



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εκχύλιση λυκοπενίου και άλλων βιοδραστικών ενώσεων από
απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας: Σύγκριση
υπερήχων έναντι συμβατικής μεθόδου ανάδευσης**

Φοιτητής: Μαυρίδης Κωνσταντίνος, Τόδας Νικόλαος

Επιβλέπων Καθηγητής: Σταύρος Ι. Λάλας

Καρδίτσα, 2025

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν τη βιομηχανία επεξεργασίας ντομάτας Damavand S.A., που βρίσκεται στη Φίλια (Καρδίτσα, Ελλάδα), για την παροχή φρέσκων υποπροϊόντων ντομάτας. Επίσης, θα ήθελαν να ευχαριστήσουν τις οικογένειές τους που αποτέλεσαν σημαντικό αρωγό σε αυτή την προσπάθεια. Τέλος, ευχαριστούν τον κ. Σταύρο Λαλά, τον κ. Βασίλη Αθανασιάδη και τον κ. Δημήτρη Καλομπάτσιο για την πολύτιμη βοήθειά τους στην επίτευξη της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας. Μάλιστα, από τη συγκεκριμένη εργασία προέκυψε δημοσίευση στο επιστημονικό περιοδικό *Horticulturae* με κριτές του εκδοτικού οίκου MDPI:

Mavridis, K.; Todas, N.; Kalompatsios, D.; Athanasiadis, V.; Lalas, S.I. Lycopene and Other Bioactive Compounds' Extraction from Tomato Processing Industry Waste: A Comparison of Ultrasonication Versus a Conventional Stirring Method. *Horticulturae* 2025, 11, 71, doi:[10.3390/horticulturae11010071](https://doi.org/10.3390/horticulturae11010071).

Περίληψη

Η ντομάτα (*Lycopersicon esculentum*) είναι ένα σημαντικό φρούτο στις μεσογειακές χώρες με καθιερωμένες βιολογικές δραστηριότητες για τους καταναλωτές. Δεδομένης της ευρείας διάδοσης του φρούτου και της μεγάλης παραγωγής του, η ανάγκη αξιοποίησης των υποπροϊόντων του φαίνεται επιτακτική. Με σκοπό την αξιοποίηση του κύριου καροτενοειδούς των αποβλήτων της βιομηχανίας επεξεργασίας ντομάτας, του λυκοπενίου, καθώς και άλλων βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. πολυφαινόλες), πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση μιας μεθόδου πράσινης εκχύλισης που περιλαμβάνει εκχύλιση σε λουτρό με τη βοήθεια υπερήχων (UBAE). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βελτιστοποιημένη τεχνική UBAE πέτυχε σημαντικές αποδόσεις ολικών καροτενοειδών (420,8 μg ισοδύναμα λυκοπενίου ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (dw)) και ολικών πολυφαινολών (2,62 mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο dw). Η φλαβονοειδής ναρινγίνη (0,48 mg/g dw) και η μη φλαβονοειδής κωνοειδής αλκοόλη (0,32 mg/g dw) ήταν οι πιο άφθονες πολυφαινόλες που αναγνωρίστηκαν. Ωστόσο, η σύγκριση με τη συμβατική εκχύλιση με ανάδευση αποκάλυψε ότι η τελευταία τεχνική σημείωσε διψήφια ποσοστά σε όλες τις αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων των αναλύσεων αντιοξειδωτικής δράσης. Η μελέτη αποκάλυψε ότι η UBAE δεν ήταν προτιμότερη τεχνική για την ανάκτηση καροτενοειδών λόγω της πιθανής αποικοδόμησης των ευπαθών ενώσεων που βρίσκονται στα απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας. Δεδομένου ότι ο διαλύτης εκχύλισης ήταν καθαρή αιθανόλη, η μελέτη έθεσε τα θεμέλια για την ανάπτυξη ενός μοναδικού προϊόντος εμπλουτισμένου με λυκοπένιο στη βιομηχανία τροφίμων. Είναι απαραίτητο να διεξαχθούν πρόσθετες μελέτες με τη χρήση εναλλακτικών διαλυτών ποιότητας τροφίμων ή άλλων μεθόδων εκχύλισης φιλικών προς το περιβάλλον.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	6
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. Υλικά και μέθοδοι	10
2.1. Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά	10
2.2. Οργανολογία	10
2.3. Διαδικασία εκχύλισης	11
2.3.1. Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων σε λουτρό (UBAE)	11
2.3.2. Εκχύλιση με ανάδευση (STE)	11
2.4. Πειραματικός σχεδιασμός και βελτιστοποίηση με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM)	11
2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων	13
2.5.1. Προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (TPC)	13
2.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός μεμονωμένων πολυφαινολών	14
2.5.3. Προσδιορισμός των ολικών καροτενοειδών (TCC)	14
2.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας <i>in vitro</i>	15
2.6.1. Δραστηριότητα δέσμευσης ρίζας DPPH	15
2.6.2. Αναγωγική ισχύς σιδήρου	15
2.7. Στατιστικά στοιχεία	16
3. Αποτελέσματα και συζήτηση	16
3.1. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης	16
3.2. Ανάλυση μοντέλου	17
3.3. Ανάλυση Pareto Plot της επίδρασης των παραμέτρων εκχύλισης στις αναλύσεις	21
3.4. Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης μέσω της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS)	22
3.5. Σύγκριση των δύο τεχνικών εκχύλισης	24
3.5.1. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων	24
3.5.2. Σύνθεση μεμονωμένων πολυφαινολών	27

3.6. Ανάλυση κύριων συνιστωσών	28
4. Συμπεράσματα	29
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	30

ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Η βέλτιστη εκχύλιση μέσω της τεχνικής UBAE, που απεικονίζεται σε τρισδιάστατα γραφήματα, δείχνει τις επιδράσεις των μεταβλητών της διαδικασίας στις αποκρίσεις (TCC και DPPH). Για το TCC, το διάγραμμα (Α) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X1 (λόγος υγρού προς στερεό- R, mL/g) και X2 (χρόνος εκχύλισης- t, min)- το διάγραμμα (Β), τη συνδιακύμανση στα X1 και X3 (ισχύς υπερήχων- E, %)- και το διάγραμμα (Γ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3. Για το DPPH, το διάγραμμα (Δ) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X1 και X2, το διάγραμμα (Ε), τη συνδιακύμανση στα X1 και X3 και το διάγραμμα (ΣΤ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3.

Σχήμα 2. Η βέλτιστη εκχύλιση μέσω της τεχνικής STE, η οποία απεικονίζεται σε τρισδιάστατα γραφήματα, καταδεικνύει τις επιδράσεις των μεταβλητών της διεργασίας στις αποκρίσεις (TCC και DPPH). Για το TCC, το διάγραμμα (Α) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X1 (λόγος υγρού προς στερεό- R, mL/g) και X2 (χρόνος εκχύλισης- t, min), το διάγραμμα (Β), τη συνδιακύμανση στα X1 και X3 (θερμοκρασία εκχύλισης- T, °C) και το διάγραμμα (Γ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3. Για το DPPH, διάγραμμα(Δ), η συνδιακύμανση στα X1 και X2, το διάγραμμα (Ε), η συνδιακύμανση στα X1 και X3 και το διάγραμμα (ΣΤ), η συνδιακύμανση στα X2 και X3.

Σχήμα 3. Τα διαγράμματα Pareto απεικονίζουν τη σημασία κάθε εκτίμησης παραμέτρου για τις τεχνικές UBAE και STE στις δοκιμασίες TCC (Α,Β) και DPPH (C,D), αντίστοιχα. Ένας ροζ αστερίσκος περιλαμβάνεται στο διάγραμμα για να υποδηλώσει το επίπεδο σημαντικότητας ($p < 0,05$). Οι κόκκινες ράβδοι δείχνουν αρνητικές τιμές και οι μπλε ράβδοι δείχνουν θετικές τιμές.

Σχήμα 4. Η βελτιστοποίηση των τεχνικών UBAE και STE από τα αποσπάσματα TPIW παρουσιάζεται στα διαγράμματα.

Σχήμα 5. Φάσματα UV των εκχυλισμάτων από TPIW που ελήφθησαν υπό βέλτιστες συνθήκες με τη χρήση των τεχνικών UBAE και STE με αραιώσεις 1:50 και 1:5, αντίστοιχα. Για λόγους σύγκρισης συμπεριλήφθηκε ένα πρότυπο λυκοπένιο σε 3,5 mg/L.

Σχήμα 6. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τεχνικών UBAE και STE για την εξαγωγή ενώσεων από TPIW, εστιάζοντας στις μετρούμενες μεταβλητές.

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Πειραματικά ευρήματα για τις τρεις εξεταζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών στην τεχνική UBAE.

Πίνακας 2. Πειραματικά ευρήματα για τις τρεις εξεταζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών στην τεχνική STE.

Πίνακας 3. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για το τετραγωνικό πολυωνυμικό μοντέλο απόκρισης-επιφάνειας στο πλαίσιο των τεχνικών UBAE και STE.

Πίνακας 4. Οι βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής μεγιστοποιούν τις προβλεπόμενες αποκρίσεις για τις εξαρτημένες μεταβλητές.

Πίνακας 5. Η υψηλότερη επιθυμητή τιμή για κάθε μεταβλητή σε κάθε βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης για τις διαδικασίες UBAE και STE διαπιστώθηκε από το προφίλ πρόβλεψης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS).

Πίνακας 6. Οι βιοδραστικές ενώσεις και οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες αξιολογήθηκαν υπό βέλτιστες συνθήκες χρησιμοποιώντας τις τεχνικές UBAE και STE για τα εκχυλίσματα TPIW.

Πίνακας 7. Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικών ενώσεων με τις τεχνικές UBAE και STE για εκχυλίσματα TPIW.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ντομάτα, η οποία είναι επιστημονικά γνωστή ως *Lycopersicon esculentum*, αποτελεί μια ιδιαίτερα καλλιεργούμενη καλλιέργεια λαχανικών παγκοσμίως και βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής [1]. Τα διάφορα πλεονεκτήματα της κατανάλωσης ντομάτας για την υγεία περιλαμβάνουν τη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα, την αποφυγή φλεγμονωδών αντιδράσεων και την πρόληψη του καρκίνου. Ετησίως, διακινούνται ~130 εκατομμύρια τόνοι ντομάτας, συμπεριλαμβανομένων 8 εκατομμυρίων τόνων αποβλήτων. Ένας σημαντικός αριθμός τοματών δεν πληροί τα πρότυπα χρώματος, ωριμότητας και μορφής, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες για τους παραγωγούς και επιζήμιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις [1]. Η επεξεργασία παράγει σημαντική ποσότητα αποβλήτων φλοιού ντομάτας. Η ανάπτυξη νέων εφαρμογών για τα απόβλητα τομάτας είναι απαραίτητη και η ανακύκλωσή τους αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό ζήτημα. Ο τοματοπολτός, το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει από τη βιομηχανική επεξεργασία της τομάτας, οδηγεί συχνά στη διάθεση πολυαρίθμων σπόρων και φλοιών τομάτας σε χώρους υγειονομικής ταφής ή στη χρήση τους ως ζωοτροφές και λιπάσματα [2].

Το λυκοπένιο, που περιλαμβάνει το 80-90% των χρωστικών ουσιών στις ώριμες ντομάτες, είναι το κύριο αντιοξειδωτικό- ωστόσο, τα καροτενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις, οι βιταμίνες και διάφορα άλλα φυτοχημικά είναι επίσης διαδεδομένα [3]. Πολλαπλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνδέσει την κατανάλωση καροτενοειδών, ιδίως λυκοπενίου, με την πρόληψη του καρκίνου και των καρδιαγγειακών παθήσεων [4]. Οι φαινόλες μετριάζουν τις ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες μέσω των αντιβακτηριακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους [5].

Τα βιοαπόβλητα είναι ένας σπουδαίος πόρος που περισσεύει από τις διαδικασίες παραγωγής. Η απόρριψη ή η μη ανακύκλωσή τους θα μπορούσε να βλάψει το περιβάλλον, καθώς και να οδηγήσει σε οικονομικές απώλειες για την εταιρεία. Ο τομέας των λαχανικών και τα έξοδα και τα απόβλητα που σχετίζονται με τη γεωργία έχουν τεθεί στο επίκεντρο της επιστημονικής προσοχής. Αυτά τα απόβλητα κομποστοποιούνται και εφαρμόζονται στις καλλιέργειες, ώστε να ανακυκλωθούν τα θρεπτικά συστατικά [6]. Η καθιέρωση πιο βιώσιμων συστημάτων διατροφής και η αντιμετώπιση του αυξανόμενου προβλήματος της υπερκατανάλωσης φυσικών πόρων εξαρτάται πρώτα από τη μείωση των αποβλήτων. Συνιστάται να ενισχυθεί η αγορά υποπροϊόντων ώστε να συμβάλει στη μείωση της κατανάλωσης πρώτων υλών και των σχετικών αποβλήτων [7]. Μια σημαντική πρόκληση είναι η μεταστροφή της αντίληψης των καταναλωτών για τα απόβλητα από πρόβλημα σε πόρο με τον εντοπισμό νέων εφαρμογών σε τομείς όπως η βιοενέργεια, τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και η ανάκτηση συστατικών που μπορούν να ενισχύσουν και να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων [1].

