

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εκχύλιση και Χαρακτηρισμός Βιοδραστικών Συστατικών από
Υπολείμματα Καφέ Εσπρέσσο
Extraction and Characterization of Bioactive Compounds from
Espresso Coffee Residue**

Βιολέττα Διονυσίδου Κωνσταντινίδου (3520023)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μανούρας Αθανάσιος, Καθηγητής

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Κωνσταντίνα Πουλιανίτη, Εξωτερική Διδάσκουσα

Τρίκαλα, 2025

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. (a) Διαγραμματική δομή του φυτού του καφέ και του καρπού του, με την αντιπροσωπευτική τους σύνθεση. (b) Γραφική παράσταση παραγωγής πράσινου καφέ ανά χώρα, εκφρασμένη σε χιλιάδες τόνους.(Hernández-Varela & Medina, 2023)	10
Εικόνα 2. Επίδραση της συνήθους (ήπιας έως μέτριας) κατανάλωσης καφέ και τσαγιού (Chieng & Kistler, 2022).....	16
Εικόνα 3: Ποτήρια ζέσεως.....	24
Εικόνα 4: Ζύγιση δοχείων με τις ετικέτες	24
Εικόνα 5 Ζύγιση 100g καφέ.....	24
Εικόνα 6 Συσσκευή Υπερηχητικής Εκχύλισης - Ultrasonic Extraction Tank.....	26
Εικόνα 7 Τέλος Εκχύλισης με την μέθοδο Υπερήχων	26
Εικόνα 8 Συλλογή δείγματος μετά το τέλος της Υποβοηθούμενης Εκχύλισης με Υπερήχους.....	26
Εικόνα 9 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού - Solid Liquid Extraction (SLE) 20λεπτά βρασμός με συνεχή ανάδευση	28
Εικόνα 10 Τοποθέτηση Μαγνήτη Ανάδευσης στο δείγμα για συνεχή ανάδυσή του	28
Εικόνα 11 Συνεχής ανάδευση του δείγματος πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα.....	29
Εικόνα 12 Συσσκευή Εκχύλισης Τροποποιημένης Soxhlet Solid Liquid Extraction - Τροποποιημένη Soxhlet	30
Εικόνα 13 Εκχύλισμα Τροποποιημένης Soxhlet	31
Εικόνα 14 Solid Liquid Extraction 24ώρες βρασμός με συνεχή ανάδευση	32
Εικόνα 15 Τέλος 24ωρης Εκχύλισης Στερεού-Υγρού.....	33
Εικόνα 16 Δείγμα Εκχύλισης σε Falcon πριν την φυγοκέντρηση.....	33
Εικόνα 17 Φυγόκεντρος με Falcon στις 4 θέσεις	34
Εικόνα 18 Δείγμα μετά το πέρας της Φυγοκέντρησης. Στο κάτω μέρος του Falcon διακρίνεται ίζημα	34
Εικόνα 19 Εκχύλισμα Υπερήχων μετά την Φυγοκέντρηση	34
Εικόνα 20 Εκχύλισμα 24ωρης Εκχύλισης Στερεού-Υγρού μετά από Φυγοκέντρηση.....	35
Εικόνα 21 Συσσκευή Λυοφιλοποίησης.....	36
Εικόνα 22 Τοποθετημένα δείγματα της Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Υπερήχους έπειτα από την φυγοκέντρηση σε τρυβλία petri.	36
Εικόνα 23 Εκχύλισμα μετά από προετοιμασία στους -23°C	36
Εικόνα 24 Πρώτο στάδιο της διαδικασίας Λυοφιλοποίησης. Τα δείγματα πριν μπουν στην συσκευή λυοφιλοποίησης κατανύχθηκαν και καλύφθηκαν με μεμβράνη στην οποία δημιουργήθηκαν μικρές τρύπες για να επιτευχθεί η Εξάχνωση.	37
Εικόνα 25 Δεύτερο στάδιο της διαδικασίας λυοφιλοποίησης. Σε κάθε ταψάκι βρίσκονται και τα δείγματα από κάθε εκχύλιση.	37
Εικόνα 26 Θερμοκρασίες στους θαλάμους της συσκευής Λυοφιλοποίησης σε μια χρονική στιγμή του πειράματος	38
Εικόνα 27 Παρασκευή δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu	39
Εικόνα 28 Παρασκευή δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Προσθήκη αντιδραστήριου Folin	40
Εικόνα 29 Φασματοφωτόμετρο LLG-uniSPEC 2	40

