός που μειώνει την ποσότητα των παραγόμενων αποβλήτων, την ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται και το αποτύπωμα άνθρακα. Από την άλλη πλευρά, τα μειονεκτήματά της είναι ότι για να βελτιωθεί η απόδοση της εκχύλισης και να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα, είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης, όπως η αναλογία δείγματος προς διαλύτη, ο τύπος διαλύτη, ο χρόνος εκχύλισης και η ισχύς μικροκυμάτων. Επιπλέον, απαιτείται προσεκτική παρατήρηση και μεταχείριση για την αποφυγή υπερθέρμανσης και καταστροφής των θερμοευαίσθητων ουσιών λόγω της πιθανότητας μη ομοιόμορφης θέρμανσης [5,2,19].

➤ *Εκχύλιση υπό πίεση (PLE)*

Η εκχύλιση υπό πίεση (PLE), είναι μια εξαιρετικά ανεπτυγμένη μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό ουσιών από διάφορες φυτικές πηγές. Στη την μέθοδο αυτή, προκειμένου να εκχυλιστούν κατάλληλα οι βιοδραστικές ουσίες, χρησιμοποιούνται υγροί οργανικοί διαλύτες σε εύρος πίεσης από 99-148atm και θερμοκρασίας από 50-200°C [60]. Παράλληλα, η επιλογή του διαλύτη γίνεται με βάση την πολικότητα της προς εκχύλιση ουσίας. Μετά την εκχύλιση, τα δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε μια ποικιλία αναλυτικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της φασματοφωτομετρίας και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), για ανάλυση και ποσοτικοποίηση. Τα τελικά εκχυλίσματα που παράγονται από την PLE είναι συχνά πολύ αποδοτικά, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα για πρόσθετη μελέτη τόσο σε βιομηχανίες τροφίμων όσο και σε βιομηχανίες φαρμάκων.

Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, η υγρή εκχύλιση υπό πίεση παρουσιάζει θετικά στοιχεία όπως η χρήση μικρότερης ποσότητας διαλύτη, οι μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης και η υψηλή απόδοση. Βέβαια, ένα σημαντικό μειονέκτημα που δεν μπορεί να παραληφθεί είναι το γεγονός ότι δεν κρίνεται τόσο κατάλληλη για περιπτώσεις όπου οι προς εκχύλιση ουσίες είναι θερμοευαίσθητες καθώς η υψηλή θερμοκρασία επιδρά αρνητικά τόσο στη δομή όσο και στην λειτουργικότητά τους [2,5,19,60].

➤ *Ενζυμική υποβοηθούμενη εκχύλιση (EAE)*

Η ενζυμική υποβοηθούμενη εκχύλιση (EAE) είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος που χρησιμοποιεί ένζυμα για τη βελτίωση της εξαγωγής πολυφαινολών από φυτικές πηγές. Μερικά από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η κυτταρινάση, η πηκτινάση, η πρωτεάση ή άλλες υδρολάσες με στόχο τη διαλυτοποίηση των δομικών φραγμών στα φυτικά κύτταρα και την απελευθέρωση των πολυφαινολών. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα πηκτινάσης διασπούν την πηκτίνη, τα ένζυμα κυτταρινάσης στοχεύουν ειδικά την κυτταρίνη, ένα σημαντικό συστατικό των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων και τα ένζυμα πρωτεάσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάσπαση τυχόν πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να εμποδίσουν τη διαδικασία εκχύλισης.

Η υποβοηθούμενη από ένζυμα εκχύλιση συνήθως απαιτεί μια σειρά από διαδικασίες. Αρχικά, το φυτικό υλικό υφίσταται επεξεργασία, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει ξήρανση και κονιορτοποίηση. Έπειτα, γίνεται η προσθήκη των ενζύμων στο φυτικό υλικό και ενός κατάλληλου διαλύτη και το δείγμα επωάζεται σε καθορισμένο pH και θερμοκρασία για να ενισχυθεί η δραστηριότητα των ενζύμων. Οι πολυφαινόλες απελευθερώνονται στον διαλύτη καθώς τα ένζυμα διασπούν τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, δημιουργώντας ένα εκχύλισμα βιοδραστικών ουσιών. Τέλος, το εκχύλισμα αφαιρείται από το υπόλοιπο φυτικό υλικό κυρίως μέσω φυγοκέντρησης.

Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, η ενζυμική εκχύλιση έχει μια σειρά από οφέλη, όπως ότι είναι συχνά πιο επιλεκτική, μειώνοντας την εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών ενώ επιτρέπει την εκχύλιση συγκεκριμένων πολυφαινολών. Επιπλέον, επειδή η ενζυμική εκχύλιση χρησιμοποιεί λιγότερη ενέργεια και δεν απαιτεί τοξικούς διαλύτες, συνήθως θεωρείται πιο φιλική προς το περιβάλλον από τις τεχνικές χημικής εκχύλισης [2,5]. Αντίθετα, τα αρνητικά της χαρακτηριστικά είναι ότι τα ένζυμα αποτελούν ακριβή πρώτη ύλη, τα διαθέσιμα στην αγορά ένζυμα δεν είναι τόσο αποτελεσματικά ως προς την υδρόλυση των φυτικών τοιχωμάτων με αποτέλεσμα να μειώνεται σε ένα βαθμό η απόδοση της εκχύλισης και τελευταίο είναι το γεγονός ότι αυτές οι εκχυλίσσεις χρειάζονται πολύ προσεκτικό πειραματικό σχεδιασμό αλλά και αρκετά εξειδικευμένα μηχανήματα [60].

1.4.3. Διαλύτες

Η αποτελεσματικότητα, η επιλεκτικότητα και η ποιότητα των εκχυλισμένων χημικών ουσιών επηρεάζονται σημαντικά από τον διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διαδικασία εκχύλισης ουσιών. Διάφοροι διαλύτες έχουν μοναδικές ιδιότητες και έχουν σχεδιαστεί για να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του αντίστοιχου φυτικού υλικού που επεξεργάζεται. Παρακάτω αναφέρονται οι διάφοροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση πολυφαινολών, δίνοντας έμφαση στα χαρακτηριστικά, τις χρήσεις και τους παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη μεγιστοποίηση των διαδικασιών εκχύλισης [8,19].

➤ *Νερό*

Το νερό είναι ένας πολικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως στην εκχύλιση πολυφαινολών, ιδιαίτερα για υδρόφιλες πολυφαινόλες όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Οι μέθοδοι εκχύλισης με βάση το νερό, διακρίνονται για την απλότητα, την οικονομική αποδοτικότητα και τη φιλική προς το περιβάλλον φύση τους. Επιπλέον, οι διεργασίες εκχύλισης με βάση το νερό προτιμώνται για τη λήψη εκχυλισμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες κατάλληλων για χρήση σε εφαρμογές τροφίμων και ποτών.

➤ *Αιθανόλη*

Η αιθανόλη είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους διαλύτες για την εκχύλιση πολυφαινόλης λόγω της ικανότητάς της να διαλύει ένα ευρύ φάσμα πολυφαινολικών ενώσεων. Είναι σχετικά ασφαλής, οικονομικά αποδοτική και άμεσα διαθέσιμη, καθιστώντας την κατάλληλη τόσο για εργαστηριακή έρευνα όσο και για μελέτες βιομηχανικής κλίμακας. Συχνά χρησιμοποιούνται μίγματα αιθανόλης-νερού διαφορετικών συγκεντρώσεων για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης εκχύλισης και της εκλεκτικότητας για διαφορετικές πολυφαινόλες.

➤ *Μεθανόλη*

Η μεθανόλη είναι ένας άλλος κοινώς χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την εκχύλιση πολυφαινόλης, που προσφέρει παρόμοιες ιδιότητες διαλυτότητας με την αιθανόλη. Η μεθανόλη είναι εξαιρετικά πολική και μπορεί να εξάγει αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα πολυφαινολικών ενώσεων από φυτικούς ιστούς. Ωστόσο, η τοξικότητα και η ευφλεκτότητά της εγείρουν ανησυχίες για την ασφάλεια, ιδιαίτερα σε βιομηχανικά περιβάλλοντα, απαιτώντας κατάλληλες πρακτικές χειρισμού.

➤ *Ακετόνη*

Η ακετόνη είναι ένας πολικός απρωτικός διαλύτης που χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση πολυφαινόλης, ειδικά σε μελέτες που απαιτούν ταχεία εκχύλιση ή διατήρηση θερμικά ασταθών ενώσεων. Η ακετόνη παρουσιάζει εξαιρετική διαλυτοποιητική ισχύ και μπορεί να εκχυλίσει αποτελεσματικά τις πολυφαινόλες ελαχιστοποιώντας την αποικοδόμηση. Ωστόσο, η έντονη οσμή και η ευφλεκτότητά της περιορίζουν την εφαρμογή της σε ορισμένες διαδικασίες εκχύλισης.

➤ *Οξικός αιθυλεστέρας*

Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι λιγότερο πολικός διαλύτης σε σύγκριση με την αιθανόλη και τη μεθανόλη, αλλά εξακολουθεί να είναι αποτελεσματικός στην εκχύλιση ορισμένων κατηγοριών πολυφαινολών, ιδιαίτερα μη πολικών ενώσεων όπως τα καροτενοειδή. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι σχετικά ασφαλής και έχει χαμηλό προφίλ τοξικότητας, καθιστώντας τον κατάλληλο για διεργασίες εκχύλισης όπου το εκχύλισμα δεν προορίζεται για προσθήκη σε τρόφιμα ή φάρμακα.

➤ *Διαλύτες (NADES)*

Οι διαλύτες (NADES) έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες για την εκχύλιση

πολυφαινόλης. Αποτελούμενο από φυσικές ενώσεις όπως σάκχαρα, αμινοξέα και οργανικά οξέα, το NADES προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως βιοσυμβατότητα, χαμηλή τοξικότητα, βιωσιμότητα και οικονομική απόδοση. Αυτοί οι διαλύτες παρουσιάζουν εξαιρετική διαλυτότητα για πολυφαινολικές ενώσεις και διευκολύνουν αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης. Επιπλέον, μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν μεταβάλλοντας τη σύνθεση των εξαρτημάτων για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης [25].

➤ *Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)*

Το DMSO είναι ένας εξαιρετικά πολικός απρωτικός διαλύτης με εξαιρετικές ιδιότητες διαλυτοποίησης για ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των πολυφαινολών. Οι μέθοδοι εκχύλισης με βάση το DMSO είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την εξαγωγή πολυφαινολών από φυτικούς ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό ή σύνθετα υποστρώματα λόγω της ικανότητάς του να διεισδύει στα κυτταρικά τοιχώματα και να διαλυτοποιεί αποτελεσματικά τις υδρόφιλες ενώσεις.