Η εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες έχει πράγματι αποτελέσει ακρογωνιαίο λίθο στον τομέα των τροφίμων για την εξαγωγή πολύτιμων ενώσεων, όπως τα καροτενοειδή από τις

ντομάτες. Οι ερευνητές έχουν εξερευνήσει μια ποικιλία διαλυτών, τόσο πολικών όσο και μη πολικών, όπως εξάνιο, αιθανόλη, ακετόνη, διχλωρομεθάνιο, πετρελαϊκός αιθέρας, βενζόλιο και χλωροφόρμιο [8]. Ωστόσο, πολλοί μη πολικοί διαλύτες, παρά την υψηλή αποδοτικότητά τους στην εκχύλιση, ενέχουν σημαντικούς κινδύνους για την υγεία και το περιβάλλον. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, έχουν αναπτυχθεί καινοτόμες μέθοδοι. Για παράδειγμα, οι Gionanoudis et al. [9] εισήγαγαν μια τεχνική εκχύλισης σημείου θόλωσης (CPE) με χρήση λεκιθίνης για την ανάκτηση καροτενοειδών από υγρά απόβλητα ντομάτας. Η μέθοδος αυτή προσφέρει μια ασφαλέστερη εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών διαλυτών. Παρομοίως, οι Vlachoudi et al. [10] βελτίωσαν την εκχύλιση καροτενοειδών από απόβλητα βιομηχανίας τομάτας χρησιμοποιώντας έναν βαθύ ευτηκτικό διαλύτη μενθόλης/εξανικού οξέος (2:1), ο οποίος είναι πιο φιλικός προς το περιβάλλον. Η αιθανόλη, ως διαλύτης ποιότητας τροφίμων, είναι επίσης μια βιώσιμη επιλογή για την εκχύλιση καροτενοειδών, εξισορροπώντας την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια [11]. Αυτές οι εξελίξεις αναδεικνύουν τις συνεχιζόμενες προσπάθειες για την εξεύρεση ασφαλέστερων και πιο βιώσιμων μεθόδων εκχύλισης στη βιομηχανία τροφίμων.

Η χρήση θερμότητας και η παρατεταμένη διάρκεια σε κλασικές διαδικασίες όπως η εκχύλιση Soxhlet και η εκχύλιση με διαβροχή θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη εκλεκτικότητα και ακόμη και στην καταστροφή πολυτιμών ενώσεων που είναι ευαίσθητες στη θερμότητα. Οι βελτιωμένες αποδόσεις, οι λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και η μεγαλύτερη ανάκτηση των ενώσεων-στόχων έχουν προκύψει από την πρόοδο των διαδικασιών εκχύλισης [12]. Μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος εκχύλισης είναι οι υπέρηχοι, οι οποίοι δημιουργούν φυσαλίδες σπηλαίωσης στον διαλύτη. Οι φυσαλίδες αυτές, που καταρρέουν κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα, βλάπτουν τους φυτικούς ιστούς και βελτιώνουν τη διείσδυση του διαλύτη. Με λιγότερη θερμότητα που χρησιμοποιείται, αυτό το μηχανικό αποτέλεσμα προάγει τη μεταφορά μάζας, οδηγώντας σε ταχύτερη εκχύλιση και μεγαλύτερες αποδόσεις. Τόσο οι υδρόφιλες όσο και οι υδρόφοβες βιοδραστικές ουσίες μπορούν να εκχυλιστούν με ασφάλεια χρησιμοποιώντας την εκχύλιση με υπέρηχους [13]. Η εκχύλιση με υπέρηχους είναι αναμφίβολα μια πολλά υποσχόμενη τεχνική, ωστόσο, πρέπει πρώτα να αντιμετωπιστούν ορισμένα μειονεκτήματα. Τα αποτελέσματα των κυμάτων υπέρηχων εξαρτώνται από τη θέση της μήτρας και του διαλύτη. Επιπλέον, η έλλειψη ελέγχου της θερμοκρασίας υπό συνεχή κύματα υπέρηχων θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερθέρμανση. Τέλος, η ανάγκη βελτιστοποίησης της έντασης των υπέρηχων είναι ζωτικής σημασίας, η ανάδευση του υγρού θα μπορούσε να προχωρήσει σε υψηλές τιμές έντασης, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένη διάδοση των υπερηχητικών κυμάτων [14].

Η εκχύλιση βιοδραστικών χημικών ουσιών από τις τομάτες και τα υποπροϊόντα τους, ιδίως μέσω μεθόδων πράσινης εκχύλισης, έχει διερευνηθεί διεξοδικά τα τελευταία χρόνια [15-21]. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη αναφορών που αφορούν τη βελτιστοποίηση των μεθόδων

εκχύλισης με υπερήχους χρησιμοποιώντας διαλύτες ποιότητας τροφίμων. Η παρούσα μελέτη αντιμετωπίζει το προαναφερθέν κενό και προχωρά σε συστηματική διερεύνηση. Η βελτιστοποίηση μιας πράσινης εκχύλισης τεχνικής με χρήση αιθανόλης, ενός φιλικού προς το περιβάλλον και συμβατού με τα τρόφιμα διαλύτη, αντιμετωπίζει ένα κενό στη βιβλιογραφία. Για τον σκοπό αυτό, η μελέτη αποσκοπούσε στην αξιοποίηση των αποβλήτων της βιομηχανίας επεξεργασίας τομάτας με τη χρήση αιθανόλης ως διαλύτη, στη βελτιστοποίηση μιας πράσινης τεχνικής εκχύλισης (δηλαδή της εκχύλισης με τη βοήθεια υπερήχων σε λουτρό) και στη σύγκρισή της με μια συμβατική τεχνική ανάδευσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία ενός νέου προϊόντος υψηλής προστιθέμενης αξίας στον τομέα των τροφίμων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Διαλύτες, αντιδραστήρια και υλικά

Το άνυδρο ανθρακικό νάτριο αγοράστηκε από την Penta (Πράγα, Τσεχική Δημοκρατία) και το χλωριούχο σίδηρο (III) αποκτήθηκε από την Merck (Darmstadt, Γερμανία). Η μεθανόλη, το υδροχλωρικό οξύ, η 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), η συνθετική ρίζα 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH-), το αναλυτικό πρότυπο λυκοπενίου ($\geq 85\%$) και όλα τα πρότυπα για τον προσδιορισμό των πολυφαινόλων με HPLC αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία). Αυτά περιλάμβαναν τόσο φλαβονοειδή (δηλαδή ρουτίνη, ναρινγίνη, διυδροχαλκόνη ναρινγίνης και ναρινγενίνη) όσο και μη φλαβονοειδή (δηλαδή ακετονιτρίλιο, συριγγικό οξύ, 4-μεθυλοκατεχόλη, φερουλικό οξύ, trans-κινναμωμικό οξύ και 3,4,5-τριμεθοξικινναμωμικό οξύ). Η αιθανόλη, το γαλλικό οξύ και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αγοράστηκαν από την Panreac Co. (Βαρκελώνη, Ισπανία). Το ακετονιτρίλιο ελήφθη από την Labkem (Βαρκελώνη, Ισπανία). Μια στήλη απιονισμού παρήγαγε απιονισμένο νερό για τα πειράματα που διεξήχθησαν. Το εργοστάσιο επεξεργασίας ντομάτας Damavand S.A., που βρίσκεται στη Φίλια (Καρδίτσα, Κεντρική Ελλάδα) προμήθευσε τα απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας ντομάτας (TPIW), τα οποία περιλάμβαναν τους σπόρους και τους φλοιούς των ντοματών. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι την ανάλυση.

2.2. Οργανολογία

Για τη λυοφιλοποίηση των δειγμάτων TPIW χρησιμοποιήθηκε ένας ξηραντήρας κατάψυξης Biobase BK-FD10 (Biobase Group, Jinan, Κίνα). Ένας ηλεκτρικός μύλος χρησιμοποιήθηκε για την άλεση του αποξηραμένου υλικού, το οποίο μετατράπηκε σε λεπτή σκόνη αφού κοσκινίστηκε με συσκευή κοσκίνισης Analysette 3 PRO της Fritsch GmbH (Oberstein, Γερμανία). Χρησιμοποιήθηκε κόσκινο διαμέτρου 400 μm για να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία του μεγέθους των σωματιδίων. Μια μαγνητική πλάκα ανάδευσης Heidolph της Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία εκχύλισης. Αντίστοιχα, η διαδικασία υπερήχων (US)

διεξήχθη μέσω ενός λουτρού Elmasonic P70H US της Elma Schmidbauer, GmbH (Singen, Γερμανία). Το υπερκείμενο υγρό από όλα τα εκχυλίσματα απομονώθηκε μέσω διαδικασίας φυγοκέντρωσης με φυγόκεντρο NEYA 16R της Remi Elektrotechnik Ltd. (Palghar, Ινδία) και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -40°C σε καταψύκτη Platinum 500 model της Angelantoni Life Sciences (Massa Martana, Ιταλία). Για τη διενέργεια φασματοφωτομετρικών προσδιορισμών χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Shimadzu UV-1900i PharmaSpec (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Τέλος, ο χρωματογραφικός ποσοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) της Shimadzu Europa GmbH (Duisburg, Γερμανία). Η συσκευή HPLC ήταν ένα μοντέλο Shimadzu CBM-20A συνδεδεμένο με ανιχνευτή διόδων SPD-M20A (DAD). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ($100\text{ \AA}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $4,6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$) ήταν μοντέλο C18(2) της Phenomenex Luna της Phenomenex Inc. (Torrance, CA, ΗΠΑ).

2.3. Διαδικασία εκχύλισης

2.3.1. Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων σε λουτρό (UBAE)

Το αποξηραμένο με κατάψυξη TPIW εκχυλίστηκε σε λουτρό υπερήχων σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Μια αναλογία υγρού προς υλικό $10\text{--}40\text{ mL/g}$ σκόνης TPIW αναμίχθηκε με αιθανόλη σε φιάλη 25 mL με βιδωτό καπάκι. Στο λουτρό υπερήχων η συχνότητα ρυθμίστηκε στα 37 kHz σε λειτουργία σάρωσης, με την υψηλότερη ισχύ 220 W και σε διάρκεια $5\text{--}25$ λεπτά (με χρήση διαστημάτων 10 λεπτών). Η θερμοκρασία μετρήθηκε να είναι $<40^{\circ}\text{C}$ πριν και μετά τον υπερηχητικό διαδικασία ηχομόνωσης. Τέλος, το υπερκείμενο υγρό από τα φυγοκεντρημένα δείγματα αποθηκεύτηκε στους -40°C .

2.3.2. Εκχύλιση με ανάδευση (STE)

Μια ποσότητα ψυχρής αποξηράνσης TPIW αναμίχθηκε με 10 mL αιθανόλης σε φιάλη 25 mL με βιδωτό καπάκι. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης με συνεχή ανάδευση 500 rpm σε διάρκεια $30\text{--}90$ λεπτών (χρησιμοποιώντας διαστήματα 30 λεπτών). Τα υπερκείμενα από τα φυγοκεντρημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -40°C .

2.4. Πειραματικός σχεδιασμός και βελτιστοποίηση με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM)

Η Μεθοδολογία Επιφάνειας-Απόκρισης (RSM) μέσω του σχεδιασμού Box-Behnken, που περιλαμβάνει τρεις παράγοντες σε τρία επίπεδα, χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβωθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την ολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή (TCC) και την αντιριζική δράση (δέσμευση ρίζας DPPH). Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόστηκε σε δύο μεθόδους εκχύλισης: (I) εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων σε λουτρό (UBAE) και (II) ανάδευση με ανάδευση (STE) με χρήση TPIW. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εξετάστηκαν περιλάμβαναν τον λόγο υγρού προς στερεό (R, mL/g) ως X1, τον χρόνο εκχύλισης (t, min) ως X2, και είτε την ισχύ υπερήχων (E, %) είτε τη θερμοκρασία εκχύλισης ($T,^{\circ}\text{C}$) ως X3. Στις μεταβλητές αυτές αποδόθηκαν τρία κωδικοποιημένα

επίπεδα: χαμηλό (− 1), μεσαίο (0) και υψηλό (+1), όπως φαίνεται στον πίνακα 1 για την UBAE και στον πίνακα 2 για την STE (βλ. παρακάτω). Για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν 15 πειραματικές εκτελέσεις με 3 κεντρικά σημεία. Κάθε εκτέλεση επαναλήφθηκε τρεις φορές, καταγράφοντας τις μέσες τιμές απόκρισης.