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Γραφική παράσταση (ραβδόγραμμα) των Μέσων Όρων pH προ εκχύλισης και των τεσσάρων Μεθόδων Εκχύλισης.....	42
Σχήμα 2. Πρότυπη Καμπύλη για την μέθοδο Folin-Ciocalteu	44
Σχήμα 3. Γράφημα των Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων Γαλλικού Οξέος ανά Μέθοδο Εκχύλισης	45
Σχήμα 4. Σύγκριση Ποσοστών Εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH των τεσσάρων εκχυλίσεων για πυκνά διαλύματα	48

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Σύγκριση Χρόνων, Θερμοκρασιών, και Σκόνης που ανακτήθηκε από κάθε Μέθοδο Εκχύλισης	43
Πίνακας 2. Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε σχέση με τις συνθήκες εκχύλισης, την σκόνη εκχυλίσματος που ανακτήθηκε και την απορρόφηση	47
Πίνακας 3 Σύγκριση Μεθόδων Εκχύλισης ως προς τον Χρόνο, τη Θερμοκρασία, το Στερεό-Λυοφιλωμένο Εκχύλισμα, τη Συγκέντρωση Γαλλικού Οξέος και την % Αναστολή της ρίζας DPPH για τα πυκνά διαλύματα	50
Πίνακας 4. Παρασκευή Μητρικών Διαλυμάτων.....	52
Πίνακας 5. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων	52
Πίνακας 6. Τιμές pH προ εκχύλισης και ανά Μέθοδο Εκχύλισης.....	52
Πίνακας 7: Αποτελέσματα Λυοφιλοποίησης	53
Πίνακας 8. Απορρόφηση στα 740nm για το Τυφλό, για το Προ Εκχύλισης και για τις τέσσερις Μεθόδους Εκχύλισης για τις τρεις μετρήσεις και ο Μέσος Όρος τους.....	53
Πίνακας 9. Συγκέντρωση Γαλλικού Οξέος για κάθε μέθοδο εκχύλισης.....	54
Πίνακας 10. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης 1.....	54
Πίνακας 11. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης 2.....	55
Πίνακας 12. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης 3.....	56
Πίνακας 13. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης 4.....	57
Πίνακας 14. % Αναστολή της ρίζας DPPH για κάθε αραίωση των εκχυλισμάτων	57

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία, που σημαίνει και την ολοκλήρωση των σπουδών μου στο Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αισθάνομαι ευγνωμοσύνη για την τύχη που είχα να διδαχθώ από εξαιρετικό επιστημονικό και διδακτικό προσωπικό, με διακρίσεις σε Ελλάδα και Εξωτερικό, αλλά ταυτόχρονα και βαθύτατα ανθρώπινο και υποστηρικτικό.

Ξεχωριστές ευχαριστίες απευθύνω στον επιβλέποντα καθηγητή μου και Πρόεδρο του Τμήματος Αθανάσιο Μανούρα, που με εμπιστεύθηκε, με καθοδήγησε και πάνω από όλα με ενέπνευσε από τον πρώτο κιόλας εξάμηνο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μητέρα μου για την συνεχή της στήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Κατάλογος Εικόνων.....	3
Κατάλογος Σχημάτων	4
Κατάλογος Πινάκων	5
Ευχαριστίες.....	6
1. Θεωρητικό Μέρος	10
1.1 Καφές - Ιστορική Αναδρομή και Χρήση του Καφέ ανά τα χρόνια.....	10
1.2 Καφές – Διατροφική Αξία.....	12
1.3 Πράσινη Χημεία, Κυκλική Οικονομία, Αξιοποίηση των Υπολειμμάτων Καφέ	17
1.4 Εκχύλιση	18
1.5 Μέθοδοι Εκχύλισης.....	19
2. Ερευνητικό Μέρος.....	23
2.1 Δείγμα εσπρέσο: Χαρακτηριστικά και διαδικασία συλλογής	23
2.2 Μέθοδοι Ανάκτησης Βιοδραστικών Ενώσεων	23
2.2.1 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction (UAE)	25
2.2.2 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), 20 min Βρασμός και	
Ανάδευση	27
2.2.3 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), Τροποποιημένη Soxhlet	29
2.2.4 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), Βρασμός και Ανάδευση	
για 24ώρες.....	31
2.5 Μέθοδοι Αξιολόγησης Εκχυλισμάτων	38
2.5.1 Μέτρηση pH	38
2.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	38
2.5.3 Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με την χρήση της Δραστικής Ρίζας 2,2-	
διφαινυλο-2-πικρυλιδραζύλη (DPPH)	40
3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	42
4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	52
Βιβλιογραφία.....	58