1.4.4. Πλεονεκτήματα των οργανικών διαλυτών

Οι οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται συχνά σε διαδικασίες εκχύλισης πολυφαινόλης, λόγω ορισμένων ευεργετικών ιδιοτήτων που κάνουν τις διεργασίες εκχύλισης πιο αποτελεσματικές και εστιασμένες. Αυτοί οι διαλύτες, περιλαμβάνουν οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη, μεθανόλη και αιθανόλη, οι οποίοι έχουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα [60]:

- *Ευελιξία:* Ένα ευρύ φάσμα πολυφαινολικών χημικών ουσιών, όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι τανίνες, μπορούν να διαλυθούν από οργανικούς διαλύτες λόγω της μεταβλητής πολικότητάς τους. Ανάλογα με τους στόχους τους, αυτή η προσαρμοστικότητα επιτρέπει στους ερευνητές να επικεντρωθούν σε συγκεκριμένες κατηγορίες πολυφαινολών ή να δημιουργήσουν σύνθετους συνδυασμούς πολυφαινολών.
- *Αποδοτικότητα:* Οι πολυφαινόλες είναι συχνά πολύ διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, γεγονός που προάγει αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης. Έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν φυτικούς ιστούς και κυτταρικά τοιχώματα, γεγονός που προάγει την απελευθέρωση των πολυφαινολών από το υπόστρωμα και αυξάνει τις αποδόσεις εκχύλισης.
- *Επιλεκτικότητα:* Οι ερευνητές μπορούν να ελαχιστοποιήσουν τη συνεκχύλιση ανεπιθύμητων μορίων, επιτυγχάνοντας μόνο την επιλεκτική εκχύλιση των επιθυμητών πολυφαινολών, επιλέγοντας προσεκτικά οργανικούς διαλύτες και συνθήκες εκχύλισης. Για την απόκτηση καθαρισμένων κλασμάτων πολυφαινόλης για πρόσθετη ανάλυση ή εφαρμογές, η επιλεκτικότητα είναι απαραίτητη.
- *Συμβατότητα με αναλυτικές τεχνικές:* Τα εκχυλίσματα πολυφαινόλης που προέρχονται από οργανικούς διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ποικίλες αναλυτικές μεθόδους, όπως φασματομετρία μάζας, φασματοφωτομετρία και

χρωματογραφία. Η ακριβής εκχύλιση πολυφαινόλης, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός από μια ποικιλία φυτικών πηγών διευκολύνονται μέσω της συμβατότητας αυτής.

- *Επεκτασιμότητα:* Οι τεχνικές εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες είναι κατάλληλες για διαδικασίες εκχύλισης βιομηχανικής κλίμακας στους τομείς των τροφίμων και των φαρμάκων επειδή μπορούν εύκολα να κλιμακωθούν για να χειριστούν μεγαλύτερους όγκους δειγμάτων.
- *Οικονομική απόδοση:* Όταν συγκρίνονται με άλλες τεχνικές εκχύλισης, οι οργανικοί διαλύτες είναι συχνά πιο οικονομικοί, παρέχοντας συμβιβασμό μεταξύ της απόδοσης εκχύλισης και της οικονομικής τιμής.

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη τυχόν πιθανά μειονεκτήματα της εκχύλισης οργανικών διαλυτών, όπως θέματα ασφάλειας, περιβαλλοντικές επιπτώσεις, η απαίτηση για κατάλληλη διάθεση διαλυτών και διαδικασίες διαχείρισης των απορριμμάτων.

1.4.5. Τρόποι βελτιστοποίησης εκχύλισης

Για να μεγιστοποιηθεί η απόδοση, η αποτελεσματικότητα και η ποιότητα της εκχύλισης πολυφαινόλης από φυτικές πηγές, η βελτιστοποίηση της εκχύλισης είναι απαραίτητη. Εκχυλίσματα πολυφαινόλης υψηλής ποιότητας μπορούν να παραχθούν βελτιστοποιώντας μια ποικιλία τεχνικών και μεταβλητών σε όλη τη διαδικασία εκχύλισης. Παρακάτω εξετάζονται οι σημαντικότεροι παράμετροι βελτιστοποίησης της εκχύλισης πολυφαινόλης:

➤ *Επιλογή διαλύτη*

Ένας σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας και της καθαρότητας των εκχυλισμένων πολυφαινολών είναι η επιλογή του διαλύτη για την προς εκχύλιση πολυφαινόλης. Η επιλογή του διαλύτη είναι κρίσιμη για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης, επειδή διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν διαφορετικές διαλυτότητες σε διαλύτες με διαφορετική πολικότητα. Οι κοινοί διαλύτες για την εκχύλιση πολυφαινόλης περιλαμβάνουν νερό, αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα. Ανάλογα με την πολικότητα της επιθυμητής πολυφαινόλης και του φυτικού υλικού που εκχυλίζεται, κάθε διαλύτης έχει ξεχωριστά πλεονεκτήματα.

Το νερό είναι ο καλύτερος διαλύτης για χρήση κατά την εκχύλιση υδατοδιαλυτών πολυφαινολών όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, αλλά οι οργανικοί διαλύτες όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη λειτουργούν καλά κατά την εκχύλιση μιας ευρύτερης ποικιλίας πολυφαινολών που έχουν μέτρια έως υψηλή πολικότητα. Το κόστος, η ασφάλεια, η συμβατότητα με τις μεταγενέστερες αναλυτικές διαδικασίες και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά

την επιλογή ενός διαλύτη. Για να επιτευχθεί βέλτιστη απόδοση εκχύλισης και να ληφθούν εκχυλίσματα πολυφαινόλης υψηλής ποιότητας, είναι τελικά κρίσιμο να γίνει επιλογή του σωστού διαλύτη ή μείγμα διαλυτών με βάση τις ιδιότητες των πολυφαινολών-στόχων και του φυτικού υλικού .

➤ *Χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης*

Στις μεθόδους εκχύλισης πολυφαινόλης, η βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης είναι κρίσιμης σημασίας, επειδή έχουν ουσιαστικό αντίκτυπο στην ποιότητα και την απόδοση των εκχυλισμάτων που προκύπτουν. Ο χρόνος που οι πολυφαινόλες απελευθερώνονται από το φυτικό υλικό στο διαλύτη εξαρτάται από το χρόνο εκχύλισης. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι εκχύλισης μπορούν να αυξήσουν την απόδοση των πολυφαινολών παρέχοντας αρκετό χρόνο για τη διάχυση της διαλυμένης ουσίας. Ωστόσο, οι υπερβολικά μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης μπορούν να υποβαθμίσουν τις ευαίσθητες στη θερμότητα πολυφαινόλες και να μειώσουν την ποιότητα του εκχυλίσματος. Έτσι, ο προσδιορισμός της ιδανικής περιόδου εκχύλισης απαιτεί εξισορρόπηση των αναγκών μείωσης της αποδόμησης και βελτιστοποίησης της παραγωγής της πολυφαινόλης.

Επίσης, με παρόμοιο τρόπο, η θερμοκρασία στην οποία εκχυλίζονται οι πολυφαινόλες επηρεάζει τη διαλυτότητά τους. Υψηλότερες θερμοκρασίες έχουν συνήθως μεγαλύτερη διαλυτότητα και αποτελεσματικότητα εκχύλισης. Βέβαια, οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες μπορούν επίσης να επιταχύνουν τη διάσπαση των πολυφαινολών, ειδικά εκείνων που είναι θερμικά ασταθείς. Ως εκ τούτου, η επιλογή μιας θερμοκρασίας που μεγιστοποιεί τη διαλυτότητα της πολυφαινόλης ενώ μειώνει τη θερμική αποικοδόμηση, είναι η διαδικασία βελτιστοποίησης της θερμοκρασίας εκχύλισης. Οι ερευνητές μπορούν να λάβουν τις καλύτερες αποδόσεις εκχύλισης πολυφαινόλης, διατηρώντας παράλληλα την ακεραιότητα και τη βιοδραστικότητα των εκχυλισμένων πολυφαινολών για ποικίλες χρήσεις, ρυθμίζοντας προσεκτικά αυτές τις δύο παραμέτρους.

➤ *Αναλογία στερεού προς διαλύτη*

Ένας κρίσιμος παράγοντας στην εκχύλιση πολυφαινόλης που επηρεάζει τόσο την απόδοση όσο και την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας είναι η αναλογία στερεού προς διαλύτη. Η αναλογία αυτή υποδηλώνει το ποσοστό στερεού φυτικού υλικού προς τον όγκο υγρού διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Οι υψηλότερες αναλογίες στερεού προς διαλύτη συνήθως οδηγούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος πολυφαινόλης, επειδή αυξάνουν την αλληλεπίδραση του διαλύτη με το φυτικό υλικό, γεγονός που διευκολύνει την απελευθέρωση πολυφαινολών. Ωστόσο, οι υπερβολικά υψηλή ποσότητα στερεού μπορεί να μειώσει την απόδοση εκχύλισης αυξάνοντας το ιξώδες και εμποδίζοντας τη διείσδυση του διαλύτη.

Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, η κινητική εκχύλισης και οι πρακτικές πτυχές όπως η χωρητικότητα του εξοπλισμού και ο χρόνος επεξεργασίας πρέπει να

εξισορροπούνται προκειμένου να καθοριστεί η ιδανική αναλογία στερεού προς διαλύτη. Οι δοκιμές διάφορων αναλογιών στερεού προς διαλύτη μπορούν να οδηγήσουν σε αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης και να αυξήσουν την παραγωγή πολυφαινόλης για μια σειρά χρήσεων σε τρόφιμα, φάρμακα και θεραπευτικά προϊόντα.

➤ *Μέγεθος σωματιδίων και προεπεξεργασία του δείγματος*

Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης πολυφαινόλης από φυτικό υλικό εξαρτάται από δύο κρίσιμους παράγοντες: το μέγεθος των σωματιδίων και την προεπεξεργασία του δείγματος. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης πολυφαινόλης αυξάνεται όταν το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται με τεχνικές όπως η άλεση, γεγονός που αυξάνει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με τον διαλύτη. Τα χαμηλότερα μεγέθη σωματιδίων αυξάνουν τη διείσδυση του διαλύτη και βοηθούν στην απελευθέρωση πολυφαινόλων από το φυτικό υλικό, γεγονός που αυξάνει τις αποδόσεις των εκχυλισμάτων πολυφαινόλης.

Επιπλέον, οι μέθοδοι προεπεξεργασίας δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένης της ξήρανσης με μικροκύματα, της ξήρανσης σε φούρνο και της κατάψυξης, βοηθούν στη διάσπαση των δομών των ιστών και των κυτταρικών τοιχωμάτων, γεγονός που ενθαρρύνει την απελευθέρωση πολυφαινόλων από τα φυτικά κύτταρα. Αυτές οι τεχνικές προεπεξεργασίας μειώνουν την πιθανότητα αποικοδόμησης της πολυφαινόλης κατά τη διαδικασία εκχύλισης ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής και της ποιότητας της πολυφαινόλης στις κατεργασίες εκχύλισης, είναι σημαντικό να μειωθεί το μέγεθος των σωματιδίων και να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες τεχνικές προ-επεξεργασίας των δειγμάτων.

➤ *Κριτήρια επιλογής μεθόδου εκχύλισης*

Για να διασφαλιστούν τα καλύτερα αποτελέσματα, η επιλογή της καλύτερης τεχνικής εκχύλισης για εκχύλιση πολυφαινόλης απαιτεί προσεκτική στάθμιση ορισμένων σημαντικών παραγόντων. Πρώτα και κύρια, οι ιδιότητες των πολυφαινόλων-στόχων και του φυτικού υλικού που εκχυλίζεται επηρεάζουν την επιλογή της μεθόδου εκχύλισης. Δεδομένου ότι διαφορετικές πολυφαινόλες έχουν διαφορετική πολικότητα, διαλυτότητα και ευαισθησία αποικοδόμησης, είναι σημαντικό να επιλέξετε μια τεχνική εκχύλισης που θα μεγιστοποιήσει την απαιτούμενη διαλυτότητα των πολυφαινόλων ενώ θα μειώσει την αποικοδόμησή τους.

Επιπλέον, κατά την επιλογή μιας μεθόδου, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη μεταβλητές όπως η απόδοση, η επιλεκτικότητα και η αποτελεσματικότητα εξαγωγής. Η υψηλή απόδοση εκχύλισης, η κινητική γρήγορης εκχύλισης και η ικανότητα εξαγωγής συγκεκριμένων πολυφαινόλων ή κατηγοριών πολυφαινόλων είναι επιθυμητά χαρακτηριστικά των τεχνικών εκχύλισης. Η επεκτασιμότητα, η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, η ασφάλεια και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις είναι περαιτέρω κρίσιμοι παράγοντες. Η λήψη μιας τεκμηριωμένης απόφασης σχετικά με την καλύτερη μέθοδο εκχύλισης για την εκχύλιση πολυφαινόλης απαιτεί τελικά μια προσεκτική

αξιολόγηση αυτών των παραγόντων υπό το φως των συγκεκριμένων στόχων και περιορισμών της μελέτης.