Πίνακας 1. Πειραματικά ευρήματα για τις τρεις εξεταζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών στην τεχνική UBAE.

Σημείο Σχεδιασμού	Ανεξάρτητες Μεταβλητές			Αποκρίσεις			
				TCC (μg LyE/g dw)		DPPH (μmol AAE/g dw)	
	X_1 (R, mL/g)	X_2 (t, min)	X_3 (E, %)	Πραγματικό	Προβλεπόμενο	Πραγματικό	Προβλεπόμενο
1	1 (40)	-1 (5)	0 (80)	164.9 ± 6.6	241.7	6.56 ± 0.33	6.52
2	-1 (10)	1 (25)	0 (80)	325.4 ± 18.2	287.3	4.28 ± 0.27	4.40
3	0 (25)	0 (15)	0 (80)	115.4 ± 5.7	122.0	5.30 ± 0.12	5.24
4	0 (25)	1 (25)	-1 (60)	148.8 ± 8.6	228.7	5.69 ± 0.33	6.11
5	-1 (10)	0 (15)	-1 (60)	294 ± 20	222.7	3.06 ± 0.09	2.56
6	1 (40)	0 (15)	-1 (60)	121.6 ± 8.8	71.0	6.84 ± 0.44	6.41
7	0 (25)	0 (15)	0 (80)	119.8 ± 6.9	122.0	5.36 ± 0.24	5.24
8	0 (25)	-1 (5)	-1 (60)	121.2 ± 4.1	146.0	5.15 ± 0.18	5.67
9	-1 (10)	-1 (5)	0 (80)	406.6 ± 13.4	393.5	5.31 ± 0.39	5.26
10	0 (25)	-1 (5)	1 (100)	475.7 ± 28.1	387.2	6.59 ± 0.45	6.17
11	0 (25)	0 (15)	0 (80)	113.5 ± 4.9	122.0	5.07 ± 0.21	5.24
12	1 (40)	1 (25)	0 (80)	143.9 ± 3.6	135.5	5.68 ± 0.36	5.65
13	1 (40)	0 (15)	1 (100)	141.1 ± 4.1	123.2	2.50 ± 0.05	3.00
14	-1 (10)	0 (15)	1 (100)	152.4 ± 7.3	275.0	3.91 ± 0.28	4.34
15	0 (25)	1 (25)	1 (100)	125.5 ± 7.5	92.1	4.51 ± 0.12	4.00

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριπλών προσδιορισμών ± τυπική απόκλιση. UBAE, εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων- TCC, συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή- LyE, ισοδύναμα λυκοπενίου- DPPH, αντιριζική δράση- AAE, ισοδύναμα ασκορβικού οξέος- dw, ξηρό βάρος.

Πίνακας 2. Πειραματικά ευρήματα για τις τρεις εξεταζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αποκρίσεις των εξαρτημένων μεταβλητών στην τεχνική STE.

Σημείο Σχεδιασμού	Ανεξάρτητες Μεταβλητές			Αποκρίσεις			
				TCC (μg LyE/g dw)		DPPH (μmol AAE/g dw)	
ού	X_1 (R, mL/g)	X_2 (t, min)	X_3 (T, °C)	Πραγματικό	Προβλεπόμενο	Πραγματικό	Προβλεπόμενο
1	1 (40)	-1 (30)	0 (50)	442.1 ± 24.3	504.0	21.01 ± 1.16	19.61
2	-1 (10)	1 (90)	0 (50)	224.9 ± 13.5	198.0	8.46 ± 0.27	9.03
3	0 (25)	0 (60)	0 (50)	491.6 ± 16.7	481.1	16.13 ± 0.52	15.96
4	0 (25)	1 (90)	-1 (20)	191.8 ± 5.6	232.2	9.61 ± 0.44	9.79
5	-1 (10)	0 (60)	-1 (20)	97 ± 5.3	101.0	5.84 ± 0.33	5.18
6	1 (40)	0 (60)	-1 (20)	247.1 ± 17.5	241.0	12.55 ± 0.7	12.32
7	0 (25)	0 (60)	0 (50)	471 ± 17.4	481.1	14.85 ± 0.65	15.96
8	0 (25)	-1 (30)	-1 (20)	177.7 ± 10.1	139.4	10.41 ± 0.26	11.00
9	-1 (10)	-1 (30)	0 (50)	254 ± 8.6	270.8	10.76 ± 0.57	10.24
10	0 (25)	-1 (30)	1 (80)	691.3 ± 37.3	650.9	21.69 ± 1.17	22.13
11	0 (25)	0 (60)	0 (50)	480.6 ± 26	481.1	15.88 ± 0.86	15.96
12	1 (40)	1 (90)	0 (50)	483 ± 25.6	431.2	17.81 ± 0.73	18.40
13	1 (40)	0 (60)	1 (80)	684.1 ± 30.8	680.1	24.63 ± 0.49	25.68
14	-1 (10)	0 (60)	1 (80)	347.6 ± 22.6	353.7	13.49 ± 0.35	14.10
15	0 (25)	1 (90)	1 (80)	374 ± 20.6	412.4	23.15 ± 1.74	20.92

* Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο των τριπλών προσδιορισμών ± τυπική απόκλιση. STE, εκχύλιση με ανάδευση- TCC, συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή- LyE, ισοδύναμα λυκοπενίου- DPPH, αντιριζική δράση- AAE, ισοδύναμα ασκορβικού οξέος- dw, ξηρό βάρος.

Χρησιμοποιήθηκε σταδιακή παλινδρόμηση για να βελτιωθεί η προγνωστική ακρίβεια του μοντέλου μειώνοντας τη διακύμανση από την εκτίμηση περιττών όρων, οδηγώντας σε μια πολυωνυμική εξίσωση δεύτερης τάξης που σκιαγραφεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών.

$$Y_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων

2.5.1. Προσδιορισμός της ολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (TPC)

Η αξιολόγηση της TPC βασίστηκε σε φασματοφωτομετρικές μετρήσεις ενός γαλαζωπού μείγματος στα 740 nm, όπως έχει καθιερωθεί προηγουμένως [22]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά g ξηρού βάρους (dw), όπως φαίνεται στην εξίσωση (2). Εν συντομία, 200 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος αναμίχθηκαν με τον ίδιο όγκο αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu και 1600 μL υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου 5% w/v μετά από 2 λεπτά σε σωλήνα Eppendorf. Το μείγμα επώαστηκε τελικά στους 40°C για 20 λεπτά. Υπολογίστηκαν η συνολική συγκέντρωση πολυφαινολών (CTP, mg/L), ο ακριβής όγκος του διαλύτη εκχύλισης V (σε

L) και το ξηρό βάρος του δείγματος (w, σε g). Πριν από την ανάλυση πραγματοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης 10-100 mg GAE/L σε μεθανόλη.

$$\text{TPC (mg GAE/g dw)} = \frac{C_{\text{TP}} \times V}{w} \quad (2)$$

2.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός μεμονωμένων πολυφαινόλων

Οι επιμέρους πολυφαινόλες ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν χρωματογραφικά χρησιμοποιώντας μια καθιερωμένη μέθοδο [22]. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω της σύγκρισης του φάσματος απορρόφησης και των χρόνων κατακράτησης με εκείνα των καθαρών προτύπων. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκε μέσω καμπυλών βαθμονόμησης εξαιρετικής γραμμικότητας (<0,99) (0-500 mg/L). Για την προσαρμογή των δεδομένων σε συγκεκριμένο εύρος, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την TPC για την κατάλληλη αραιώση κάθε δείγματος. Η κινητή φάση περιελάμβανε 0,5% v/v υδατικό μυρμηκικό οξύ (μείγμα A) και 0,5% v/v μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (μείγμα B). Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε σταθερός σε 1 ml/min. Ο διαχωρισμός των βιοδραστικών μορίων πραγματοποιήθηκε σε στήλη η οποία διατηρήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία στους 40°C. Η απομόνωση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φλαβονοειδών και των μη φλαβονοειδών ενώσεων απαιτεί αποτελεσματικά ξεχωριστά προγράμματα. Για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ένα πρόγραμμα διαβάθμισης. Το πρόγραμμα ξεκίνησε με αύξηση 3 λεπτών από το 5% στο 30% B, συνεχίστηκε για 34 λεπτά στο 68% B, στη συνέχεια για 1 λεπτό στο 100% B, ακολουθούμενο από 3 λεπτά αναμονής και, τέλος, επέστρεψε γρήγορα στο 5% B. Αντίθετα, το πρόγραμμα βαθμιδωτής ταυτοποίησης μη φλαβονοειδών διεξήχθη ως εξής: 5% έως 12% B σε 15 λεπτά, 55% σε 35 λεπτά και 100% σε 1 λεπτό. Η διαδικασία μείωσε τη συγκέντρωση B στο 5% μετά τη διατήρηση σταθερής κατάστασης για 3 λεπτά. Και τα δύο προγράμματα είχαν συνολική διάρκεια 40 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν σταθερός στα 20 μl.

Τα ολικά πολυφαινολικά συστατικά μπορούν να προσδιοριστούν συγκρίνοντας τα φάσματα απορρόφησης και τις περιόδους κατακράτησης με τα καθαρά πρότυπα. Για τη μέτρησή τους χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης που κυμαίνονταν από 0 έως 500 mg/L και παρουσίασαν υψηλή γραμμικότητα (<0,99). Τα αναγνωρισμένα μόρια μετρήθηκαν στο μήκος κύματος όπου οι κορυφές τους ήταν πιο αισθητές, σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

2.5.3. Προσδιορισμός των ολικών καροτενοειδών (TCC)

Το TCC των συγκεκριμένων γεωργικών αποβλήτων προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μέσω του φάσματος UV-Vis από 400 έως 700 nm, χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη μέθοδο από τους Popescu et al. [21]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αραιώση των εκχυλισμάτων με αιθανόλη και τα δείγματα σαρώθηκαν σε ένα εύρος μηκών κύματος 400-700 nm με τη χρήση κυψελίδων κυψελίδας χαλαζία 1 cm. Κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης του λυκοπενίου (0,1-5 μg/mL,

$R^2=0,9981$) για τον υπολογισμό του TCC, με τα αποτελέσματα να εκφράζονται ως μg ισοδύναμα λυκοπενίου (LyE)/g dw.

2.6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας *in vitro*

2.6.1. Δραστηριότητα δέσμησης ρίζας DPPH

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος TPIW αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμής δέσμησης ελεύθερων ριζών. Ένας όγκος 975 μL του μεθανολικού DPPH- (100 μM) αναμίχθηκε με 25 μL κάθε εκχυλίσματος, όπως συζητήθηκε προηγουμένως από τους Shehata et al. [23]. Ο αποχρωματισμός του DPPH εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 515 nm, όπου μετρήθηκε η αρχική ($A_{515(i)}$) και η τελική ($A_{515(f)}$) απορρόφηση μετά από 30 λεπτά αποθήκευσης στο σκοτάδι (Εξίσωση (3)). Συγκεκριμένα, το τυφλό διάλυμα περιείχε 975 μL του μεθανολικού DPPH- και 25 μL μεθανόλης. Ο υπολογισμός της αντιριζικής δράσης (AAR) κάθε εκχυλίσματος ήταν εφικτός με τη χρησιμοποίηση ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού παράγοντα με δυνατότητα απορρόφησης (ασκορβικό οξύ, AA). Τα αποτελέσματα αφορούσαν τον όγκο του διαλύτη (V, σε L), τη μετρούμενη συγκέντρωση AA (CAA, σε $\mu\text{mol/L}$) και την αποξηραμένη μάζα του TPIW (w, σε g), όπως φαίνεται στην εξίσωση (4).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{515(i)} - A_{515(f)}}{A_{515(i)}} \times 100 \quad (3)$$

$$A_{AR} (\mu\text{mol AAE/g dw}) = \frac{C_{AA} \times V}{w} \quad (4)$$

2.6.2. Αναγωγική ισχύς σιδήρου

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων TPIW αξιολογήθηκε περαιτέρω με μια άλλη αντιοξειδωτική δοκιμή. Χρησιμοποιήθηκε μια μεθοδολογία με βάση την αναγωγή ιόντων (δηλ. Αναγωγική ισχύς σιδήρου) από τους Shehata et al. [23], στην οποία σχηματίζεται ένα σταθερό γαλαζωπό σύμπλοκο του Fe^{2+} TPTZ και καταγράφεται η απορρόφηση στα 620 nm. Εν συντομία, 100 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος αναμίχθηκαν με 100 μL χλωριούχου σιδήρου (III). Αφού επώαστηκε στους 37°C για 30 λεπτά, προστέθηκαν στο μείγμα 1800 μL TPTZ (1 mM σε 0,05 M HCl). Η καμπύλη βαθμονόμησης του AA διαλυμένου σε 0,05 M HCl είχε εύρος 50-500 μM και χρησιμοποιήθηκε πριν από την ανάλυση. Η αναγωγική ισχύς (PR) των ιόντων σιδήρου εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση (5) και εκφράστηκε ως μmol ισοδυνάμων ασκορβικού οξέος (AAE) ανά g dw.

$$P_R (\mu\text{mol AAE/g dw}) = \frac{C_{AA} \times V}{w} \quad (5)$$

2.7. Στατιστικά στοιχεία

Κάθε δοκιμή και εκχύλιση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Οι στατιστικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της RSM και της ανάλυσης κατανομής, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού JMP® Pro 16 (SAS, Cary, NC, USA). Η ανάλυση κύριων συνιστωσών διεξήχθη με το ίδιο λογισμικό. Η δοκιμή Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας των δεδομένων. Για τη διερεύνηση των στατιστικά σημαντικών διαφορών χρησιμοποιήθηκε επίπεδο σημαντικότητας 95% σε ανάλυση διακύμανσης ενός τρόπου (ANOVA). Ακολούθησαν υπολογισμοί του post hoc ελέγχου Tukey HSD (ειλικρινά σημαντική διαφορά), εφαρμόζοντας τη μέθοδο Tukey-Kramer. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις.