Περίληψη Ελληνικά

Ο καφές αποτελεί το πιο δημοφιλές ρόφημα στον κόσμο και το δεύτερο διαπραγματευόμενο εμπόρευμα παγκοσμίως. Η παρασκευή του ροφήματος καφέ αφήνει πίσω της μια μεγάλη μάζα υπολειμμάτων, γνωστά ως υπολείμματα καφέ ή δαπανημένοι κόκκοι καφέ (Spent Coffee Grounds – SCG). Τα υπολείμματα αυτά είναι πλούσια σε βιοδραστικές ουσίες, καθώς μόνο το 30% των βιοδραστικών ουσιών του καφέ εκχυλίζονται με την παραγωγή του ροφήματος. Τα πλούσια αυτά υπολείμματα απορρίπτονται και καταλήγουν στο περιβάλλον οδηγώντας έτσι σε μόλυνση του περιβάλλοντος, λόγω του υψηλού βιοδραστικού τους φορτίου. Επομένως είναι ανάγκη να βρεθούν τρόποι επεξεργασίας των υπολειμμάτων που θα μειώνουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμα αυτών. Η διαδικασία της εκχύλισης αποτελεί έναν τρόπο ώστε αυτό να συμβεί.

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν να μελετήσει και να συγκρίνει τέσσερις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης χρησιμοποιώντας έναν πράσινο διαλύτη, το νερό. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές εκχυλίσσεις για την αρχή της εκχύλισης Στερεού-Υγρού (Τροποποιημένη Soxhlet, 20λεπτη και 24ωρη) καθώς και η εκχύλιση μέσω Υπερήχων. Τα εκχυλίσματα της κάθε μεθόδου αξιολογήθηκαν ως προς την Οξύτητα, την μάζα Στερεού-Λυοφιλιωμένου Εκχυλίσματος, το Συνολικό Φαινολικό Φορτίο και την Αντιοξειδωτική Ικανότητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες έδινε το περισσότερο όξινο εκχύλισμα, η εκχύλιση Υποβοηθούμενη με Υπερήχους είχε την μεγαλύτερη απόδοση για την ποσότητα Στερεού-Λυοφιλιωμένου Εκχυλίσματος και την πιο ισχυρή Αντιοξειδωτική Ικανότητα. Τέλος, η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 20λεπτά είχε την μεγαλύτερη συνολική ποσότητα των φαινολικών συστατικών.

Συμπερασματικά, τα υπολείμματα του καφέ εσπρέσο όπως φάνηκε και από την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, αποτελούν μια πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων που μπορεί να εκχυλιστεί και να αξιοποιηθεί, αλλά παραμένει ακόμη αναξιοποίητη. Είναι ανάγκη τα υπολείμματα του καφέ μέσω της κυκλικής οικονομίας να αξιοποιηθούν, ώστε να μειωθεί το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα αλλά και να χρησιμοποιηθούν από την βιομηχανία των τροφίμων, με στόχο τον εμπλουτισμό και την παραγωγή νέων προϊόντων.

Περίληψη Αγγλικά

Coffee is the world's most popular beverage and the world's second most traded commodity. The production of the coffee beverage leaves behind a large mass of residues, known as Spent Coffee Grounds (SCG). These residues are rich in bioactive substances, as only 30% of the bioactive substances in coffee are extracted in the production of the beverage. These rich residues are discarded and end up in the environment, leading to environmental pollution due to their high bioactive load. There is therefore a need to find ways of processing the residues that will reduce their environmental footprint. The extraction process is one way of making this happen.

The aim of the thesis was to study and compare four different extraction methods using a green solvent, water. Three different extractions were used for the Solid-Liquid extraction principle (Modified Soxhlet, 20-minute and 24-hour) and Ultrasonic extraction. The extracts of each method were evaluated for Acidity, Solid-Liquid Extract Mass, Total Phenolic Load and Antioxidant Capacity.