➤ *Βελτιστοποίηση μέσω πειραματικού σχεδιασμού (DOE)*

Η βελτιστοποίηση πειραματικού σχεδιασμού (DOE) είναι μια ισχυρή τεχνική για τον μεθοδικό προσδιορισμό των ιδανικών ρυθμίσεων εκχύλισης πολυφαινόλης. Μέσω του ελεγχόμενου χειρισμού διαφόρων παραμέτρων εκχύλισης, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, του τύπου διαλύτη, του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας στερεού προς διαλύτη, οι ερευνητές μπορούν να διερευνήσουν αποτελεσματικά τα περίπλοκα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης και να εντοπίσουν τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση πολυφαινόλης μέσω της χρήσης DOE. Το DOE καθιστά δυνατό τον εντοπισμό των ιδανικών συνθηκών εκχύλισης που αυξάνουν την παραγωγή πολυφαινόλης, την καθαρότητα και την ποιότητα, ενώ ελαχιστοποιούν την κατανάλωση πόρων και την πειραματική μεταβλητότητα μέσω στατιστικής ανάλυσης πειραματικών δεδομένων. Αυτή η μεθοδική προσέγγιση βοηθά στη δημιουργία αξιόπιστων και επαναλαμβανόμενων μεθόδων εκχύλισης για φυτικά υλικά πλούσια σε πολυφαινόλες, ενώ επιταχύνει επίσης τη διαδικασία βελτιστοποίησης και προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τους υποκείμενους μηχανισμούς εκχύλισης. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η DOE παρέχει μια διεξοδική και αποτελεσματική προσέγγιση για τη βελτίωση των διαδικασιών εκχύλισης πολυφαινόλης, προωθώντας καινοτομίες στην έρευνα και τις εφαρμογές πολυφαινόλης σε μια σειρά βιομηχανιών.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Χημικά

Η 2,4,6-Τρις(2-πυριδυλ)-s-τριαζίνη (TPTZ) ήταν από τη Fluka (Steinheim, Γερμανία). Το άνυδρο κιτρικό οξύ και ο εξαένυδρος χλωριούχος σίδηρος ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ήταν από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Το άνυδρο ανθρακικό νάτριο και το υδροξείδιο του νατρίου ήταν από την Penta (Πράγα, Δημοκρατία της Τσεχίας). Η ελεύθερη ρίζα που ανιχνεύθηκε για την μελέτη ήταν η 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) ήταν από την Alfa Aesar (Karlsruhe, Γερμανία). Το p-κουμαρικό οξύ ($\geq 98\%$) και το φερουλικό οξύ ($\geq 99\%$) ήταν από τη Sigma-Aldrich (Στάινχαϊμ, Γερμανία). Το L-Ασκορβικό οξύ ήταν από το Carlo Erba (Μιλάνο, Ιταλία). Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τους χρωματογραφικούς προσδιορισμούς ήταν κατάλληλου βαθμού (HPLC). Η απόλυτη αιθανόλη και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ήταν από την Panreac (Βαρκελώνη, Ισπανία).

2.2 Βλαστοί βαμβακιού

Οι βλαστοί του βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*) συλλέχθηκαν από τους εναπομείναντες ιστούς που έμειναν στο χωράφι, περίπου 3 – 5 ημέρες μετά τη

συγκομιδή των άνθεων του βαμβακιού, από καλλιεργήσιμη γη που βρίσκεται στην περιοχή Κάμπος Γρεβενών (Κεντρική Μακεδονία), σε υψόμετρο 477 m. Οι βλαστοί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο εντός 48 ωρών, λυοφιλοποιήθηκαν για 24 ώρες και θρυμματίστηκαν σε οικιακό μπλέντερ. Έπειτα, το αλεσμένο υλικό κοσκινίστηκε, με τελική διάμετρο των σωματιδίων < 400 μm, και αποθηκεύτηκε στους – 40 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.3 Επεξεργασία με υδροαλκοολικά διαλύματα υπό αλκαλική κατάλυση

Για όλες τις διεργασίες με οργανικούς διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν μίγματα 20% (v/v) αιθανόλης/νερού. Αυτή η αναλογία επιλέχθηκε για να αποφευχθεί η καθίζηση ανθρακικού νατρίου, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη σύνθεση και το pH του διαλύτη κατεργασίας. Το ανθρακικό νάτριο και το υδροξείδιο του νατρίου δοκιμάστηκαν ως αλκαλικοί καταλύτες και προστέθηκαν σε αιθανολικά διαλύματα 20% σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 1,5% (w/v) για το υδροξείδιο του νατρίου και 4, 7 και 10% (w/v) για το ανθρακικό νάτριο. Για την διεξαγωγή των κατεργασιών ελέγχου χρησιμοποιήθηκε υδατικό μίγμα αιθανόλης 60% (v/v) και απιονισμένο νερό.

Για όλα τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε ως δοχείο επεξεργασίας ένα φιαλίδιο Duran™ των 25 mL και οι κατεργασίες πραγματοποιήθηκαν με ανάμιξη 1 g αλεσμένων στελεχών βαμβακιού με 20 mL διαλύτη. Για την παροχή σταθερής ανάδευσης στα 500 rpm και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 80 °C, χρησιμοποιήθηκε ένας αναδευτήρας εστίας ελεγχόμενης θερμοκρασίας (Witeg, Wertheim, Γερμανία). Αυτή η θερμοκρασία επιλέχθηκε ως ασφαλές όριο για να αποφευχθεί η δημιουργία υπερβολικής πίεσης ατμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αιθανολικά διαλύματα 20%. Για τη μελέτη της επίδρασης της δριμύτητας της κατεργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί για την συγκέντρωση των αλκαλικών καταλυτών και της διάρκειας επεξεργασίας (60, 180 και 300 λεπτά) για την επίτευξη διαφορετικών επιπέδων δριμύτητας.

2.4 Εξέταση με βάση τη δριμύτητα

Για τη μελέτη της επίδρασης της δριμύτητας της επεξεργασίας, καθορίστηκαν οι ακόλουθοι παράγοντες [40,48]:

$$R_o = t \times e^{\left(\frac{T-100}{14.75}\right)} \quad (1)$$

$$SF = \log R_o \quad (2)$$

Το R_0 μπορεί να ονομαστεί ως η δριμύτητα, και επομένως το SF αντιπροσωπεύει τον παράγοντα δριμύτητας, χρησιμοποιώντας ως θερμοκρασία αναφοράς τους 100 °C και το 14,75 που αποτελεί μια εμπειρική παράμετρος που σχετίζεται με τη θερμοκρασία της επεξεργασίας και της ενέργειας ενεργοποίησης.

Ο συνδυασμένος παράγοντας δριμύτητας (CSF) αντιπροσωπεύει μια επέκταση του SF, για να ληφθεί υπόψη το pH της επεξεργασίας, το οποίο μπορεί να είναι κρίσιμο για την αποσύνθεση του βιολογικού υποστρώματος (βλαστοί βαμβακιού) που υποβάλλονται σε επεξεργασία [44]:

$$R_0' = 10^{\text{pH}} \times t \times e^{\left(\frac{T-100}{14.75}\right)} \quad (3)$$

$$\text{CSF} = \log R_0' - \text{pH} \quad (4)$$

Επιπλέον, η εναλλακτική μορφή του CSF, που ονομάζεται CFS', μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας που παρέχει μια πιο δίκαιη σύγκριση της βαρύτητας των επεξεργασιών που πραγματοποιήθηκαν σε ένα ευρύ φάσμα pH [44]:

$$\text{CFS}' = \log R_0 + |\text{pH} - 7| \quad (5)$$

2.5 Βελτιστοποίηση κατεργασίας με οργανικό διαλύτη

Δεδομένης της σταθερής θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται (80 °C), επιλέχθηκαν για τη δημιουργία του πειραματικού σχεδιασμού και τη βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης δύο άλλες κρίσιμες μεταβλητές επεξεργασίας οι οποίες ήταν η συγκέντρωση αλκαλικού καταλύτη (C) και ο χρόνος (t). Επίσης, υλοποιήθηκε ένας κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός, ο οποίος περιλάμβανε 11 σημεία σχεδιασμού, 3 από τα οποία ήταν τα κεντρικά σημεία. Η κωδικοποίηση των μεταβλητών της επεξεργασίας (C, t) ήταν σε 3 επίπεδα, -1, 0 και 1, και υπολογίστηκε όπως περιγράφεται λεπτομερώς αλλού [4]. Ο Πίνακας 1 εμφανίζει τα επίπεδα των μεταβλητών τόσο σε κωδικοποιημένη όσο και σε πραγματική μορφή. Τα πραγματικά εύρη και των δύο μεταβλητών επιλέχθηκαν με βάση προκαταρκτικές δοκιμές, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενα ευρήματα [21]. Η σημαντικότητα (R^2 , p) των μοντέλων που προέκυψαν, καθώς και η σημασία των συντελεστών καθενός από τα μοντέλα, αξιολογήθηκαν με βάση σχετικές στατιστικές αναλύσεις (δοκιμές έλλειψης προσαρμογής και ANOVA), σε ελάχιστο επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Πίνακας 1: Οι κωδικοποιημένες και πραγματικές τιμές των μεταβλητών κατεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του πειραματικού σχεδιασμού για τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης.

Τιμές Μεταβλητών	Κωδικοί	Κωδικοποιημένο Επίπεδο Μεταβλητών		
		-1	0	1
t (min)	X ₁	60	180	300
C _{SCar} (% w/v)	X ₂	4	7	10
C _{SoHy} (% w/v)		0.5	1	1.5

2.6 Μέτρηση απόδοσης της εκχύλισης σε ολικές πολυφαινόλες και της αντιοξειδωτικής δράσης

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε ολικές πολυφαινόλες χρησιμοποιήθηκε μια καλά καθιερωμένη μεθοδολογία [10]. Τα αποτελέσματα δόθηκαν ως mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος ανά g ξηρής μάζας (DM). Ομοίως, τόσο η αναγωγική ισχύς του σιδήρου (P_R) όσο και η δέσμευση ελεύθερων ριζών (A_{AR}) εκτιμήθηκαν από καλά περιγραφόμενα πρωτόκολλα, που αναφέρονται λεπτομερώς αλλού [32]. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μmol ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE) ανά g DM και μmol DPPH ανά g DM, αντίστοιχα.

2.7 Χρωματογραφικοί προσδιορισμοί

Στα πλαίσια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος Shimadzu CBM-20A (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Γερμανία), σε συνδυασμό με έναν ανιχνευτή Shimadzu SPD-M20A και που φέρει έναν κλίβανο στήλης CTO-20AC. Το σύστημα διασυνδέθηκε με λογισμικό λύσης Shimadzu LC. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε στήλη Phenomenex Luna C18(2) (100 Å, 5 μm, 4,6 × 250 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, ΗΠΑ), διατηρημένη στους 40 °C. Τα δείγματα εισήχθησαν (ενέθηκαν) στο σύστημα με βρόχο 20 μL. Λεπτομέρειες σχετικά με τον ρυθμό ροής, τα εκλούσματα και το πρόγραμμα έκλουσης αναφέρθηκαν αλλού [32]. Ο ποσοτικός προσδιορισμός τόσο του φεουλικού οξέος όσο και του π-κουμαρικού οξέος επιτεύχθηκε στα 320 nm χρησιμοποιώντας εμπορικά εξωτερικά πρότυπα και καμπύλες βαθμονόμησης που καθορίστηκαν με πρότυπα διαλύματα (0 έως 50 μg mL⁻¹, R₂ = 0,9980 και 0,9990 για το φεουλικό οξύ και το π-κουμαρικό οξύ, αντίστοιχα).