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης

Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης των βιοδραστικών συστατικών του TPIW, με κύριο στόχο το λυκοπένιο και τις πολυφαινόλες, ήταν ένας από τους κύριους στόχους της μελέτης. Η στόχευση πραγματοποιήθηκε με έναν διαλύτη ενδιάμεσης πολικότητας, ο οποίος είναι επίσης συμβατός με τα τρόφιμα (δηλ. αιθανόλη). Οι πολλαπλές βιοδραστικές ουσίες προκαλούν διαφορές στη διαλυτότητα και την πολικότητα, οι οποίες ενδέχεται να περιπλέξουν τη διαδικασία εκχύλισης [24]. Η αντιοξειδωτική ικανότητα και η απόδοση της εκχύλισης επηρεάζονται επίσης σημαντικά από την τεχνική εκχύλισης και άλλες παραμέτρους επεξεργασίας. Οι σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης έχουν ξεπεράσει κρίσιμα ζητήματα, όπως η μείωση της ανάγκης για επιβλαβείς διαλύτες, η διασφάλιση της δημόσιας υγείας και η χαμηλή ενεργειακή απαίτηση. Η επιτυχής εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας βασίζεται στη χρήση ενός περιβαλλοντικά αποδεκτού διαλύτη [25]. Ως διαλύτης μέσης πολικότητας, η αιθανόλη είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην εκχύλιση τόσο πολικών όσο και μη πολικών μορίων. Λόγω της έλλειψης τοξικότητάς της, βρίσκεται εκτεταμένη εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, όπου υπερέχει στην εκχύλιση λιπιδίων, λιπαρών οξέων και φαινολικών ενώσεων [26].

Όσον αφορά το TCC στην εκχύλιση UBAE, το εύρος βρέθηκε αρκετά μεγάλο (δηλ. από 113,5 έως 475,7 $\mu\text{g/g dw}$), σημειώνοντας τετραπλάσια διαφορά. Ακόμη μεγαλύτερο εύρος βρέθηκε στην εκχύλιση με τη συμβατική STE (97-691,3 $\mu\text{g/g dw}$). Συνεπώς, φαίνεται ότι οι συνθήκες εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Ανάλογη τάση παρατηρήθηκε και στην αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Η τεχνική UBAE απέδωσε 2,50-6,84 $\mu\text{mol AAE/g dw}$, ενώ το αντίστοιχο εύρος από την τεχνική STE βρέθηκε να είναι από 5,84 έως 24,63 $\mu\text{mol AAE/g dw}$. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα ελήφθη στο εκχύλισμα που παρασκευάστηκε με τη χρήση χαμηλής έντασης υπερήχων (δηλαδή, σημείο σχεδιασμού 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η STE είναι η πιο αποτελεσματική προσέγγιση για την

εκχύλιση αντιοξειδωτικών ενώσεων από στερεά TPIW, επιτυγχάνοντας σχεδόν διπλάσια αποτελεσματικότητα από την τεχνική UBAE. Τέλος, ο Πίνακας 3 παρέχει τα στατιστικά χαρακτηριστικά της τεχνικής TCC και της βηματικής παλινδρόμησης DPPH ανάλυση ANOVA για την UBAE και την STE, αντίστοιχα. Την αφαιρέσαμε από την εξίσωση για όλες τις μεταβλητές που δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$). Το πιο σημαντικό είναι ότι τα μοντέλα που προέκυψαν ταίριαζαν ικανοποιητικά με τα δεδομένα-ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος STE είχε καλύτερη τιμή R^2 ($>0,96$).

Πίνακας 3. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για το τετραγωνικό πολυωνυμικό μοντέλο επιφάνειας-απόκρισης στο πλαίσιο των τεχνικών UBAE και STE.

Παράγοντας	UBAE		STE	
	TCC	DPPH	TCC	DPPH
<i>Συντελεστές βηματικής παλινδρόμησης</i>				
Σταθερά	121.97*	5.243*	481.07*	15.96*
X_1 – λόγος υγρού προς στερεό	-75.86*	0.628*	116.60*	4.681*
X_2 – χρόνος εκχύλισης	-53.10	-0.431	-36.42	-0.605
X_3 – ισχύς υπερήχων/θερμοκρασία	26.138	-0.404	172.93*	5.569*
X_1X_2	-	-	-	-
X_1X_3	-	-1.298*	46.6	1.107
X_2X_3	-94.45*	-0.655	-82.85*	-
X_1^2	51.004	-0.597	-72.41*	-1.641*
X_2^2	91.529*	0.811*	-57.66	-
X_3^2	-	-0.569	-64.71*	-
<i>ANOVA</i>				
F -τιμή (μοντέλο)	4.236	8.045	23.25	68.1
F -τιμή (έλλειψη προσαρμογής)	744.37	19.1	32.565	3.334
p -τιμή (μοντέλο)	0.0323*	0.0102*	0.0006*	<0.0001*
p -τιμή (έλλειψη προσαρμογής)	0.0013*	0.0504 ^{ns}	0.0300*	0.2501 ^{ns}
R^2	0.761	0.915	0.969	0.974
Προσαρμοσμένο R^2	0.581	0.801	0.927	0.960
RMSE	76.373	0.553	48.396	1.138
CV	59.6	24.55	47.52	37.71
DF (σύνολο)	14	14	14	14

* Οι τιμές επηρέασαν σημαντικά τις απαντήσεις σε επίπεδο πιθανότητας 95% ($p < 0,05$). UBAE, εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων- STE, εκχύλιση με ανάδευση- TCC, συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή- DPPH, αντιριζική δράση- ns, μη σημαντική- F -value, δοκιμή σύγκρισης της διακύμανσης του μοντέλου με την υπολειμματική (σφάλμα) διακύμανση- p -value, πιθανότητα να δούμε την παρατηρούμενη F -value εάν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής- RMSE, μέσο τετραγωνικό σφάλμα- CV, συντελεστής διακύμανσης- DF, βαθμοί ελευθερίας.

3.2. Ανάλυση μοντέλου

Απλοποιημένες πολυωνυμικές εξισώσεις δημιουργήθηκαν από την επιφάνεια απόκρισης των αξιολογημένων δεδομένων του μοντέλου, με τις μεταβλητές που δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συμβολή ($p > 0,05$) στη βελτίωση της ανάκτησης των στοχευμένων βιοδραστικών μορίων να αποκλείονται. Εξετάστηκε το TCC, με το λυκοπένιο να είναι το πιο άφθονο καροτενοειδές, και η αντιριζική δράση του μέσω της απορρόφησης DPPH. Οι

εξισώσεις (6) και (7) αναφέρονται στην UBAE, ενώ οι εξισώσεις (8) και (9) αφορούν τη διαδικασία STE. Και στις δύο περιπτώσεις, τα μοντέλα περιείχαν μόνο σημαντικούς όρους.

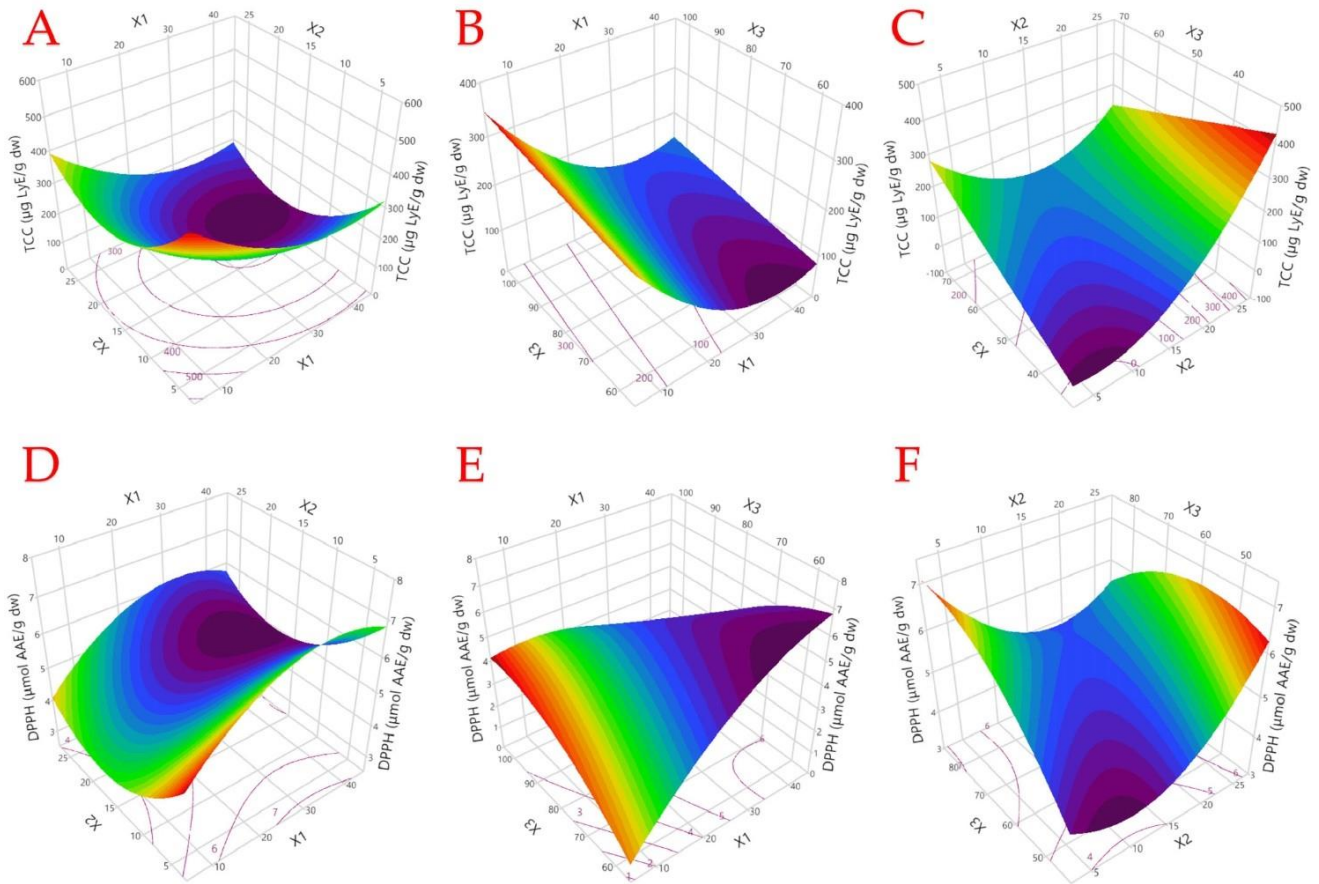
$$TCC = 4.424 - 16.392X_1 + 5.011X_2 + 8.391X_3 + 0.227X_1^2 + 0.915X_2^2 - 0.472X_2X_3 \quad (6)$$

$$DPPH = -15.06 + 0.520X_1 - 0.024X_2 + 0.365X_3 - 0.003X_1^2 + 0.008X_2^2 - 0.001X_3^2 - 0.004X_1X_3 - 0.003X_2X_3 \quad (7)$$