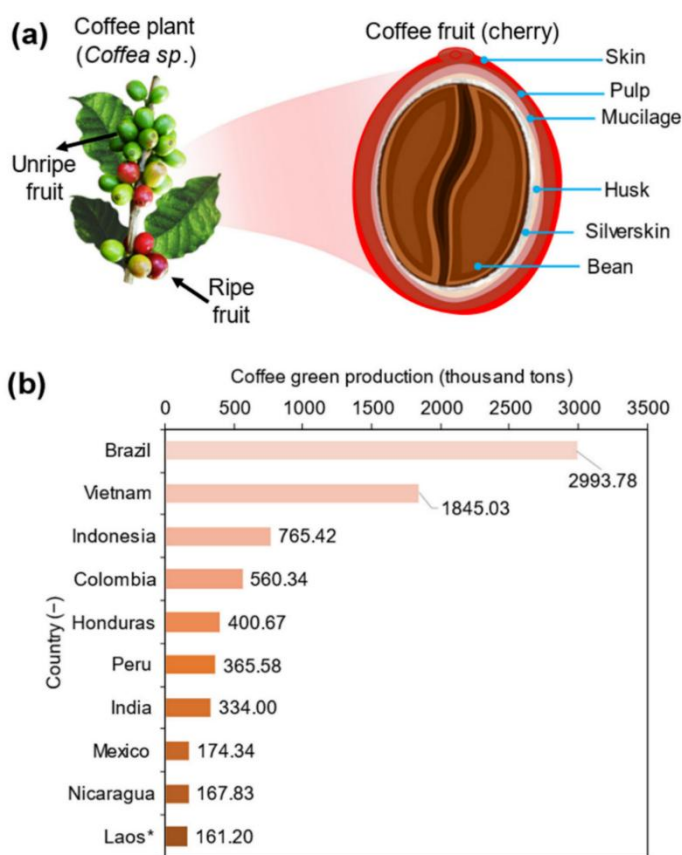
The results showed that the Solid-Liquid extraction of 24 hours gave the most acidic extract, the Ultrasound-assisted extraction had the highest yield for the amount of Solid-Liquid extract and the strongest Antioxidant Capacity. Finally, the Solid-Liquid extraction for 20 minutes had the highest total amount of phenolic components.

In conclusion, espresso coffee residues, as shown in this thesis, are a rich source of bioactive compounds that can be extracted and utilized but remain unutilized. There is a need to utilize coffee residues through the circular economy in order to reduce their environmental footprint, but also to use them by the food industry, with the aim of enriching and producing new products.

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Καφές - Ιστορική Αναδρομή και Χρήση του Καφέ ανά τα χρόνια

Το καφεόδενδρο είναι πολυετές φυτό της οικογένειας των *Rubiaceae*. Ο καρπός του αποτελείται από ένα έντονο κόκκινο εξωτερικό φλοιό το επικάρπιο το οποίο καλύπτει τον πολτό και την εξαιρετικά πηκτική βλέννα και το μεσοκάρπιο. Ένα λεπτό στρώμα φλοιού το ενδοκάρπιο και το στρώμα του κόκκου καλύπτουν τον κόκκο του καφέ, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 1. Τα δεδομένα παραγωγής καφέ παγκοσμίως δίνονται από τον FAO (Food and Agriculture Organization) στον πίνακα της Εικόνας 1 για το 2021 (Hernández-Varela & Medina, 2023).



Εικόνα 1. (a) Διαγραμματική δομή του φυτού του καφέ και του καρπού του, με την αντιπροσωπευτική τους σύνθεση. (b) Γραφική παράσταση παραγωγής πράσινου καφέ ανά χώρα, εκφρασμένη σε χιλιάδες τόνους. (Hernández-Varela & Medina, 2023)

Ο καφές πρωτοεμφανίστηκε το έτος 575 μ.Χ., όπου και γίνονται αναφορές για την άφιξη αυτού από την Αιθιοπία στην χερσόνησο της Αραβίας. Οι καρποί του καφέ είναι πιθανό εκείνη την εποχή να ξηραίνονταν και να καταναλώνονταν από τους ανθρώπους μέσω της μάσησης ως ένα τονωτικό έναντι της κούρασης. Αργότερα, οι καρποί του καφέ αλέθονταν και αναμειγνύονταν με λιπαρή πάστα ώστε να χρησιμοποιηθούν ως διεγερτικό σνακ για τους ταξιδιώτες. Γύρω στο