2.8 Στατιστικός χειρισμός και επεξεργασία

Οι γραμμικές παλινδρομήσεις υπολογίστηκαν με SigmaPlot™ 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, ΗΠΑ). Η ανάλυση κατανομής, ο σχεδιασμός των πειραμάτων και όλα τα στατιστικά στοιχεία που σχετίζονται με τη μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης (ανάλυση διακύμανσης, έλλειψη προσαρμογής) πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό JMP™ Pro 13 (SAS, Cary, NC, ΗΠΑ). Κάθε επεξεργασία με οργανικό διαλύτη εκτελέστηκε τουλάχιστον δύο φορές και όλες οι αναλύσεις έγιναν εις τριπλούν. Οι τιμές που αναφέρονται είναι μέση $\pm$ τυπική απόκλιση.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Η δριμύτητα της κατεργασίας και η επίδραση του καταλύτη

Στην παρούσα ενότητα εξετάστηκε η επίδραση που αφορά την δριμύτητα της κατεργασίας και ο ρόλος των δύο αλκαλικών καταλυτών, δηλαδή του υπεροξειδίου του νατρίου (SoHy) και του ανθρακικού νατρίου (SCar), οι οποίοι αξιολογήθηκαν μέσω της προσδιόρισης του συνδυασμένου παράγοντα δριμύτητας (CSF) και του εναλλακτικού παράγοντα δριμύτητας (CSF'). Για την διερεύνηση των επιδράσεων αυτών σε ένα εύρος δριμύτητας, πραγματοποιήθηκαν επεξεργασίες με συνδυασμούς που διέφεραν ως προς την συγκέντρωση των καταλυτών και τον χρόνο παραμονής.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση του καταλύτη SCar, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Φαίνεται ότι υψηλότερη τιμή Y_{TP} (16.24 ± 1.00 mg CAE g⁻¹ DM) επιτεύχθηκε με την συγκέντρωση του καταλύτη (C_{Scar}) να είναι 4% και ο χρόνος παραμονής να ανέρχεται στα 300 min ($p < 0,05$). Αυτές οι συνθήκες αναλογούν στις τιμές -9,7 και 7,11 για τα CSF και CSF' αντίστοιχα. Αντίθετα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του SCar με οποιονδήποτε συνδυασμό του χρόνου παραμονής (60-300min), παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη τιμή Y_{TP} ($p < 0,05$). Το γεγονός αυτό έδειξε ότι συγκέντρωση SCar υψηλότερη από 4% δεν ευνοεί την ανάκτηση των ολικών πολυφαινολών.

Πίνακας 2 : Συνδυασμοί συγκέντρωσης και χρόνου παραμονής της κατεργασίας με ανθρακικό νάτριο(SCar) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, για να επιτευχθούν ποικίλα επίπεδα δριμύτητας της επεξεργασίας, μαζί με τις αντίστοιχες αποδόσεις των ολικών πολυφαινολών.

C_{SCar} (% w/v)	t (min)	CSF	CSF'	Y_{TP} (mg CAE g ⁻¹ DM)
4	60	-10,45 ^b	6,41 ^a	13,66±0,82 ^c
	180	-9,97 ^c	6,89 ^c	13,34±0,94 ^c
	300	-9,75 ^c	7,11 ^b	16,24±1,00 ^b
7	60	-10,47 ^a	6,43 ^a	12,50±0,65 ^c
	180	-9,99 ^c	6,91 ^c	12,52±0,91 ^c
	300	-9,77 ^a	7,13 ^b	13,61±1,02 ^c
10	60	-10,50 ^a	6,46 ^a	8,75±0,58 ^a
	180	-10,02 ^c	6,94 ^c	11,22±1,30 ^c
	300	-9,80 ^a	7,16 ^b	12,13±0,98 ^c

Οι τιμές εντός των στηλών με διαφορετικά εκθετικά γράμματα (a,b,c), είναι στατιστικές διαφορές ($p < 0,05$).

Σχετικά με την επεξεργασία με καταλύτη το SoHy, σημαντικά υψηλές τιμές Y_{TP} μπορούν να επιτευχθούν με συγκέντρωση SoHy είτε 0,5% είτε 1% και χρόνο παραμονής 300min ($p < 0,05$). Όμως, η CSF' για την κατεργασία με συγκέντρωση SoHy ίση με 0,5% ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την κατεργασία με συγκέντρωση SoHy ίση με 1% ($p < 0,05$). Συνεπώς, αποτελεσματικό πείραμα θα μπορούσε να θεωρηθεί η περίπτωση με CSF' ίσο με 7,99 που αντιστοιχεί σε C_{SoHy} ίση με 0,5% και χρόνο παραμονής 300min. (Πίνακας 3).

Για να διαπιστωθεί εάν η Y_{TP} παρουσίασε οποιαδήποτε συσχέτιση με την δριμύτητα της επεξεργασίας, επιχειρήθηκε γραμμική και μη-γραμμική παλινδρόμηση ανάμεσα σε Y_{TP} και CSF ή CSF' (Εικόνα 12). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έδειξαν ότι στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση υπήρξε μόνο για την κατεργασία με καταλύτη SoHy, η οποία περιγράφεται από το ακόλουθο μοντέλο:

$$Y_{TP} = 3,20CSF_{SoHy} + 52,20 \quad (R^2 = 0,72, p=0,0038) \quad (6)$$

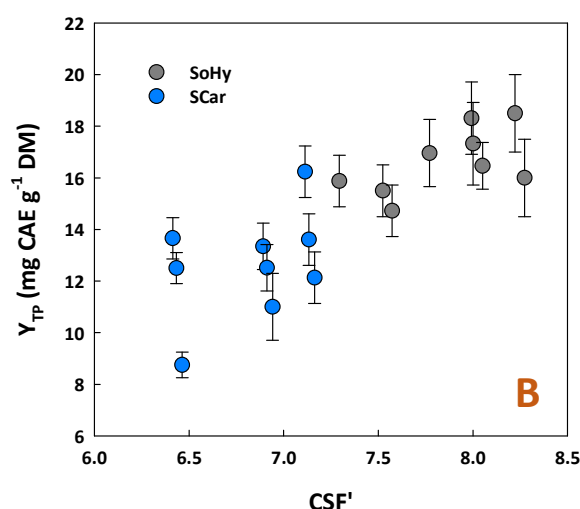
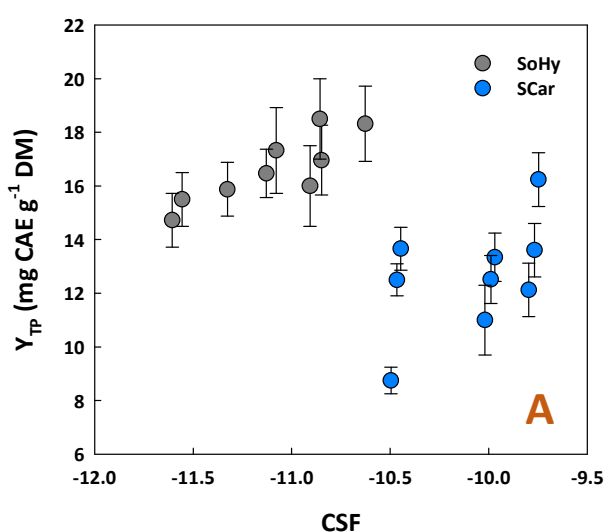
Για όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις που εξετάστηκαν, δεν φάνηκε να υπάρχει σημαντική γραμμική ή τετάρτου βαθμού συσχέτιση. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η αυξημένη δριμύτητα για την επεξεργασία είτε με καταλύτη SoHy είτε με SCar δεν παρήγαγε αναλογικό αποτέλεσμα όσον αφορά την Y_{TP} . Επομένως, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η τιμή της Y_{TP} έχει την δυνατότητα να μεγιστοποιηθεί υπό συγκεκριμένους συνδυασμούς συγκέντρωσης καταλυτών και χρόνου παραμονής. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες απέδειξαν ότι οι αυξήσεις στην ανάκτηση πολυφαινολών από πίτουρα σιταριού συσχετίζονται άμεσα με υψηλά επίπεδα σοβαρότητας, χρησιμοποιώντας μίγματα

απιονισμένου νερού/αιθανόλης [43]. Παρόμοιες μελέτες σε πίτουρα σιταριού συμφωνούσαν αρκετά ως προς τα ευρήματά τους, δείχνοντας μία σημαντική συσχέτιση της δριμύτητας της επεξεργασίας με οργανικό όξινο/αλκαλικό διαλύτη και την απόδοση των ολικών πολυφαινολών [41]. Παράλληλα, βρέθηκε πολύ υψηλή συσχέτιση ανάμεσα σε Y_{TP} και CSF ή CSF', σε επεξεργασία με οργανικό αλκαλικό καταλύτη [21], στοχεύοντας στη μεγιστοποίηση της ανάκτησης των πολυφαινολών.

Πίνακας 3: Συνδυασμοί συγκέντρωσης και χρόνου παραμονής του υδροξειδίου του νατρίου (SoHy) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, για να επιτευχθούν ποικίλα επίπεδα δριμύτητας της επεξεργασίας, μαζί με τις αντίστοιχες αποδόσεις των ολικών πολυφαινολών.

C_{SoHy} (% w/v)	t (min)	CSF	CSF'	Y_{TP} (mg CAE g ⁻¹ DM)
0.5	60	-11.33 ^b	7.29 ^a	15.88±1.05 ^c
	180	-10.85 ^b	7.77 ^c	16.96±1.33 ^c
	300	-10.63 ^b	7.99 ^c	18.31±1.47 ^b
1	60	-11.56 ^a	7.52 ^a	15.50±0.97 ^a
	180	-11.08 ^b	8.00 ^c	17.33±1.60 ^c
	300	-10.86 ^b	8.22 ^b	18.50±1.47 ^b
1.5	60	-11.61 ^a	7.57 ^a	14.73±1.02 ^a
	180	-11.13 ^b	8.05 ^c	16.47±0.88 ^c
	300	-10.91 ^b	8.27 ^b	16.00±1.52 ^c

Οι τιμές εντός των στηλών με διαφορετικά εκθετικά γράμματα (a,b,c), είναι στατιστικές διαφορές ($p < 0.05$).



Εικόνα 12: Η απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες (Y_{TP}) ως συνάρτηση του συνδυασμένου συντελεστή δριμύτητας (A) και του εναλλακτικού συντελεστή δριμύτητας(B), για την επεξεργασία με του οργανικούς διαλύτες υδροξείδιο του νατρίου (SoHy) και ανθρακικό νάτριο (SCar).

3.2 Βελτιστοποίηση κατεργασίας

Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, η προβολή της απόδοσης των τελικών πολυφαινολών ως μία σημαντική λειτουργική κατεργασία δεν εμφάνισε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Επομένως, για να εξασφαλιστεί μία βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης τόσο της συγκέντρωσης των καταλυτών όσο και του χρόνου παραμονής στην ολική ανάκτηση των πολυφαινολών, δημιουργήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός για να εκτελέσει την βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης. Μία τέτοια προσέγγιση κρίθηκε κατάλληλη για την διάκριση πιθανών διαφορών μεταξύ ήπιων (SCar) και ισχυρών (SoHy) καταλυτών.