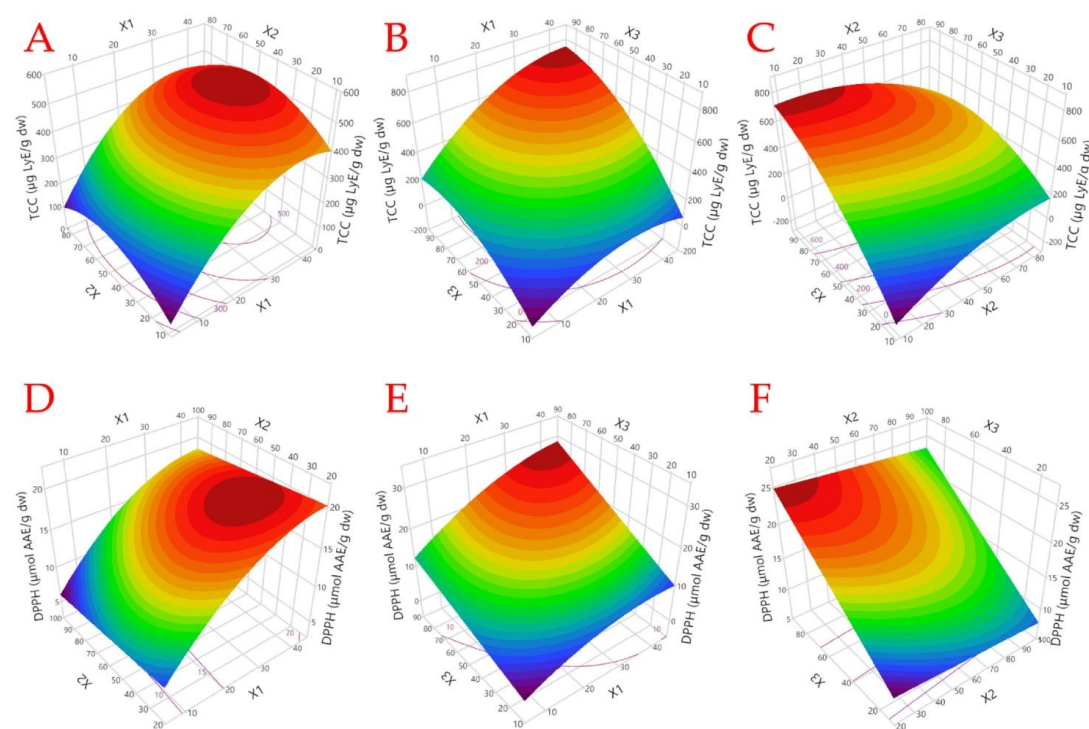
$$TCC = -686.86 + 18.686X_1 + 11.076X_2 + 15.888X_3 - 0.322X_1^2 - 0.064X_2^2 - 0.072X_3^2 + 0.104X_1X_3 - 0.092X_2X_3 \quad (8)$$

$$DPPH = -1.396 + 0.554X_1 - 0.020X_2 + 0.124X_3 - 0.007X_1^2 + 0.002X_1X_3 \quad (9)$$

Η βελτιστοποίηση της εκχύλισης των βιοδραστικών μορίων, η οποία εκτιμάται μέσω των μεθόδων TCC και DPPH, μπορεί επίσης να απεικονιστεί μέσω τρισδιάστατων γραφικών παραστάσεων που χρησιμοποιούν τις συγκεκριμένες παραμέτρους X_1 , X_2 και X_3 , όπως φαίνεται στα Σχήματα 1 και 2. Το Σχήμα 1 απεικονίζει την επίδραση των παραμέτρων X_1 και X_2 για συγκεκριμένες αναλύσεις στο πλαίσιο της τεχνικής εκχύλισης PLE. Το σκεπτικό πίσω από την ερμηνεία αυτών των διαγραμμάτων έγκειται στην επιλογή των παραμέτρων που αποδίδουν την υψηλότερη τιμή της μεταβλητής που βρίσκεται στο επίκεντρο (δηλ. κόκκινο χρώμα), ενώ οι λιγότερο ευνοϊκές χαμηλές τιμές αναπαρίστανται με μπλε χρώμα. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 1Α, το οποίο αντιστοιχεί στην τεχνική UBAE, παρατηρείται ότι για τη βελτιστοποίηση του TCC, η παράμετρος X_1 απαιτούσε τιμές κάτω από 10, ενώ για την X_2 , ήταν απαραίτητες τιμές χαμηλότερες από 5, οι οποίες υποδεικνύονται από το κόκκινο χρώμα στο γράφημα. Όσον αφορά την τεχνική STE, παρατηρήθηκε ότι η βελτιστοποίηση έδωσε υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την UBAE, όπου κυριαρχεί το μπλε χρώμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βελτιστοποίηση των συγκεκριμένων παραμέτρων δεν βελτίωσε αισθητά την εκχύλιση των βιοδραστικών μορίων. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να υποδεικνύει περαιτέρω βελτιστοποίηση των παραμέτρων όσον αφορά την τεχνική UBAE. Οι βέλτιστες συνθήκες, όπως προσδιορίστηκαν μέσω των τρισδιάστατων διαγραμμάτων και για τις δύο τεχνικές εκχύλισης, παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Μια υψηλή τιμή επιθυμητότητας (>0,95) υποδηλώνει την αξιοπιστία της μεθόδου.



Σχήμα 1. Η βέλτιστη εκχύλιση μέσω της τεχνικής UBAE, που απεικονίζεται σε τρισδιάστατα γραφήματα, δείχνει τις επιδράσεις των μεταβλητών της διαδικασίας στις αποκρίσεις (TCC και DPPH). Για το TCC, το διάγραμμα (Α) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X1 (λόγος υγρού προς στερεό- R, mL/g) και X2 (χρόνος εκχύλισης- t, min)- το διάγραμμα (Β), τη συνδιακύμανση στα X1 και X3 (ισχύς υπερήχων- E, %)- και το διάγραμμα (Γ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3. Για το DPPH, το διάγραμμα (Δ) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X1 και X2, το διάγραμμα (Ε), τη συνδιακύμανση στα X1 και X3 και το διάγραμμα (ΣΤ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3.



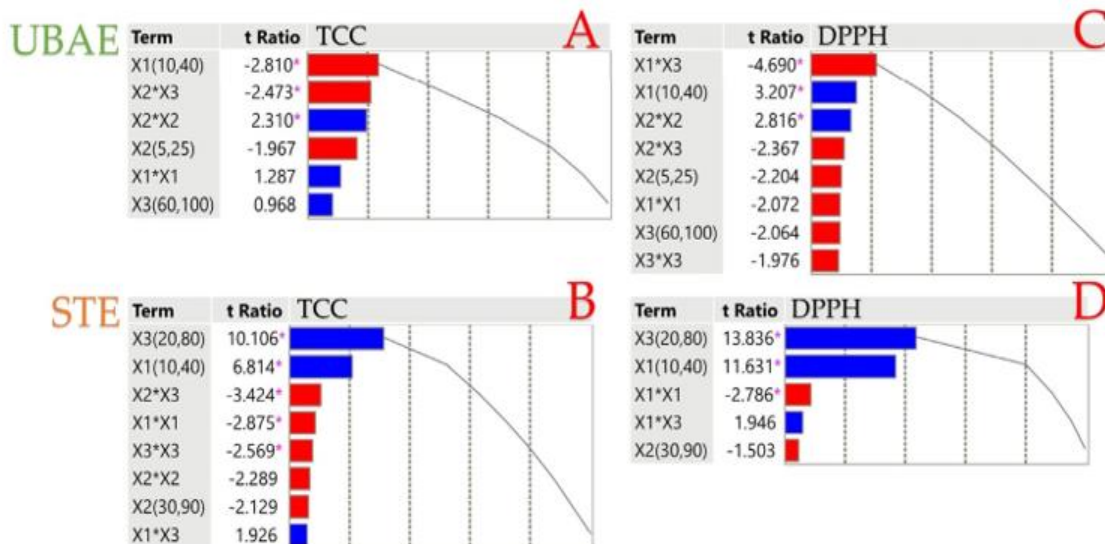
Σχήμα 2. Η βέλτιστη εκχύλιση μέσω της τεχνικής STE, η οποία απεικονίζεται σε τρισδιάστατα γραφήματα, καταδεικνύει τις επιδράσεις των μεταβλητών της διεργασίας στις αποκρίσεις (TCC και DPPH). Για το TCC, το διάγραμμα (Α) αντιπροσωπεύει τη συνδιακύμανση στα X(1) (λόγος υγρού προς στερεό- R, mL/g) και X(2) (χρόνος εκχύλισης- t, min), το διάγραμμα (Β), τη συνδιακύμανση στα X1 και X(3) (θερμοκρασία εκχύλισης- T, °C) και το διάγραμμα (Γ), τη συνδιακύμανση στα X2 και X3. Για το DPPH, διάγραμμα (Δ), η συνδιακύμανση στα X1 και X2, το διάγραμμα (Ε), η συνδιακύμανση στα X1 και X3 και το διάγραμμα (ΣΤ), η συνδιακύμανση στα X2 και X3.

Πίνακας 4. Οι βέλτιστες συνθήκες εξαγωγής μεγιστοποιούν τις προβλεπόμενες αποκρίσεις για τις εξαρτημένες μεταβλητές.

Τεχνική	Παράμετροι	Ανεξάρτητες Μεταβλητές			Επιθυμητότητα	Βηματική Παλινδρόμηση
		X ₁ (R, mL/g)	X ₂ (t, min)	X ₃ (E, %)		
UBAE	TCC (μg LyE/g dw)	10	5	96	0.9576	489.9 ± 145.5
	DPPH (μmol AAE/g dw)	40	5	66	0.9761	6.97 ± 1.17
STE		X ₁ (R, mL/g)	X ₂ (t, min)	X ₃ (T, °C)		
STE	TCC (μg LyE/g dw)	37	37	80	0.9946	731.1 ± 100.4
	DPPH (μmol AAE/g dw)	38	33	80	0.9945	25.86 ± 1.97