1.000 μ.Χ. εμφανίζεται η χρήση ενός αφεψήματος, στο οποίο χρησιμοποιούσαν εγχύσεις με βραστό νερό. Παρόλο που οι Άραβες καλλιεργούσαν φυτά του καφέ και έφτιαχναν ποτά από τους κόκκους του καφέ, η διαδικασία του ψησίματος ανακαλύφθηκε μόλις τον 14^ο αιώνα και όταν αυτό συνέβη η διάδοση του καφέ στον Αραβικό κόσμο έγινε ραγδαία. Παρατηρείται πως ο καφές μόλις στο μισό του 15^{ου} αιώνα ξεκίνησε να καταναλώνεται ως ρόφημα, έχοντας στα Αραβικά την ονομασία *kahwah*. Επρόκειτο, για ένα έγχυμα αλεσμένων και καβουρδισμένων κόκκων καφέ, οι οποίοι είχαν καλλιεργηθεί στην Υεμένη κοντά στο λιμάνι της Μόκα. Όμως, κατά την διάρκεια της Οθωμανικής αυτοκρατορίας, ο καφές τέθηκε σε γενική χρήση. Στον Μουσουλμανικό κόσμο ο καφές κάλυψε την ανάγκη για ένα κοινωνικό ποτό και η κατανάλωση του ποτού αυτού γινόταν τόσο στο σπίτι όσο και σε καφέ μπαρ. Τα σπίτια του καφέ, καφέ μπαρ, σύντομα εξελίχθηκαν σε ανεξάρτητα κέντρα πνεύματος που οι αρχές τα έβλεπαν ως απειλή και μερικές φορές τα ανάγκαζαν να κλείσουν. Στην Κωνσταντινούπολη τα καφέ μπαρ, ξεκίνησαν ήδη από τα μέσα του 16^{ου} αιώνα και σύντομα έγιναν πολύ δημοφιλή. Εκεί, ονομάζονταν *qawweh khaneh* και εξελίχθηκαν σε κέντρα πνευματικής και πολιτιστικής δραστηριότητας, και γι' αυτόν τον λόγο βλέπουμε να ονομάζονται και ως *maktab-i-irfan*, το σχολείο των σοφών. (Fredholm, 2011; Humans, 1991)

Η ιστορία του καφέ φαίνεται να ξεκινά όταν ένας νεαρός βοσκός από την Αιθιοπία συνειδητοποίησε πως οι κατσίκες του έπειτα από κατανάλωση του κόκκινου καρπού ενός συγκεκριμένου θάμνου γίνονταν φρενήρεις. Ο νεαρός βοσκός κινούμενος από περιέργεια δοκίμασε τους κόκκινους καρπούς και διαπίστωσε πως ένοιωσε γεμάτος ενέργεια, κάνοντάς τον πρώτο που ανακάλυψε τις επιδράσεις της καφεΐνης. Την ανακάλυψή του μοιράστηκε με έναν ντόπιο *Sufi* μοναχό που επίσης ένωσε αναζωογονημένος και ήταν ικανός να μείνει πολύ πιο εύκολα ξύπνιος κατά την διάρκεια των θρησκευτικών του καθηκόντων εκείνο το βράδυ. Έτσι, οι κόκκοι καφέ στις αρχές του 15^{ου} αιώνα διαδόθηκαν κατά μήκος εμπορικών και προσκυνηματικών διαδρομών στην Υεμένη και γενικότερα στην Αραβική Χερσόνησο, όπου καλλιεργήθηκαν και τα πρώτα φυτά για τοπική κατανάλωση. Γι' αυτόν τον λόγο, τα είδη ονομάστηκαν *arabica* ενώ, έχουν Αφρικανικές ρίζες. (Muñoz-Pajares κ.ά., 2023)

Μέχρι τα τέλη του 16^{ου} αιώνα ο καφές πλέον είχε περάσει τη Μεσόγειο θάλασσα και η διάδοσή του στις Βρετανικές αποικίες της Βόρειας Αμερικής καθώς και σε όλη την Ευρώπη έγινε μέσα σε λιγότερο από έναν αιώνα. Κατά την διάρκεια του 17^{ου} αιώνα βλέπουμε πως η καλλιέργεια του καφέ διαδόθηκε και στις ακτές του Μάλαμπαρ στην Ινδία και την Κεϋλάνη. Στις αρχές του 18^{ου} αιώνα ο καφές καλλιεργείται σε θερμοκήπια της Ευρώπης σποριόφυτων του γένους *Coffea arabica* L., τα οποία και εισήχθησαν στις Ισπανικές, Γαλλικές και Πορτογαλικές αποικίες της