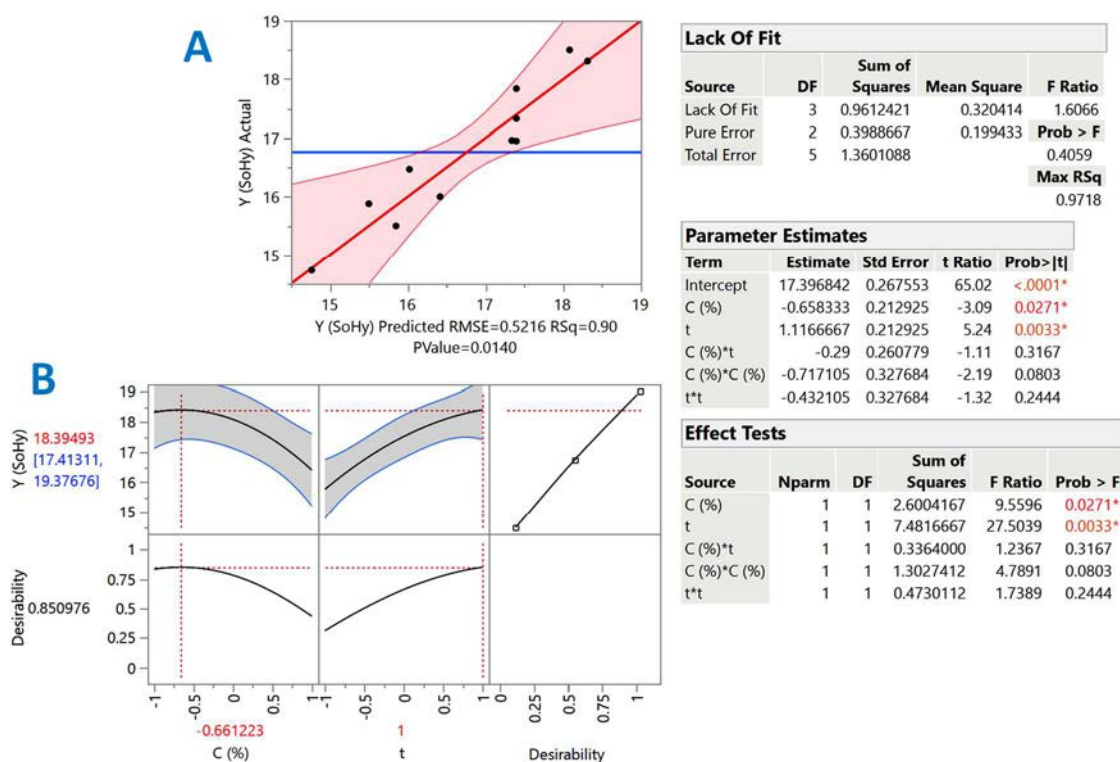
Ωστόσο, η εξέταση με βάση την δριμύτητα έδειξε ότι και οι δύο μεταβλητές επεξεργασίας, τόσο η συγκέντρωση του καταλύτη όσο και ο χρόνος παραμονής, ίσως έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση των πολυφαινολών από τον βλαστό του βαμβακιού. Επομένως, ο χρόνος παραμονής t και η συγκέντρωση του καταλύτη C , επιλέχθηκαν ως (ανεξάρτητες) μεταβλητές της επεξεργασίας. Η βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης είχε ως στόχο την καλύτερη αξιολόγηση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών, αλλά και να εντοπίσει πιθανές συνεργικές (διασταυρούμενες) σχέσεις μεταξύ τους. Η συνολική αξιολόγηση των μοντέλων που προκύπτουν από την βελτιστοποίηση της επιφάνειας απόκρισης βασίστηκε στην ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και την έλλειψη των τεστ προσαρμογής (fit tests) (Εικόνες 13 και 14), λαμβάνοντας υπόψιν την προβλεπόμενη εγγύτητα των μετρούμενων τιμών (Πίνακας 4). Οι ένθετοι πίνακες «Εκτιμήσεις Παραμέτρων» στις εικόνες 13 και 14 απεικονίζουν την σημασία των επιμέρους όρων των μοντέλων που κατασκευάζονται εφαρμόζοντας την μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης. Περιλαμβάνοντας μόνο τους σημαντικούς όρους ($p < 0,05$), τα μοντέλα (μαθηματικές εξισώσεις) που περιγράφουν την επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη (X_1) και τον χρόνο παραμονής (X_2), παρατίθενται παρακάτω :

$$Y_{TP(SoHy)} = 17,40 - 0,66X_1 + 1,12X_2 \quad (R^2=0,90, p=0,0140) \quad (7)$$

$$Y_{TP(SCar)} = 12,50 - 1,89X_1 + 1,17X_2 \quad (R^2=0,90, p=0,0141) \quad (8)$$

Λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές R^2 και p , θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι και τα δύο μοντέλα παρουσιάζουν ικανοποιητική εφαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Με βάση αυτά τα μοντέλα, κατασκευάστηκαν διαγράμματα χρώματος (Εικόνα 15), τα οποία απεικονίζουν την επίδραση των μεταβλητών επεξεργασίας (πειραματικά) στην απόκριση (Y_{TP}) και αποκάλυψαν τις διαφορές ανάμεσα στους δύο καταλύτες που μελετήθηκαν.

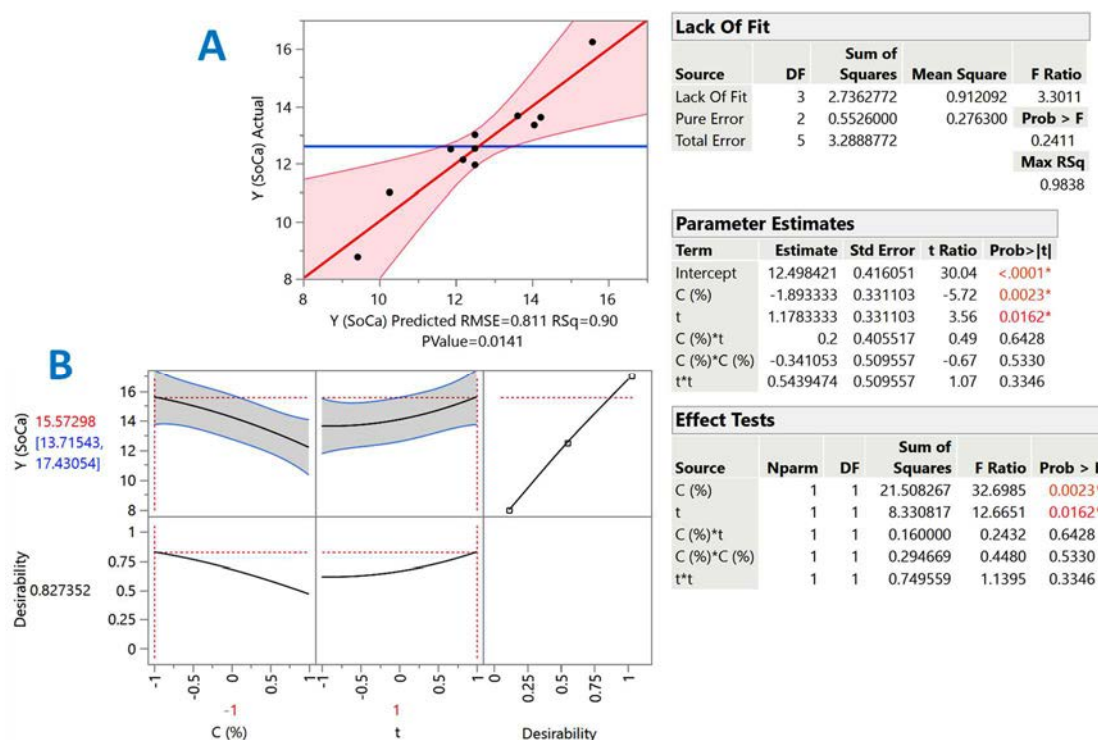
Τόσο για την επεξεργασία με τον καταλύτη $S\text{O}_2$ όσο και με το SCar, η συγκέντρωση (X_1) και ο χρόνος (X_2) ήταν εξίσου σημαντικά ($p < 0,05$). Αντίθετα, οι διασταυρούμενοι όροι (επιδράσεις τετάρτου βαθμού) τόσο της συγκέντρωσης όσο και του χρόνου ήταν ασήμαντες. Επιπρόσθετα, και στις δύο περιπτώσεις ο όρος X_1 (C)



Εικόνα 13: Διαγράμματα που απεικονίζουν την συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών $\square\square$ στους βλαστούς του βαμβακιού με επεξεργασία με υδροξείδιο του νατρίου (A), και την συνάρτηση επιθυμητότητας (B). Οι ένθετοι πίνακες παρουσιάζουν τα στατιστικά που σχετίζονται με το συμπληρωματικό μοντέλο από την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές ορίζονται με διαφορετικά χρώματα και αστερίσκο (κόκκινο, $p < 0,05$; πορτοκαλί, $p < 0,01$).

ασκούσε αρνητική επίδραση, η οποία απέδειξε ότι αποτελεσματική ανάκτηση πολυφαινολών μπορεί να πραγματοποιηθεί με χαμηλή συγκέντρωση καταλύτη, ανεξάρτητα από τον τύπο του ($S\text{O}_2$ ή SCar). Από την άλλη πλευρά, η θετική επίδραση του όρου X_2 (t) ήταν ένα ξεκάθαρο στοιχείο ότι η παράταση του χρόνου παραμονής, μέχρι το όριο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη τιμή $\square\square$.

Στις εικόνες 13Α και 14Α απεικονίζεται η συνάρτηση επιθυμητότητας που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των θεωρητικά άριστων τιμών της συγκέντρωσης (C), του χρόνου(t) αλλά και της μέγιστης προβλεπόμενης απόκρισης. Για την

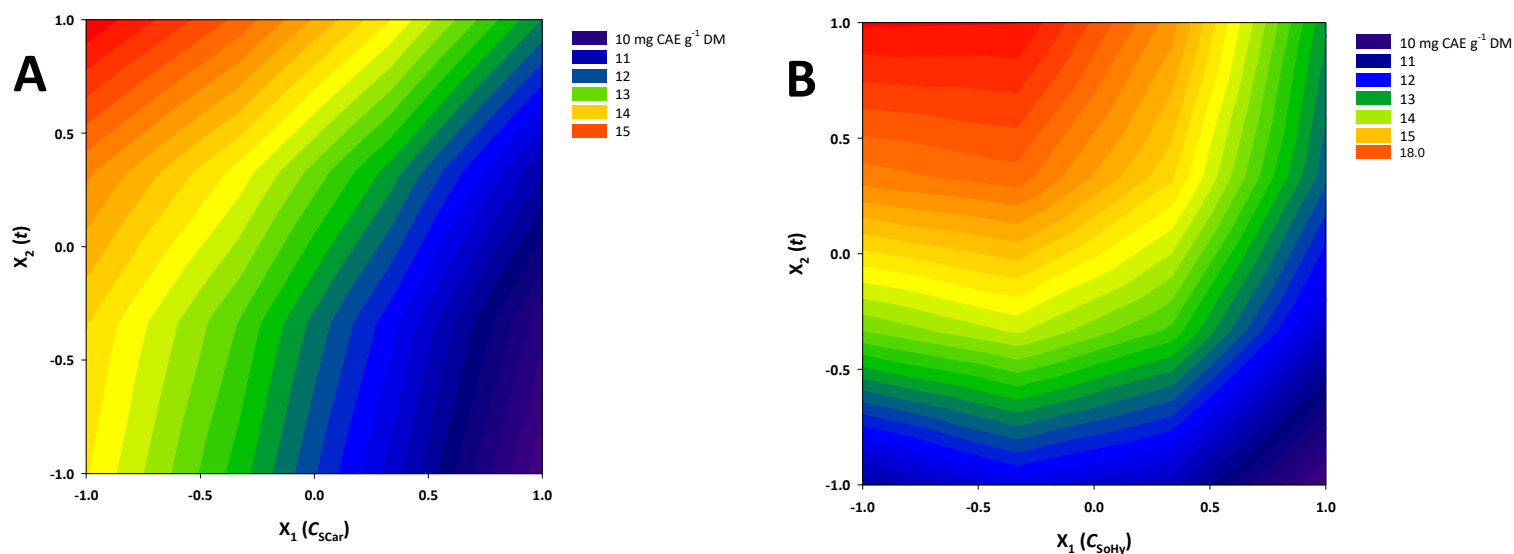


Εικόνα 14: Διαγράμματα που απεικονίζουν την συσχέτιση των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών $\square\square$ στους βλαστούς του βαμβακιού με επεξεργασία με ανθρακικό νάτριο (Α), και την συνάρτηση επιθυμητότητας (Β). Οι ένθετοι πίνακες παρουσιάζουν τα στατιστικά που σχετίζονται με το συμπληρωματικό μοντέλο από την μεθοδολογία επιφανείας απόκρισης. Οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές ορίζονται με διαφορετικά χρώματα και αστερίσκο (κόκκινο, $p < 0,05$; πορτοκαλί, $p < 0,01$).