3.3. Ανάλυση Pareto Plot της επίδρασης των παραμέτρων εκχύλισης στις αναλύσεις

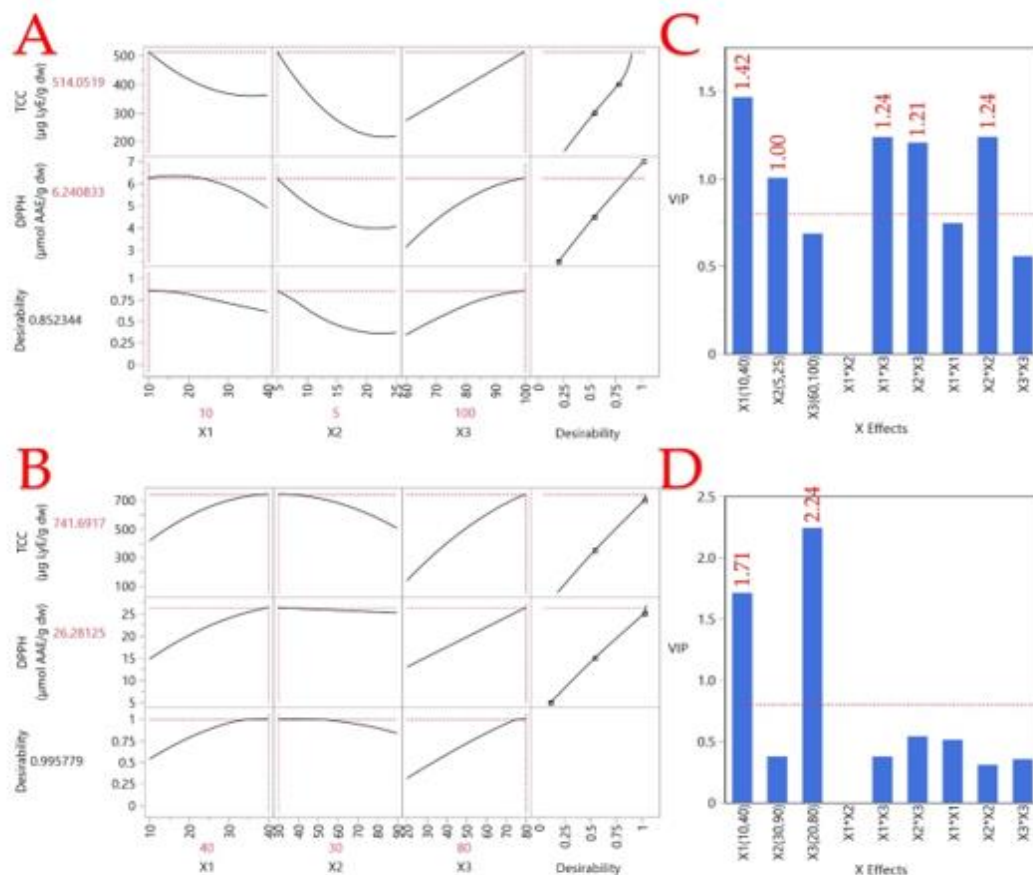
Ο αντίκτυπος των εξεταζόμενων συνθηκών εκχύλισης των δύο τεχνικών αναλύθηκε λεπτομερώς για να βελτιωθεί η κατανόηση της επιρροής τους. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα διάγραμμα Pareto. Ο λόγος t σε ένα διάγραμμα Pareto (Σχήμα 3) προσδιορίζεται διαιρώντας την εκτίμηση της παραμέτρου με το τυπικό σφάλμα της. Ο λόγος αυτός είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση της σημαντικότητας κάθε εκτίμησης παραμέτρου. Επιπλέον, η αθροιστική γραμμή στο διάγραμμα απεικονίζει το σύνολο των απόλυτων λόγων t , παρέχοντας εικόνα της σχετικής επεξηγηματικής δύναμης κάθε εκτίμησης. Το διάγραμμα χρησιμοποιεί διαφορετικά χρώματα που διακρίνονται σαφώς για την ερμηνεία. Μπλε σηματοδοτεί θετικό αντίκτυπο, ενώ το κόκκινο υποδηλώνει αρνητικό αντίκτυπο. Ο αστερίσκος υποδηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) της επίδρασης. Ως εκ τούτου, η αύξηση της παραμέτρου $X1$ είχε αρνητικό αντίκτυπο στο TCC, όπως παρατηρήθηκε στην τεχνική UBAE (Σχήμα 1A). Μια αυξανόμενη τιμή $X2$ θεωρήθηκε προτιμότερη για την εξαγωγή καροτενοειδών, ενώ η παράμετρος $X3$ δεν είχε καμία επίδραση. Από την άλλη πλευρά, η παράμετρος $X3$ είχε τεράστιο αντίκτυπο στην εκχύλιση των καροτενοειδών, μια αναμενόμενη τάση καθώς η διαλυτότητα του μορίου αυξάνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, ένας αυξανόμενος λόγος υγρού προς υλικό ήταν προτιμότερος στην τεχνική STE σε σύγκριση με τη μέθοδο UBAE, πράγμα που σημαίνει ότι η τελευταία μέθοδος απαιτούσε χαμηλότερους λόγους. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να έχει σχέση με τη διάδοση των υπερηχητικών κυμάτων εντός του διαλύματος μήτρας-διαλύτη.



Σχήμα 3. Τα διαγράμματα Pareto απεικονίζουν τη σημασία κάθε εκτίμησης παραμέτρου για τις τεχνικές UBAE και STE στις δοκιμασίες TCC (A,B) και DPPH (C,D), αντίστοιχα. Ένας ροζ αστερίσκος περιλαμβάνεται στο διάγραμμα για να υποδηλώσει το επίπεδο σημαντικότητας ($p < 0,05$). Οι κόκκινες ράβδοι δείχνουν αρνητικές τιμές και οι μπλε ράβδοι δείχνουν θετικές τιμές.

3.4. Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης μέσω της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS)

Η επίδραση των παραμέτρων εκχύλισης μελετήθηκε περαιτέρω με τη χρήση PLS για να αποκαλυφθεί γραφικά η επίδραση στις υπό εξέταση παραμέτρους. Επιπλέον, το μοντέλο θα προτείνει τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για κάθε τεχνική, λαμβάνοντας υπόψη τις βασικές παραμέτρους (δηλ. θερμοκρασία, χρόνο εκχύλισης, ένταση υπερήχων και αναλογία στερεού προς διαλύτη) [27]. Το Σχήμα 4 απεικονίζει τα αποτελέσματα από το μοντέλο PLS με τη χρήση και των δύο τεχνικών. Όσον αφορά την τεχνική UBAE, θα μπορούσε να ερμηνευτεί ότι ο λόγος διαλύτη προς στερεό είχε αρνητική επίδραση στην τεχνική DPPH-, αλλά ήταν υψηλότερος στην εκχύλιση καροτενοειδών, όπως αποκαλύπτεται στο Σχήμα 4A. Το αντίστοιχο Σχήμα 4B αποκαλύπτει πώς αυτή η παράμετρος επηρέασε θετικά την εκχύλιση των καροτενοειδών μέσω της ποσοτικοποίησης. Όσον αφορά την παράμετρο X2, η οποία ήταν και πάλι η ίδια για τις δύο τεχνικές εκχύλισης, μια παρατεταμένη διάρκεια UBAE κρίθηκε ανεπιθύμητη για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων, πιθανότατα λόγω της ευμετάβλητης φύσης των εν λόγω ενώσεων. Αυτή η παράμετρος είχε χαμηλή σημασία για την STE. Τέλος, η παράμετρος X(3), η οποία ήταν μοναδική για κάθε τεχνική εκχύλισης (δηλ. η ισχύς των υπερήχων για την UBAE και η θερμοκρασία για την STE), παρουσίασε θετική επίδραση όταν αυξήθηκε και στις δύο τεχνικές εκχύλισης. Η αυξημένη διαλυτότητα των μορίων και η αυξημένη δύναμη της φυσαλίδας σπηλαίωσης θα μπορούσαν να είναι το θέμα αυτού του μοτίβου. Τα διαγράμματα σημαντικότητας διακύμανσης (VIP) απεικονίζονται επίσης στο Σχήμα 4C, D. Η λογική πίσω από αυτά τα γραφήματα μοιάζει με εκείνη του διαγράμματος Pareto που εξετάσαμε προηγουμένως. Αντί να προσδιορίζεται αν η επίδραση κάθε εξαγωγής παράμετρος ήταν θετική ή αρνητική, η πρωταρχική εστίαση του οικοπέδου ήταν ο προσδιορισμός του κατά πόσον ο αντίκτυπος αυτός ήταν θετικός ή αρνητικός. Η κόκκινη γραμμή υποδηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα (0,8). Ανεξάρτητα από αυτό, τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα προηγούμενα ευρήματα.



Σχήμα 4. Η βελτιστοποίηση των τεχνικών UBAE και STE από τα αποσπάσματα TRIW παρουσιάζεται στα διαγράμματα (A) και (B), αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας μια συνάρτηση επιθυμητότητας με έλεγχο παρέκτασης και ένα προφίλ πρόβλεψης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Το γράφημα του διαγράμματος σπουδαιότητας μεταβλητών (VIP) παρουσιάζεται στα γραφήματα (Γ) και (Δ), τα οποία δείχνουν τις τιμές VIP για κάθε μεταβλητή πρόβλεψης στις προσεγγίσεις UBAE και STE, αντίστοιχα. Κάθε μεταβλητή στα διαγράμματα (C, D) έχει μια κόκκινη διακεκομμένη γραμμή στο επίπεδο σημαντικότητας 0,8.

Σύμφωνα με τον πίνακα 5, η τεχνική UBAE χρησιμοποιεί πράγματι μικρότερο λόγο διαλύτη προς υλικό (R) και μικρότερο χρόνο εκχύλισης (t), καθιστώντας την πιο επιθυμητή από την άποψη αυτών των μεταβλητών. Ωστόσο, η τεχνική STE υπερέχει στην επίτευξη υψηλότερης δραστηριότητας απορρόφησης ριζών TCC και DPPH, γεγονός που υποδηλώνει μια πιο αποτελεσματική διαδικασία εκχύλισης υπό τις βέλτιστες συνθήκες της. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει την αντίθεση μεταξύ των δύο τεχνικών, όπου η UBAE είναι πιο αποδοτική όσον αφορά τη χρήση διαλύτη και το χρόνο, ενώ η STE είναι πιο αποτελεσματική στην εκχύλιση υψηλότερων ποσοτήτων καροτενοειδών και αντιοξειδωτικών.

Τα πειραματικά αποτελέσματα και οι προβλέψεις του μοντέλου PLS παρουσιάζουν εξαιρετική συμφωνία, όπως αποδεικνύεται από τους υψηλούς συντελεστές συσχέτισης

0,9966 και 0,9971 και τις σημαντικές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού (R^2) 0,9933 και 0,9943 για τις τεχνικές UBAE και STE, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι τιμές p -values που είναι μικρότερες από 0,0001 τόσο για την UBAE όσο και για την STE υποδηλώνουν ότι οι αποκλίσεις μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών είναι στατιστικά ασήμαντες.

Πίνακας 5. Η υψηλότερη επιθυμητή τιμή για κάθε μεταβλητή σε κάθε βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης για τις διαδικασίες UBAE και STE διαπιστώθηκε από το προφίλ πρόβλεψης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS).

Τεχνική	Ανεξάρτητες Μεταβλητές			PLS Τιμές Μοντέλου	
	X_1 (R, mL/g)	X_2 (t, min)	X_3 (E, %)	TCC ($\mu\text{g LyE/g dw}$)	DPPH ($\mu\text{mol AAE/g dw}$)
UBAE	10	5	100	514.05	6.24
STE	X_1 (R, mL/g)	X_2 (t, min)	X_3 (T, °C)		
	40	30	80	741.69	26.28

3.5. Σύγκριση των δύο τεχνικών εκχύλισης

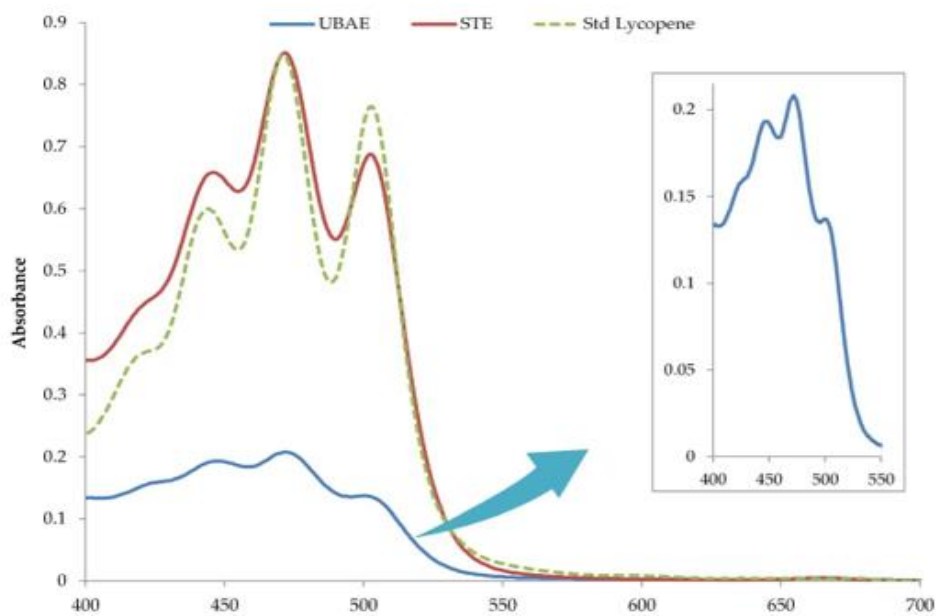
3.5.1. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων

Οι φυσικές πολυφαινόλες είναι από τους πιο γνωστούς τύπους χημικών ουσιών για τις δυνατότητές τους να βελτιώνουν την υγεία. Πολλοί τομείς θα μπορούσαν να επωφεληθούν από αυτές τις ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας τροφίμων και της φαρμακευτικής βιομηχανίας [28]. Τα καροτενοειδή που βρίσκονται στις ντομάτες, εκ των οποίων το λυκοπένιο είναι το πιο άφθονο, βοηθούν στη σημαντική μείωση του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία [29]. Η εκχύλιση των καροτενοειδών και των πολυφαινολών από υπολείμματα τομάτας είναι επομένως απαραίτητη, δεδομένου ότι έχουν επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Με βάση τον τρόπο δράσης τους, οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως πρωτογενείς είτε ως δευτερογενείς. Οι πολυφαινόλες (συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών) και τα καροτενοειδή που βρίσκονται στις ντομάτες είναι τα κύρια αντιοξειδωτικά που "σπάνε την αλυσίδα". Αυτά δίνουν άτομα υδρογόνου στις ρίζες, γεγονός που αναστέλλει ή καθυστερεί την οξείδωση των λιπιδίων. Τα "προληπτικά" είναι δευτερογενή αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν την έναρξη με τη χηλική σύνδεση μεταλλικών ιόντων, συνηθέστερα σιδήρου και χαλκού, και επιβραδύνουν την οξείδωση των λιπιδίων. Ο αναφερόμενος τρόπος δράσης θα μπορούσε να έχει μεγάλη σημασία σε περίπτωση που τα εκχυλίσματα χρησιμοποιηθούν ως φυσικά αντιοξειδωτικά σε λιπαρά τρόφιμα. Η οξείδωση των ελεύθερων ριζών και των λιπιδίων εμποδίζεται από το λυκοπένιο, το οποίο κατατάσσεται στα δευτερογενή αντιοξειδωτικά [30]. Η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε με τη χρήση δοκιμών αναγωγής ιόντων (FRAP) και δοκιμής απορρόφησης ριζών (DPPH), δεδομένης της φύσης των αντιοξειδωτικών που εξάγονται από το TPIW. Η DPPH χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της αντιοξειδωτικής

δράσης τόσο σε υδρόφιλα όσο και σε λιπόφιλα μόρια, ενώ η δοκιμασία FRAP έχει τα καλύτερα αποτελέσματα σε υδρόφιλα αντιοξειδωτικά [31]. Η μοναδική απορρόφηση UV-Vis του λυκοπενίου απεικονίζεται στο Σχήμα 5, όπου καταγράφονται τα φάσματα των δύο βέλτιστων δειγμάτων. Καταγράφηκε επίσης ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα από ένα πρότυπο διάλυμα λυκοπενίου, σε συγκέντρωση 3,5 mg/L, για λόγους σύγκρισης. Πρέπει να τονιστεί ότι το φάσμα από το δείγμα STE έμοιαζε με τις μοναδικές κορυφές από καθαρό λυκοπένιο. Το γεγονός ότι το δείγμα UBAE είχε σημαντικά χαμηλότερη απορρόφηση θα μπορούσε να είναι θέμα αποικοδόμησης του λυκοπενίου λόγω υπερήχων, όπως έχει αναφερθεί αλλού [30]. Η ασταθής φύση των καροτενοειδών θα μπορούσε να απαιτήσει την περαιτέρω βελτιστοποίηση της εκχύλισης με υπερήχους ή την ανάπτυξη άλλων τεχνικών εκχύλισης.

Για κάθε παρασκευασμένο βέλτιστο εκχύλισμα, οι μετρούμενες αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένων των βιοδραστικών ενώσεων (TPC και TCC) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH και FRAP), παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές που ελήφθησαν από την τεχνική STE είχαν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) διαφορές σε σύγκριση με την τεχνική UBAE. Το μοτίβο αυτό παρατηρήθηκε τόσο στην ανάκτηση της βιοδραστικής ουσίας όσο και στη λαμβανόμενη αντιοξειδωτική δράση.



Σχήμα 5. Φάσματα UV των εκχυλισμάτων από TPIW που ελήφθησαν υπό βέλτιστες συνθήκες με τη χρήση των τεχνικών UBAE και STE με αραιώσεις 1:50 και 1:5, αντίστοιχα. Για λόγους σύγκρισης συμπεριλήφθηκε ένα πρότυπο λυκοπένιο σε 3,5 mg/L.

Πίνακας 6. Οι βιοδραστικές ενώσεις και οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες αξιολογήθηκαν υπό βέλτιστες συνθήκες χρησιμοποιώντας τις τεχνικές UBAE και STE για τα εκχυλίσματα TPIW.

Παράμετροι	UBAE	STE
TCC (μg LyE/g)	420.8 ± 29.46	723.75 ± 46.32 *
DPPH (μmol AAE/g)	7.5 ± 0.52	19.94 ± 0.98 *
FRAP (μmol AAE/g)	4.76 ± 0.15	16.68 ± 0.82 *
TPC (mg GAE/g)	2.62 ± 0.05	3.69 ± 0.08 *

* Υποδηλώνει τις στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν $p < 0.05$ για κάθε γραμμή. Η UBAE (εκχύλιση με υπερήχους), η STE (εκχύλιση με ανάδευση), η TCC (ολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή), τα LyE (ισοδύναμα λυκοπενίου), οι δοκιμές DPPH και FRAP (αντιαντιδραστική δραστηριότητα), τα AAE (ισοδύναμα ασκορβικού οξέος), η TPC (ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες), τα GAE (ισοδύναμα γαλλικού οξέος) και το dw (ξηρό βάρος).

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι χρησιμοποιήσαμε αιθανόλη για την ανάκτηση λυκοπενίου και άλλων ενώσεων ως πράσινο διαλύτη που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον τομέα των τροφίμων σε διάφορα ελαιώδη προϊόντα. Η αιθανόλη δεν ήταν τόσο αποτελεσματική όσο άλλοι οργανικοί διαλύτες, όπως το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη και τα μοριακά μείγματα, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη των Strati et al. [15]. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν μια συμβατική τεχνική εκχύλισης με αναλογία στερεού προς υγρό 3:1-10:1 (v/w). Το μέγεθος των σωματιδίων κυμαινόταν από 500 έως 1000 μm, όπου η αιθανόλη απέδωσε έως και 6,1 mg λυκοπενίου/kg αποξηραμένων αποβλήτων τομάτας. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη των Silva et al. [20], οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο με υδρόφοβα ευτηκτικά μείγματα ως διαλύτες. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με τα δικά μας, στα οποία το απομονωμένο λυκοπένιο κυμαινόταν από 774,1 έως 1462,8 μg/g. Η συγκεκριμένη μελέτη υποδηλώνει ότι το εν λόγω μείγμα που περιλαμβάνει DL-μενθόλη και γαλακτικό οξύ θα μπορούσε να είναι ένας αξιόπιστος εναλλακτικός λιπόφιλος διαλύτης ποιότητας τροφίμων. Όσον αφορά τον προσδιορισμό της TPC, τα αποτελέσματά μας κυμάνθηκαν από 2,62 έως 3,69 mg GAE/g dw. Σε μια παρόμοια μελέτη των Grassino κ.ά. [32], οι υπέρηχοι και η υψηλή υδροστατική πίεση εφαρμόστηκαν σε απόβλητα φλοιού ντομάτας για την εξαγωγή πηκτίνης. Ωστόσο, οι συγγραφείς μέτρησαν την TPC, η οποία κυμάνθηκε από 0,16 έως 0,25 mg GAE/g dw. Η διαφορά στην ποικιλία θα μπορούσε να περιγράψει τις παραλλαγές στις παραπάνω ανακτηθείσες βιοδραστικές ενώσεις εκτός από τις τεχνικές εκχύλισης. Όσον αφορά τον διαλύτη εκχύλισης, θα μπορούσαν να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες, συμπεριλαμβανομένων άλλων διαλυτών ποιότητας τροφίμων, ώστε να φωτιστεί περισσότερο η αξιοποίηση του TPIW.

3.5.2. Σύνθεση μεμονωμένων πολυφαινολών

Η εκχύλιση πολυφαινολικών ενώσεων έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνητικών μελετών. Αρχικά, η αιθανόλη δεν είναι μόνο ένας διαλύτης ποιότητας τροφίμων, αλλά και ένας διαλύτης μέσης πολικότητας που θα μπορούσε να εκχυλίσει ένα ευρύ φάσμα πολυφαινολών. Τα αποτελέσματα από τις μεμονωμένες πολυφαινόλες που εντοπίστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Χωρίσαμε τις πολυφαινόλες σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή για την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Τα ολικά φλαβονοειδή μετρήθηκαν σε 1,03 και 2,13 mg/g στην UBAE και στην STE, αντίστοιχα. Η αντίστοιχη απόδοση των μη φλαβονοειδών ενώσεων μετρήθηκε σε 0,59 και 1,21 mg/g dw, υποστηρίζοντας περαιτέρω τα στοιχεία ότι η STE ήταν προτιμότερη τεχνική. Τα ευρήματα ήταν τόσο αντιφατικά όσο και άκρως ενδιαφέροντα, ιδίως αν ληφθεί υπόψη η προηγούμενη μελέτη των Kalompatsios et al. [22], η οποία έδειξε ότι η εκχύλιση με US probe της *Opuntia macrorhiza* πρότεινε ότι ο υπέρηχος μπορεί να χρησιμεύσει ως αξιόπιστη, χρονοβόρα και ενεργειακά αποδοτική τεχνική εκχύλισης. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν επίσης ότι η ασταθής φύση των ενώσεων που υπάρχουν στο TPIW μπορεί να εξηγήσει την αναποτελεσματικότητα των υπερήχων ως τεχνική εκχύλισης για το συγκεκριμένο υποπροϊόν. Για το σκοπό αυτό, διεξήχθη μια παρόμοια μελέτη από τους Solaberrieta et al. [19] για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από απόβλητα τομάτας. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων και υπερήχων (με έναν ανιχνευτή) χρησιμοποιώντας για το λόγο αυτό υδροαιθανολικά μείγματα. Χρησιμοποιώντας την τελευταία μέθοδο, οι συγγραφείς ποσοτικοποίησαν παρόμοιες ενώσεις με τις δικές μας (δηλ. ναρινγενίνη και ρουτίνη σε 19,3 και 7,5 mg/g dw, αντίστοιχα). Η διαφορά στην απόδοση αυτή θα μπορούσε να είναι θέμα του διαλύτη ή της εκχύλισης με υπερήχους. Ωστόσο, αποκαλύφθηκε ότι η εκχύλιση με μικροκύματα ήταν και πάλι προτιμότερη από τις ΗΠΑ, σημειώνοντας σχεδόν διπλάσια αύξηση των λαμβανόμενων πολυφαινολών.

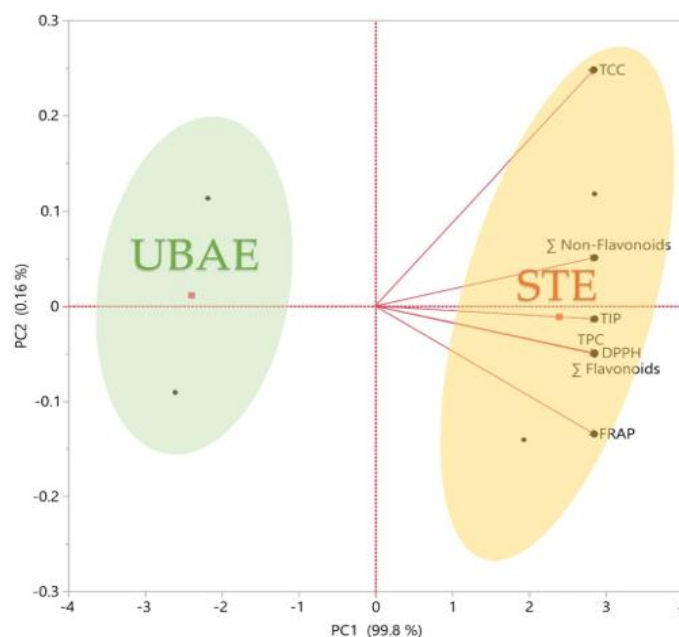
Πίνακας 7. Βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης φαινολικών ενώσεων με τις τεχνικές UBAE και STE για εκχυλίσματα TPIW.

Φαινολικές Ενώσεις (mg/g)	UBAE	STE
<i>Μη Φλαβονοειδή</i>		
Κονιφερυλική αλκοόλη	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.02 *
Συριγκικό οξύ	0.11 ± 0.01 *	n.d.
4-Μεθυλοκατεχόλη	0.03 ± 0	0.11 ± 0 *
Φερουλικό οξύ	0.07 ± 0	0.29 ± 0.02 *
Τρανς-Κιναμωμικό οξύ	0.06 ± 0	0.37 ± 0.02 *
3,4,5-Τριμεθοξυκιναμωμικό οξύ	n.d.	0.07 ± 0 *
<i>Σύνολο Μη Φλαβονοειδών</i>	0.59 ± 0.02	1.21 ± 0.08 *

Φαινολικές Ενώσεις (mg/g)	UBAE	STE
Φλαβονοειδή		
Ρουτίνη	0.29 ± 0.01	0.46 ± 0.01 *
Ναρινγίνη	0.48 ± 0.02	0.92 ± 0.02 *
Διυδροχαλκόνη ναρινγίνης	0.14 ± 0.01	0.39 ± 0.03 *
Ναρινγενίνη	0.12 ± 0	0.35 ± 0.03 *
Σύνολο Φλαβονοειδών	1.03 ± 0.04	2.13 ± 0.09 *
Συνολικά Αναγνωρισμένα Φαινολικά (TIP)	1.62 ± 0.06	3.33 ± 0.17 *

3.6. Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή πρόσθετων πληροφοριών από τις μεταβλητές και τη διεξαγωγή μιας πιο ενδεδειγμένης ανάλυσης δεδομένων. Η εύρεση μιας σχέσης μεταξύ της TPC, των καροτενοειδών και των αντιοξειδωτικών δοκιμών ήταν ο στόχος αυτής της έρευνας. Καθορίστηκαν δύο κύριες συνιστώσες με βάση τις ιδιοτιμές >1 , όπως φαίνεται στο Σχήμα 6. Μαζί, αυτοί οι παράγοντες εξηγούσαν το 99,96% της διακύμανσης. Από τα αποτελέσματα προέκυψε συσχέτιση, είτε θετική είτε αρνητική, μεταξύ των παραμέτρων. Για παράδειγμα, η TCC και το άθροισμα των συνολικών μη φλαβονοειδών είχαν θετική συσχέτιση με την PC2, ενώ όλες οι απεικονιζόμενες μεταβλητές είχαν θετική συσχέτιση με την PC1, η οποία ήταν η επικρατέστερη. Η πλειονότητα των εξεταζόμενων παραμέτρων διακρίθηκε και βρισκόταν σε κοντινή απόσταση με την τεχνική STE, τονίζοντας ότι η εν λόγω τεχνική ήταν προτιμότερη για την αξιοποίηση της TPIW.