επεξεργασία με τον καταλύτη $S\square\square y$, οι βέλτιστες συνθήκες ήταν $C_{S\square\square y} = 0,67\%$ και $t=300\text{min}$. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η υψηλότερη τιμή $\square\square$ εκτιμήθηκε ότι ήταν $18,39 \pm 0.98 \text{ mg C}\square\square \text{ g}^{-1} \text{ D}\square$. Ομοίως, για την επεξεργασία με τον καταλύτη $SCar$, οι καλύτερες εκτιμώμενες συνθήκες ήταν $C_{SCar} = 4\%$ και $t=300\text{min}$. Η μέγιστη τιμή του $\square\square$ ήταν $15,57 \pm 1.85 \text{ mg C}\square\square \text{ g}^{-1} \text{ D}\square$, η οποία ήταν χαμηλότερη κατά 15,3% σε σχέση με αυτή της διεργασίας με καταλύτη $S\square\square y$, αλλά όχι ιδιαίτερα σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι διατηρώντας τον ίδιο χρόνο παραμονής, μπορεί να επιτευχθούν παρόμοια επίπεδα ανάκτησης πολυφαινολών απλά αντικαθιστώντας το διαβρωτικό υδροξείδιο του νατρίου με το ήπιο ανθρακικό νάτριο.

Πίνακας 4: Οι συνδυασμοί των μεταβλητών της επεξεργασίας (σημεία σχεδιασμού) που χρησιμοποιήθηκαν για την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης, οι προβλεπόμενες και οι μετρούμενες τιμές της απόκρισης (απόδοση ολικών πολυφαινολών – Y_{TP}) για κάθε σημείο σχεδιασμού.

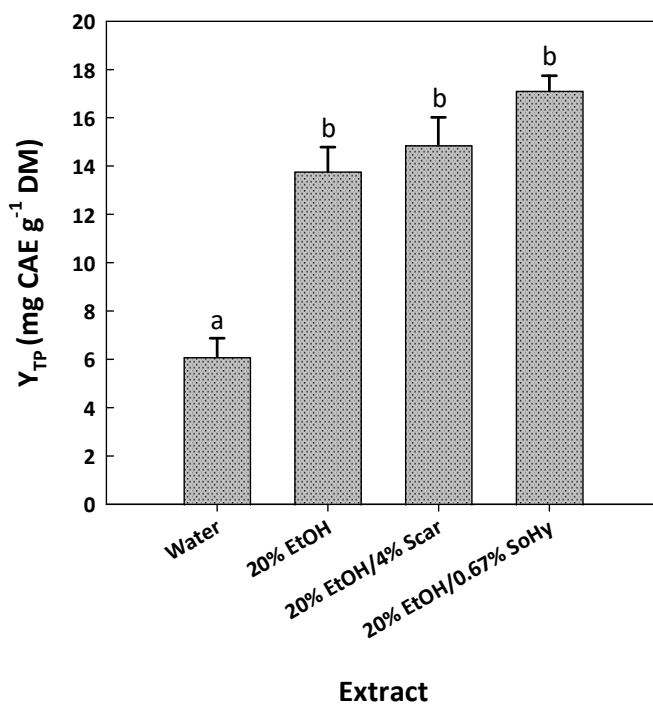
Σημείο Σχεδιασμού	Ανεξάρτητες Μεταβλητές		Απόκριση (Y_{TP} , mg CAE g ⁻¹ DM)			
	X_1 (C)	X_2 (t)	SoHy		SCar	
			Μέτρηση	Προβλεπόμενο	Μέτρηση	Προβλεπόμενο
1	-1	-1	15,88	15,50	13,66	13,2
2	-1	1	18,31	18,31	16,24	15,57
3	1	-1	14,73	14,76	8,75	9,43
4	1	1	16,04	16,42	12,13	12,19
5	-1	0	16,96	17,34	13,34	14,05
6	1	0	16,47	16,02	11,10	10,26
7	0	-1	15,50	15,85	12,50	11,86
8	0	1	18,50	18,08	13,61	14,22
9	0	0	17,33	17,40	12,52	12,50
10	0	0	16,95	17,40	13,02	12,50
11	0	0	17,84	17,40	11,95	12,50



Εικόνα 15: Διαγράμματα χρώματος τα οποία δείχνουν την επίδραση των ποικίλων μεταβλητών της επεξεργασίας στην απόκριση (απόδοση ολικών πολυφαινολών).

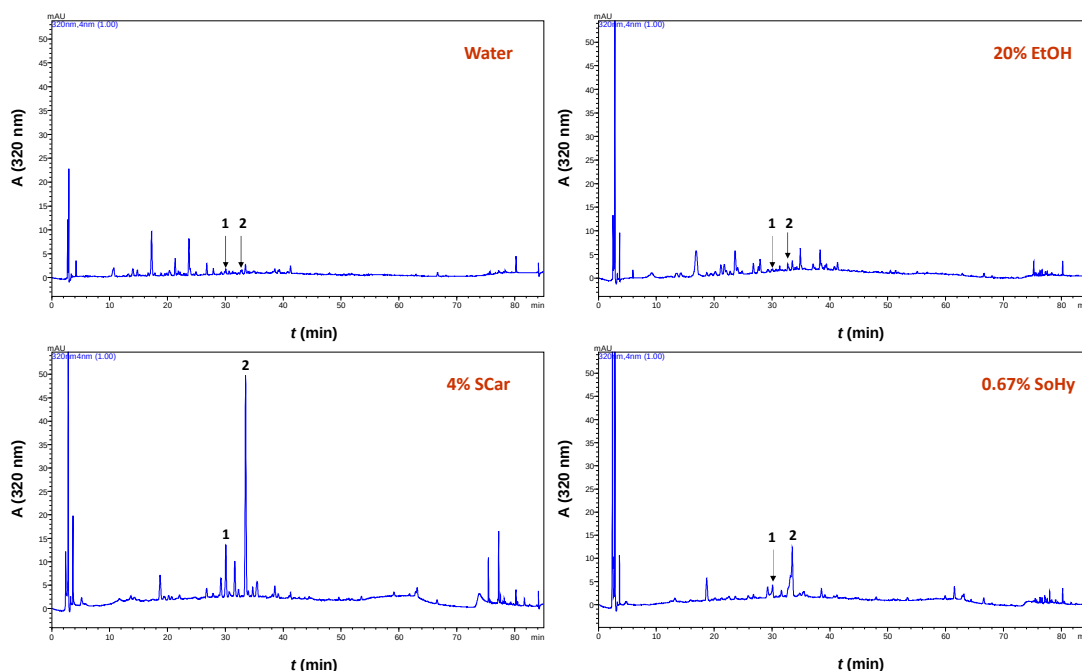
3.3 Πολυφαινολική σύνθεση

Η εξέταση της σύνθεσης του εκχυλίσματος που παράχθηκε από τους βλαστούς του βαμβακιού κατά την κατεργασία με τους καταλύτες SoHy και SCar, περιλαμβάνει και την εκτίμηση της επίδρασης των δύο αυτών ουσιών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, η επεξεργασία στην οποία χρησιμοποιήθηκε απλώς καθαρό νερό αντί για υδατική αιθανόλη, έδωσε σημαντικά χαμηλότερη τιμή Y_{TP} ($p < 0,05$).



Εικόνα 16: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την απόδοση σε ολικές πολυφαινόλες των βλαστών βαμβακιού που επιτυγχάνεται με την επεξεργασία με τους οργανικούς διαλύτες ανθρακικό νάτριο (SCar) και υδροξείδιο του νατρίου (SoHy). Δίνονται επίσης τα αποτελέσματα από την επεξεργασία του δείγματος ελέγχου (νερό, 20% αιθανόλη). Οι στήλες με τα διαφορετικά μικρά γράμματα (a,b) απεικονίζουν τις στατιστικά διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$)

Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υδατικής αιθανόλης 20%, το επίπεδο της Y_{TP} αυξήθηκε κατά 2,26 φορές. Ωστόσο, όταν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των καταλυτών SCar(4%) και SoHy(0.67%) δημιουργήθηκαν σε διαλύτη 20% υδατικής αιθανόλης, η τιμή Y_{TP} δεν ήταν αξιόλογα υψηλή ($p > 0,05$). Προφανώς, τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η προσθήκη οποιουδήποτε καταλύτη έχει μερική επίδραση στην ανάκτηση πολυφαινολών. Επομένως, για να διερευνηθεί καλύτερα το εκχύλισμα των πολυφαινολών που παράχθηκε, έγινε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-Performance Liquid Chromatography). Στο εκχύλισμα που είχε διαλύτη καθαρό νερό, το π-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ ήταν οι δύο ουσίες που μπόρεσαν να προσδιοριστούν με βάση τον χρόνο κατακράτησης των αρχικών προτύπων (Εικόνα 17). Τα ίδια συστατικά ανιχνεύθηκαν και στο εκχύλισμα που είχε για διαλύτη 20% υδατική αιθανόλη. Επίσης, δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες διαφορές στα χρωματογραφικά προφίλ.



Εικόνα 17: Χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν από τους βλαστούς του βαμβάκιου μέσω της επεξεργασίας με οργανικούς διαλύτες ανθρακικό νάτριο (SCar)-και υδροξείδιο του νατρίου (SoHy)- . Εκχώριση κορυφής : 1, π-κουμαρικό οξύ; 2, φερουλικό οξύ.

Αντίθετα, το εκχύλισμα που παράχθηκε από την υδροθερμική κατεργασία με καταλύτη SCar εμφανίζει κυρίαρχες κορυφές που αντιστοιχούν στις ενώσεις π-κουμαρικού οξέος και φερουλικού οξέος, ενώ οι κορυφές αυτές ήταν αρκετά λιγότερο διακριτές στο εκχύλισμα που παράχθηκε με επεξεργασία του καταλύτη SoHy. Για να υπάρχει μια πιο λεπτομερής εικόνα της σύνθεσης των εκχυλισμάτων, έγινε ποσοτικοποίηση και τα αποτελέσματα δίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 5. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτά τα δεδομένα, είναι ξεκάθαρο ότι η επεξεργασία με καταλύτη SCar απέδωσε εκχύλισμα το οποίο ήταν σημαντικά πιο εμπλουτισμένο τόσο σε π-κουμαρικό όσο και σε φερουλικό οξύ, σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Η απόδοση και των δύο αυτών πολυφαινολών ήταν επίσης υψηλή με την επεξεργασία με καταλύτη SoHy, αλλά όχι με την επεξεργασία που περιλάμβανε μόνο νερό ή υδατική αιθανόλη. Αυτό το αποτέλεσμα έδειξε ότι i) η παρουσία οποιουδήποτε καταλύτη ήταν απαραίτητη για την ενίσχυση της ανάκτησης του π-κουμαρικού και φερουλικού οξέος και ii) ο καταλύτης SCar ήταν πιο αποτελεσματικός σε σχέση με το SoHy.

Πίνακας 5 : Το ποσοστό του φερουλικού οξέος (FA) και του π-κουμαρικού οξέος (p-CouA) που ανακτήθηκε από τους βλαστούς του βαμβακιού μετά από την επεξεργασία με οργανικούς διαλύτες ανθρακικό νάτριο (SCar) -και υδροξείδιο του νατρίου (SoHy)-. Δίνονται επίσης τα αποτελέσματα από την επεξεργασία με τα δείγματα ελέγχου.