Σχήμα 6. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τεχνικών UBAE και STE για την εξαγωγή ενώσεων από TPIW, εστιάζοντας στις μετρούμενες μεταβλητές.

4. Συμπεράσματα

Η μελέτη αυτή ενισχύει την τρέχουσα έρευνα σχετικά με τη χρήση υποπροϊόντων ντομάτας, ενός σημαντικού φρούτου στη Μεσόγειο. Οι ιδιότητες διάσπασης της αλυσίδας των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στο TPIW υποδηλώνουν ότι τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη προϊόντων υψηλής αξίας στη βιομηχανία τροφίμων. Η ασταθής φύση των βιοδραστικών ενώσεων που βρίσκονται στα TPIW καθιστά τη μέθοδο υπερήχων λιγότερο προτιμητέα επιλογή για την ανάκτησή τους. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη αναδεικνύει τις δυνατότητες για φιλικές προς το περιβάλλον και μη καταστροφικές μεθόδους εκχύλισης, οι οποίες θα μπορούσαν να αποφέρουν προϊόντα υψηλής αξίας για μελλοντική έρευνα. Μια συνιστώμενη τεχνική για την εκχύλιση λυκοπενίου είναι η μαγνητική ανάδευση, καθώς είναι μια λιγότερο καταστροφική μέθοδος. Αυτό το μοτίβο παρατηρήθηκε ομοίως στην εκχύλιση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και των μη φλαβονοειδών πολυφαινόλων. Παρόλο που η ανάκτηση μορίων με βιολογική δραστηριότητα ήταν χαμηλή, η μελέτη αυτή υποδεικνύει τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, καθώς η χρήση αιθανόλης είναι κατάλληλη για τον σκοπό αυτό. Επιπλέον, η μελέτη υποδεικνύει ευκαιρίες για την προώθηση εναλλακτικών πράσινων μεθόδων ή την εφαρμογή άλλων διαλυτών τροφίμων. Τα ευρήματα αυτά ανοίγουν νέους δρόμους για έρευνα και ανάπτυξη στον τομέα των βιώσιμων τεχνικών εκχύλισης, συμβάλλοντας στη δημιουργία προϊόντων υψηλής αξίας από TPIW.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Trombino, S.; Cassano, R.; Procopio, D.; Di Gioia, M.L.; Barone, E. Valorization of Tomato Waste as a Source of Carotenoids. *Molecules* **2021**, *26*, 5062, doi:10.3390/molecules26165062.
2. Radić, K.; Galić, E.; Vinković, T.; Golub, N.; Vitali Čepo, D. Tomato Waste as a Sustainable Source of Antioxidants and Pectins: Processing, Pretreatment and Extraction Challenges. *Sustainability* **2024**, *16*, 9158, doi:10.3390/su16219158.
3. Chaudhary, P.; Sharma, A.; Singh, B.; Nagpal, A.K. Bioactivities of Phytochemicals Present in Tomato. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 2833–2849, doi:10.1007/s13197-018-3221-z.
4. Imran, M.; Ghorat, F.; Ul-Haq, I.; Ur-Rehman, H.; Aslam, F.; Heydari, M.; Shariati, M.A.; Okuskhanova, E.; Yessimbekov, Z.; Thiruvengadam, M.; et al. Lycopene as a Natural Antioxidant Used to Prevent Human Health Disorders. *Antioxidants* **2020**, *9*, 706, doi:10.3390/antiox9080706.
5. Rudrapal, M.; Khairnar, S.J.; Khan, J.; Dukhyil, A.B.; Ansari, M.A.; Alomary, M.N.; Alshabrm, F.M.; Palai, S.; Deb, P.K.; Devi, R. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 806470, doi:10.3389/fphar.2022.806470.
6. Santagata, R.; Ripa, M.; Genovese, A.; Ulgiati, S. Food Waste Recovery Pathways: Challenges and Opportunities for an Emerging Bio-Based Circular Economy. A Systematic Review and an Assessment. *J. Clean. Prod.* **2021**, *286*, 125490, doi:10.1016/j.jclepro.2020.125490.
7. Awasthi, M.K.; Sarsaiya, S.; Patel, A.; Juneja, A.; Singh, R.P.; Yan, B.; Awasthi, S.K.; Jain, A.; Liu, T.; Duan, Y.; et al. Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bio-Products: An Assessment of Technology, Its Importance, and Strategic Applications in Circular Bio-Economy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *127*, 109876, doi:10.1016/j.rser.2020.109876.
8. Morón-Ortiz, Á.; Mapelli-Brahm, P.; Meléndez-Martínez, A.J. Sustainable Green Extraction of Carotenoid Pigments: Innovative Technologies and Bio-Based Solvents. *Antioxidants* **2024**, *13*, 239, doi:10.3390/antiox13020239.
9. Giovanoudis, I.; Athanasiadis, V.; Chatzimitakos, T.; Gortzi, O.; Nanos, G.D.; Lalas, S.I. Development of a Cloud Point Extraction Technique Based on Lecithin for the

Recovery of Carotenoids from Liquid Tomato Wastewater. *Waste* **2022**, *1*, 105–114, doi:10.3390/waste1010008.

10. Vlachoudi, D.; Chatzimitakos, T.; Athanasiadis, V.; Bozinou, E.; Lalas, S.I. Enhanced Extraction of Carotenoids from Tomato Industry Waste Using Menthol/Fatty Acid Deep Eutectic Solvent. *Waste* **2023**, *1*, 977–992, doi:10.3390/waste1040056.

11. Kultys, E.; Kurek, M.A. Green Extraction of Carotenoids from Fruit and Vegetable Byproducts: A Review. *Molecules* **2022**, *27*, 518, doi:10.3390/molecules27020518.

12. Jha, A.K.; Sit, N. Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials Using Combination of Various Novel Methods: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *119*, 579–591, doi:10.1016/j.tifs.2021.11.019.

13. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560.

14. Carreira-Casais, A.; Otero, P.; Garcia-Perez, P.; Garcia-Oliveira, P.; Pereira, A.G.; Carpena, M.; Soria-Lopez, A.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2021**, *18*, 9153, doi:10.3390/ijerph18179153.

15. Strati, I.F.; Oreopoulou, V. Effect of Extraction Parameters on the Carotenoid Recovery from Tomato Waste. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 23–29, doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x.

16. Strati, I.F.; Oreopoulou, V. Process Optimisation for Recovery of Carotenoids from Tomato Waste. *Food Chem.* **2011**, *129*, 747–752, doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.015.

17. Szabo, K.; Teleky, B.-E.; Ranga, F.; Roman, I.; Khaoula, H.; Boudaya, E.; Ltaief, A.B.; Aouani, W.; Thiamrat, M.; Vodnar, D.C. Carotenoid Recovery from Tomato Processing By-Products through Green Chemistry. *Molecules* **2022**, *27*, 3771, doi:10.3390/molecules27123771.

18. Anarjan, N. Evaluation the Effects of Ultrasonic Parameters on Simultaneously Extraction and Size Reduction of Lycopene from Tomato Processing Waste. *Waste Biomass Valorization* **2020**, *11*, 1929–1940, doi:10.1007/s12649-018-0528-y.

19. Solaberrieta, I.; Mellinas, C.; Jiménez, A.; Garrigós, M.C. Recovery of Antioxidants from Tomato Seed Industrial Wastes by Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction. *Foods* **2022**, *11*, 3068, doi:10.3390/foods11193068.

20. Silva, Y.P.A.; Ferreira, T.A.P.C.; Jiao, G.; Brooks, M.S. Sustainable Approach for Lycopene Extraction from Tomato Processing By-Product Using Hydrophobic Eutectic Solvents. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 1649–1654, doi:10.1007/s13197-019-03618-8.
21. Popescu, M.; Iancu, P.; Pleșu, V.; Bîldea, C.S.; Todasca, C.M. Different Spectrophotometric Methods for Simultaneous Quantification of Lycopene and β -Carotene from a Binary Mixture. *LWT* **2022**, *160*, 113238, doi:10.1016/j.lwt.2022.113238.
22. Kalompatsios, D.; Athanasiadis, V.; Mantiniotou, M.; Lalas, S.I. Optimization of Ultrasonication Probe-Assisted Extraction Parameters for Bioactive Compounds from *Opuntia Macrorhiza* Using Taguchi Design and Assessment of Antioxidant Properties. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 10460, doi:10.3390/app142210460.
23. Shehata, E.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D.P. Extraction Optimisation Using Water/Glycerol for the Efficient Recovery of Polyphenolic Antioxidants from Two *Artemisia* Species. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *149*, 462–469, doi:10.1016/j.seppur.2015.06.017.
24. Thoo, Y.; Ng, S.Y.; Khoo, M.; Mustapha, W.; Ho, C. A Binary Solvent Extraction System for Phenolic Antioxidants and Its Application to the Estimation of Antioxidant Capacity in *Andrographis Paniculata* Extracts. *Int. Food Res. J.* **2013**.
25. Athanasiadis, V.; Chatzimitakos, T.; Makrygiannis, I.; Kalompatsios, D.; Bozinou, E.; Lalas, S.I. Antioxidant-Rich Extracts from Lemon Verbena (*Aloysia Citrodora* L.) Leaves through Response Surface Methodology. *Oxygen* **2024**, *4*, 1–19, doi:10.3390/oxygen4010001.
26. Lee, J.-E.; Jayakody, J.T.M.; Kim, J.-I.; Jeong, J.-W.; Choi, K.-M.; Kim, T.-S.; Seo, C.; Azimi, I.; Hyun, J.; Ryu, B. The Influence of Solvent Choice on the Extraction of Bioactive Compounds from Asteraceae: A Comparative Review. *Foods* **2024**, *13*, 3151, doi:10.3390/foods13193151.
27. More, P.R.; Jambrak, A.R.; Arya, S.S. Green, Environment-Friendly and Sustainable Techniques for Extraction of Food Bioactive Compounds and Waste Valorization. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *128*, 296–315, doi:10.1016/j.tifs.2022.08.016.
28. Zhang, Z.; Li, X.; Sang, S.; McClements, D.J.; Chen, L.; Long, J.; Jiao, A.; Jin, Z.; Qiu, C. Polyphenols as Plant-Based Nutraceuticals: Health Effects, Encapsulation, Nano-Delivery, and Application. *Foods* **2022**, *11*, 2189, doi:10.3390/foods11152189.
29. Crupi, P.; Faienza, M.F.; Naeem, M.Y.; Corbo, F.; Clodoveo, M.L.; Muraglia, M. Overview of the Potential Beneficial Effects of Carotenoids on Consumer Health and Well-Being. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1069, doi:10.3390/antiox12051069.

30. Campos-Lozada, G.; Pérez-Marroquín, X.A.; Callejas-Quijada, G.; Campos-Montiel, R.G.; Morales-Peñaloza, A.; León-López, A.; Aguirre-Álvarez, G. The Effect of High-Intensity Ultrasound and Natural Oils on the Extraction and Antioxidant Activity of Lycopene from Tomato (*Solanum Lycopersicum*) Waste. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1404, doi:10.3390/antiox11071404.
31. Munteanu, I.G.; Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3380, doi:10.3390/ijms22073380.
32. Ninčević Grassino, A.; Ostojić, J.; Miletić, V.; Djaković, S.; Bosiljkov, T.; Zorić, Z.; Ježek, D.; Rimac Brnčić, S.; Brnčić, M. Application of High Hydrostatic Pressure and Ultrasound-Assisted Extractions as a Novel Approach for Pectin and Polyphenols Recovery from Tomato Peel Waste. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *64*, 102424, doi:10.1016/j.ifset.2020.102424.