Διαλύτες	FA ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	p-CouA ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	Συνολικό ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)
Νερό	24.77 $\pm$ 0.50 ^a	14.63 $\pm$ 0.29 ^a	39.40 ^a
20% Αιθανόλη	25.48 $\pm$ 0.74 ^a	13.26 $\pm$ 0.39 ^a	38.73 ^a
20% Αιθανόλη/4% Ανθρακικό Νάτριο	233.05 $\pm$ 8.97 ^b	55.55 $\pm$ 1.87 ^b	288.60 ^b
20% Αιθανόλη/0.67% Υδροξείδιο του νατρίου	81.14 $\pm$ 5.32 ^c	25.63 $\pm$ 1.02 ^a	106.77 ^c

Οι τιμές εντός των στηλών με διαφορετικά εκθετικά γράμματα (a,b,c), είναι στατιστικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στις πρωταρχικές έρευνες σχετικά με την σύνθεση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος των βλαστών βαμβακιού, το φερουλικό οξύ ήταν μεταξύ των κυρίαρχων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, συνοδευόμενο από μικρότερες ποσότητες π-κουμαρικού οξέος [57]. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η συμβατική εκχύλιση με διαλύτη μπορεί να δώσει εκχυλίσματα σχετικά πλούσια σε πρωτοκατεχικό οξύ και κατεχίνη και φτωχά σε π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ [31]. Επομένως, λόγω του γεγονότος ότι η αυξημένη ανάκτηση των π-κουμαρικού και φερουλικού οξέος απαιτούσαν αλκαλικούς διαλύτες, μπορεί να υποτεθεί ότι οι δύο αυτές πολυφαινόλες ίσως είναι δεσμευμένες σε μακρομοριακά υποστρώματα, π.χ. σύμπλοκα λιγνοκυτταρινούχων ουσιών. Ακόμη, για τους βλαστούς του βαμβακιού έχουν βρεθεί στοιχεία σχετικά με την παρουσία π-κουμαρικού και φερουλικού οξέος συνδεδεμένων με λιγνίνη [13]. Για άλλα λιγνοκυτταρινούχα υλικά (μπαμπού), η επεξεργασία βιομάζας απέδωσε σημαντικές ποσότητες π-κουμαρικού και φερουλικού οξέος, οι οποίες υποδείκνυαν την παρουσία ενός συμπλέγματος λιγνίνης-υδατάνθρακα [26].

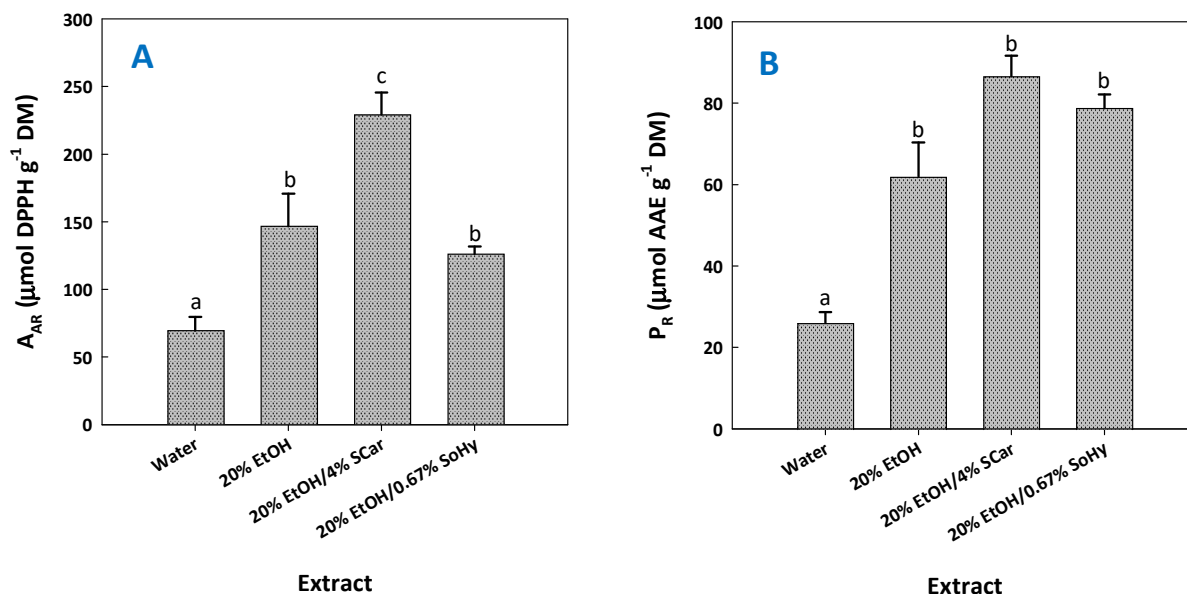
Στα λιγνοκυτταρινούχα κλάσματα του γρασιδιού, το φερουλικό οξύ συνδέεται με τις αραβινοζυλάνες του κυτταρικού τοιχώματος μέσω εστερικού δεσμού [38,15]. Οι εστερικοί δεσμοί μπορούν να διασπαστούν αποτελεσματικά με αλκαλική υδρόλυση ώστε να απελευθερωθεί επαρκώς το φερουλικό οξύ. Επιπρόσθετα, τα υδροξυκινηματικά όπως το π-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ έχουν την δυνατότητα να λειτουργούν ως παράγοντες διασταυρούμενης σύνδεσης ανάμεσα στην λιγνίνη και τα κυτταρικά τοιχώματα των πολυσακχαριτών, τα οποία είναι συνδεδεμένα με δεσμούς ασταθών εστέρων στα αλκάλια [9]. Το φερουλικό οξύ είναι επίσης ένα συστατικό δικτύου της λιγνίνης που είναι συνδεδεμένο με εστερικούς δεσμούς. Έχει αναφερθεί ότι η ενισχυμένη διαλυτοποίηση της λιγνίνης, βελτιώνει την απελευθέρωση του φερουλικού οξέος [35] και με την θεωρία αυτή, η αιθανόλη έχει σημαντικό ρόλο στην διαλυτοποίηση της λιγνίνης [59]. Ακόμη, η αιθανόλη θα μπορούσε να συμβάλλει στην ευκολότερη προσβασιμότητα των εστερικών δεσμών από τους αλκαλικούς καταλύτες

(SCar και SoHy), το οποίο είναι το περιοριστικό στάδιο της υδρόλυσης και της απελευθέρωσης των υδροξυκινηματικών [35]. Έχει προταθεί ότι η διάσπαση και η διαλυτοποίηση της λιγνίνης μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την απελευθέρωση του φερουλικού οξέος. Σε οργανικές επεξεργασίες στις οποίες για διαλυτή χρησιμοποιείται η αιθανόλη, η διάσπαση της λιγνίνης επιτυγχάνεται με εκτεταμένη διάσπαση των α-αρυλικών και β-αρυλικών αιθερικών δεσμών [9,59]. Μέσω των αντιδράσεων αυτών, τα μεγάλα πολυμερή της λιγνίνης διασπώνται σε μικρότερα κλάσματα και έτσι μπορεί να διαλυτοποιηθεί καλύτερα.

Βέλτιστη διαλυτοποίηση της λιγνίνης είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί μέσω αλκαλικών κατεργασιών [56], η οποία θα μπορούσε να ενισχυθεί επιπλέον από την αιθανόλη [7]. Η αλκαλοδιαλυτοποιημένη λιγνίνη έχει συσχετιστεί στενά με την απελευθέρωση του φερουλικού οξέος [35] και αυτός είναι ακόμη ένας λόγος ο οποίος ευθύνεται για την υψηλή απόδοση του φερουλικού οξέος στην συγκεκριμένη μελέτη. Οι εστερικοί δεσμοί που συγκρατούν φερουλικό οξύ στα κυτταρικά τοιχώματα των πολυσακχαριτών, μπορούν να διασπαστούν κάτω από ήπιες αλκαλικές συνθήκες και με κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας, η διαδικασία αυτή επιταχύνεται [35]. Ωστόσο, η αύξηση της θερμοκρασίας πέρα από ένα ορισμένο επίπεδο ίσως να μην είναι ευνοϊκή για την αποτελεσματική ανάκτηση του υδροξυκινηματικού. Έχει αναφερθεί ότι οι επεξεργασίες στους 140°C για περισσότερο από 40 λεπτά ήταν ακατάλληλες για αύξηση της ανάκτησης του φερουλικού οξέος, πιθανότατα λόγω του γεγονότος ότι αποικοδομείται [53]. Από την άλλη πλευρά, η κατεργασία με καυτό απιονισμένο νερό στους 200 °C και χρόνο παραμονής μόλις 3,5 λεπτά, μεγιστοποιεί την απόδοση του φερουλικού οξέος [42], αλλά οι επεξεργασίες με μίγματα απιονισμένου νερού/αιθανόλης παρέχουν μέγιστα ποσοστά φερουλικού οξέος μετά από 74 λεπτά στους 160 °C [43]. Στις θερμικές επεξεργασίες, η θερμοκρασία και ο χρόνος είναι αλληλοεξαρτώμενες μεταβλητές, και ο κατάλληλος συνδυασμός της θερμοκρασίας και/ή του χρόνου επεξεργασίας στις βέλτιστες συνθήκες, θα μπορούσε να είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάκτηση των υδροξυκινηματικών.

3.4 Αντιοξειδωτική δράση

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που είναι εμπλουτισμένα με φερουλικό οξύ ή παράγωγα φερουλικού, μπορεί να έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση [21,41,12]. Για να εξεταστεί αυτή η επίδραση και λαμβάνοντας υπόψη ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα είχαν διαφορετική σύνθεση (Πίνακας 5), πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την δέσμευση ελεύθερων ριζών (A_{AR}) και της αναγωγικής ισχύς του σιδήρου (P_R). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, επιβεβαίωσαν ότι τα εκχυλίσματα που είχαν υψηλό ποσοστό φερουλικού αλλά και π-κουμαρικού οξέος, είχαν αρκετά μεγαλύτερη τιμή A_{AR} (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Ραβδογράμματα που απεικονίζουν την δράση ενάντια στην δέσμευση των ριζών (A_{AR}) (A) και της αναγωγικής ισχύς του σιδήρου (P_R) (B) από τους βλαστούς του βαμβακιού μέσω της επεξεργασίας με οργανικούς διαλύτες ανθρακικό νάτριο (SCar) -και υδροξείδιο του νατρίου (SoHy)-. Δίνονται επίσης τα αποτελέσματα από τα δείγματα ελέγχου (νερό, 20% αιθανόλη). Οι στήλες που είναι σχεδιασμένες με μικρά διαφορετικά γράμματα (a,b) παρουσιάζουν τις στατιστικές διαφορετικές τιμές ($p < 0,05$).

4. Συμπεράσματα

Οι βλαστοί βαμβακιού είναι υποπροϊόν της συγκομιδής του φυτού βαμβακιού. Ωστόσο η δυναμική τους ως πηγή ευεργετικών φυτικών χημικών ουσιών, δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Ως λιγνοκυτταρινικό υλικό, οι βλαστοί βαμβακιού με κατάλληλη κατεργασία θα μπορούσαν να δώσουν ικανοποιητική ποσότητα πολυφαινολικών ενώσεων. Οι πρώτες έρευνες αποκάλυψαν ότι οι συμβατικοί διαλύτες όπως το νερό ή τα μείγματα νερού/αιθανόλης είχαν ως αποτέλεσμα χαμηλές αποδόσεις πολυφαινόλης, αλλά η προσθήκη αλκαλικών καταλυτών βελτίωσε την απόδοση εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η ήπια κατάλυση με ανθρακικό νάτριο βρέθηκε πιο αποτελεσματική, παράγοντας εκχυλίσματα πλούσια σε αντιοξειδωτικά όπως τα υδροξυκιναμικά. Με βάση αυτά τα ευρήματα, προτείνονται οι βλαστοί βαμβακιού ως ένα πολλά υποσχόμενο γεωργικό υπόλειμμα για τη λήψη λειτουργικών φυτικών χημικών ουσιών. Αυτή η προοπτική έχει σημαντική αξία για τα βιοδιυλιστήρια, καθώς υποστηρίζει φιλικές προς το περιβάλλον προσεγγίσεις με χρήση «πράσινων» διαλυτών (νερό/αιθανόλη), ήπια κατάλυση (ανθρακικό νάτριο) και αξιοποίηση γεωργικών απορριμμάτων (βλαστοί βαμβακιού). Η εφαρμογή τέτοιων πρακτικών θα μπορούσε να προωθήσει βιώσιμες μεθόδους για τη χρήση των γεωργικών αποβλήτων και να συμβάλει στην ανάπτυξη της βιοοικονομίας.

5. Βιβλιογραφία :

1. Abuhay, A., Mengie, W., Tesfaye, T., Gebino, G., Ayele, M., Haile, A., & Yillie, D. (2021). Opportunities for new biorefinery products from Ethiopian ginning industry by-products: Current status and prospects. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(3), 195-214.
2. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200-214.
3. Amani, M. A., & Marinello, F. (2022). A deep learning-based model to reduce costs and increase productivity in the case of small datasets: A case study in cotton cultivation. *Agriculture*, 12(2), 267.
4. Athanasiadis, V.; Alaiougiannis, D.; Zinou, I.; Lalas, S.; Akris, D. β -Cyclodextrin-aided aqueous extraction of antioxidant polyphenols from peppermint (*Mentha $\times$ piperita* L.). *Oxygen* 2022, 2 (4), 424-436.
5. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
6. Beckert, S. (2014). *Empire of Cotton: A Global History*. ISBN 9780375713965
7. Brand, I.; Arasmanoglu, F. Effects of organic solvent pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: a review. *J. Renew. Sustain. Energy* 2018, 10 (3).
8. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 901.
9. Duran, I. U.; Azza, G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. Crops Prod.* 2008, 28 (3), 237-259.
10. Ciccio, I.; Lanotte, I.; Araghi, I.; Viggiani, I.; Lattanzi, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* 2009, 91 (1), 107-110.
11. Chang, Y., He, F., Wang, T., & Aisa, H. A. (2022). Structure and biomedical applications of bioactive polyphenols from food and fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(12), e16789.
12. Cherif, I.; Grigarakis, S.; Alalah, I.; Loupassaki, S.; Akris, D. A high-efficiency extraction of phenolics from wheat waste biomass (bran) by combining deep eutectic solvent, ultrasound-assisted pretreatment and thermal treatment. *Environ. Proc.* 2020, 7, 845-859.
13. Costa, C. I.; Cleman, W.; Dube, I.; Rodrigues, I.; Pinto, C. R. Assessment of key features of lignin from lignocellulosic crops: Stalks and roots of corn, cotton, sugarcane, and tobacco. *Ind. Crops Prod.* 2016, 92, 504 136-148.

14. Crizel, R. L., Zandoná, G. P., Rossi, R. C., Ferreira, C. D., & Hoffmann, J. F. (2023). Solid-phase extraction for determination of phenolic compounds in food and beverage.
15. De Oliveira, D. .; Finger-eixeira, .; Rdrigues ita, .; Salvadr, V. .; Moreira-Vilar, F. C.; Crea linari, . .; Craig itchell, R. .; archisi, R.; Ferrarese-Filh, .; Dantas d's Sant's, W. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotech. J.* 2015, 13 (9), 1224-1232.
16. Devkota, H. P., & Adhikari-Devkota, A. (2022). Phenolic acids. In *Antioxidants Effects in Health* (pp. 427-436). Elsevier.
17. Egbuta, M. A., McIntosh, S., Waters, D. L., Vancov, T., & Liu, L. (2017). Biological importance of cotton by-products relative to chemical constituents of the cotton plant. *Molecules*, 22(1), 93.
18. Escobedo-Flores, Y., Chavez-Flores, D., Salmeron, I., Molina-Guerrero, C., & Perez-Vega, S. (2018). Optimization of supercritical fluid extraction of polyphenols from oats (*Avena sativa* L.) and their antioxidant activities. *Journal of Cereal Science*, 80, 198-204.
19. Gil-Martín, E., Forbes-Hernández, T., Romero, A., Cianciosi, D., Giampieri, F., & Battino, M. (2022). Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry*, 378.
20. Gordon, S., & Hsieh, Y. L. (Eds.). (2006). *Cotton: Science and technology*. Woodhead Publishing.
21. Guenaui, .; Casasni, S.; Grigarakis, S.; akris, D. . Alkali-catalyzed organosolv treatment of oat bran for enhanced release of hydroxycinnamate antioxidants: comparison of 1-and 2-propanol. *Environments* 2023, 10 (7), 118.
22. Halpani, C. G., & Mishra, S. (2024). Design, synthesis, characterization of ferulic acid and p-coumaric acid amide derivatives as an antibacterial/antioxidant agent. *Pharmaceutical Science Advances*, 2, 100023.
23. He, Z., Liu, S., Nam, S., Klasson, K. T., & Cheng, H. N. (2023). Molecular level characterization of the effect of roasting on the extractable components of glandless cottonseed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Food Chemistry*, 403, 134404.
24. Hernandez, E. (2016). Cottonseed: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains* (Second Edition) (pp. 242-246). Academic Press.
25. Quasni, .; Grigarakis, S.; ellil, .; akris, D. . Organosolv treatment/polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea* L.) using glycerol and glycerol-based deep eutectic solvents: Effect on metabolite stability. *466 Biomass* 2022, 2 (1), 46-61.
26. uang, C.; han, .; Wang, J.; Cheng, J.; eng, .; Liang, L.; Liang, F.; Deng, .; Fang, G.; Ragauskas, . J. Valrizatiñ f bambi biomass using combinatñrial pretreatments. *Green Chem.* 2022, 24 (9), 3736-3749.

27. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") (1997). Online corrected version: (2006–) "phenols". doi:10.1351/goldbook.P04539
28. Jabran, K., Ul-Allah, S., Chauhan, B. S., & Bakhsh, A. (2019). An introduction to global production trends and uses, history and evolution, and genetic and biotechnological improvements in cotton. *Cotton production*, 1-22.
29. Kamanda, S. N., & Jacobs, A. (2021). Multicomponent crystals of p-coumaric acid and trans-ferulic acid: Structures and physicochemical properties. *Journal of Molecular Structure*, 1244, 130830.
30. Khan, M. A., Wahid, A., Ahmad, M., Tahir, M. T., Ahmed, M., Ahmad, S., & Hasanuzzaman, M. (2020). World cotton production and consumption: An overview. *Cotton production and uses: Agronomy, crop protection, and postharvest technologies*, 1-7.
31. Kirkan, İ.; Sarikurkcu, C.; Çapurçglu, İ.; Cengiz, İ.; Çepe, İ. Is it possible to use the stalks of *Gossypium hirsutum* L., an important by-product of cotton cultivation, as an alternative source of bioactive components? *Eur. Food Res. Technol.* 2018, 244, 1065-1071.
32. Lakka, İ.; Grigoriakis, S.; Maragariou, İ.; Atrra, G.; Altsa, İ.; Zinü, İ.; Lalas, S.; Akris, D. Saffron processing wastes as a bioresource of high-value added compounds: Development of a green extraction process 496 for polyphenol recovery using a natural deep eutectic solvent. *Antioxidants* 2019, 8 (12), 586
33. Lee, J. A., & Fang, D. D. (2015). Cotton as a world crop: origin, history, and current status. *Cotton*, 57, 1-23.
34. Lin, H., & Tsao, R. (2019). Antimicrobials From Plants-Food Preservation and Shelf Life Extension.
35. Linh, İ İ.; Fujita, İ.; Sakda, İ. Release kinetics of esterified p-coumaric acid and ferulic acid from rice straw in mild alkaline solution. *Biores. Technol.* 2017, 232, 192-203.
36. Liu, H., Guo, X., Jiang, K., Shi, B., Liu, L., Hou, R., ... & Liu, L. (2024). Dietary polyphenols regulate appetite mechanism via gut-brain axis and gut homeostasis. *Food Chemistry*, 138739.
37. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
38. Mathew, S.; Abraham, İ İ. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotech* 2004, 24 (2-3), 59-83.
39. Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., & Gallo, M. (2019). Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(7), 245.
40. Overend, R. İ; Chornet, İ. Fractionation of lignocelluloses by steam-aqueous pretreatments. *Phil. Trans. Royal Soc. London. Series A, Math. Phys. Sci.* 1987, 321 (1561), 523-536.
41. Papadaki, İ. S.; Alaiogiannis, D.; Lalas, S. İ; Itlianga, İ; Akris, D. İ Polyphenol release from wheat bran using ethanol-based organosolv treatment and

- acid/alkaline catalysis: process modeling based on severity and response surface optimization. *Antioxidants* 2022, 11 (12), 2457.
42. Pazo-Cepeda, V.; Sprimonte, S. G.; Iñiguez, J. Extraction of ferulic acid and feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from wheat bran using pressurized hot water. *Food Biosci.* 2021, 44, 101374.
 43. Pazo-Cepeda, V.; Benito-Román, Ó.; Avarrete, J.; Iñiguez, J. Valorization of wheat bran: Ferulic acid recovery using pressurized aqueous ethanol solutions. *Waste Biomass Valor.* 2020, 11, 4701-4710.
 44. Pedersen, J.; Meyer, S. Lignocellulose pretreatment severity-relating pH to biomatrix opening. *New Biotech.* 2010, 27 (6), 739-750.
 45. Prakash, S., Sharma, K., Dhupal, S., Senapathy, M., Deshmukh, V. P., Kumar, S., ... & Kumar, M. (2024). Unlocking the potential of cotton stalk as a renewable source of cellulose: A review on advancements and emerging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129456.
 46. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
 47. Sheri, V., Kumar, M., Jaconis, S., & Zhang, B. (2023). Antioxidant defense in cotton under environmental stresses: Unraveling the crucial role of a universal defense regulator for enhanced cotton sustainability. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108141.
 48. Sidiras, D.; Ilioti, D.; Giakoumakis, G.; Salapa, J. Simulation and optimization of organosolv based lignocellulosic biomass refinery: A review. *Biores. Technol.* 2022, 343, 126158.
 49. Stalmach, A. (2014). Bioavailability of dietary anthocyanins and hydroxycinnamic acids. In *Polyphenols in human health and disease* (pp. 561-576). Academic Press.
 50. Tao, H., Zhao, Y., Li, L., He, Y., Zhang, X., Zhu, Y., & Hong, G. (2023). Comparative metabolomics of flavonoids in twenty vegetables reveal their nutritional diversity and potential health benefits. *Food Research International*, 164, 112384.
 51. Tuladhar, P., Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. In *Biocontrol agents and secondary metabolites* (pp. 419-441). Woodhead Publishing.
 52. Ulrih, N. P. (2015). Effects of caffeic, ferulic, and p-coumaric acids on lipid membranes. In *Coffee in health and disease prevention* (pp. 813-821). Academic Press.
 53. Valério, R.; Cadima, J.; Crespo, J. G.; Razinha, C. Extracting ferulic acid from corn fibre using mild alkaline extraction: a pilot scale study. *Waste Biomass Valor.* 2021, 1-11.
 54. Wang, N., Hou, G. G., & Zhou, Y. (2024). Effects of cottonseed flour and enzyme addition on the wheat flour dough characteristics and snack cracker quality. *LWT*, 191, 115671.
 55. Wendel, J., & Cronn, R. (2003). Polyploidy and the evolutionary history of cotton.
 56. Wiciecichowski, J. L.; Met, C. J. D.; de Souza Vandenberghe, L. J.; de Carvalho Met, D. J.; Sydney, J. C. J.; Letti, L. J.; Jarp, S. G.; Jres, L. J.; Scc, J.

- C. R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance—Conventional processing and recent advances. *Biores. Technol.* 2020, 304, 122848.
57. Özsef, Ö.; Ben-Ghedalia, D.; Kiran, J.; Puttermann, Ö.; Ajcherczyk, Ö.; Ilstein, Ö.; Ludemann, Ö. D.; Frund, R. Characterization of some cell wall components of untreated and ozone-treated cotton stalks. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42 (1), 86-90.
 58. Zhang, Y., & Dong, H. (2020). Yield and Fiber Quality of Cotton. In S. Hashmi & I. A. Choudhury (Eds.), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (pp. 356-364). Elsevier.
 59. Hu, Ö.; Lei, F.; Li, Ö.; Jiang, J. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. *Biotech. Bioeng.* 2018, 115 (11), 2683-2702.
 60. Χανιώτη, Σοφία. "Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης φυτικών λιπαρών και βιοδραστικών συστατικών τους." (2020).