Ασίας και της Αμερικής, αλλά και στις Ολλανδικές Δυτικές Ινδίες. Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα γίνεται η εμφάνιση της σκουριάς του καφέ, *Hemileia vastatrix*, με αποτέλεσμα οι καλλιέργειες του καφέ στα χαμηλά κλίματα της Ασίας να καταστραφούν. (Gichuru κ.ά., 2021; Humans, 1991; Muñoz-Pajares κ.ά., 2023)

Σήμερα, ο καφές για εκατομμύρια ανθρώπους αποτελεί το κύριο ρόφημά τους. Αποτελείται από 100 είδη με δύο από αυτά, το *C. arabica* L. (*Arabica*) και το *C. canephora* Pierre ex A. Froehner (*Robusta*), να αξιοποιούνται για την παραγωγή του καφέ ως ποτό. Το είδος *Arabica* θεωρείται υψηλότερης ποιότητας, παράγοντας καφέ με λιγότερη πικράδα και χαμηλότερη καφεΐνη. Ενώ, το είδος *Robusta* είναι ανθεκτικότερο σε αντίξοες καιρικές συνθήκες, έχει μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία αλλά δίνει χαμηλότερης ποιότητας καφέ. (Muñoz-Pajares κ.ά., 2023)

Επιπλέον, ο καφές σήμερα αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο διαπραγματευόμενο εμπόρευμα παγκοσμίως, μετά το πετρέλαιο δημιουργώντας για περισσότερους από 125 εκατομμύρια ανθρώπους πηγή εισοδήματος. Πολλές χώρες καλλιεργούν το φυτό του καφέ με τον αριθμό τους να φτάνει και τις 70, μερικές εκ των οποίων είναι η Κολομβία, η Βραζιλία και η Αιθιοπία. Πρόκειται για μία τροπική καλλιέργεια που ευδοκimei κυρίως στην Ασία, την Αφρική, την Νότια Αμερική και σε μερικά μέρη της Ωκεανίας κυρίως από μικροκαλλιεργητές. Στην Αφρική ο καφές παράγεται στις περιοχές της Ανατολικής, της Κεντρικής και της Δυτικής Αφρικής με την Αιθιοπία να κατέχει την μεγαλύτερη παραγωγή. Η Αιθιοπία επίσης είναι η γενέτειρα του καφέ *Arabica* που αποτελεί το κύριο είδος παραγόμενου καφέ στον κόσμο. (Butt & Sultan, 2011a; Gichuru κ.ά., 2021)

1.2 Καφές – Διατροφική Αξία

Τρόπος Παρασκευής του Καφέ

Στην βιομηχανία του καφέ υπάρχουν δύο κυρίαρχα είδη καφέ. Αυτά είναι ο καφές Αράμπικα (*Arabica*) και ο καφές Ρομπόυστα (*Robusta*). Το κάθε είδος του καφέ έχει συγκεκριμένες γνωστές-κυρίαρχες περιοχές παραγωγής, καθώς και διάφορα είδη ανάλογα με την περιοχή όπου αναπτύσσεται από την οποία συχνά παίρνει το όνομά του, όπως για τα είδη Αράμπικα είναι η Brazil A., Costa Rica, Ethiopia κ.α. (Barrea κ.ά., 2023)

Η παρασκευή των κόκκων του καφέ όπως τους ξέρουμε, σκούρου καφέ-μαύρου χρώματος, ξεκινά με την αφαίρεση του κόκκινου ώριμου εξωτερικού πολτού των καρπών με αποτέλεσμα την εμφάνιση των πράσινων κόκκων του καφέ, ο οποίοι θα καβουρδιστούν μέχρι να αποκτήσουν χρώμα μαύρο ή σκούρο καφέ. Έπειτα οι κόκκοι θα αλεστούν ώστε να

δημιουργήσουν μια σκόνη. Η σκόνη αυτή είναι ο καφές που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του ροφήματος του καφέ. Η διαδικασία του καβουρδίσματος μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το εύρος της θερμοκρασία, που συνήθως κυμαίνεται από τους 180⁰C έως τους 250⁰C, αλλά και στον χρόνο που μπορεί να διαρκέσει ανάμεσα σε δύο λεπτά για θερμοκρασίες υψηλής κλίμακας μέχρι και 25 λεπτά για χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αυτό εξαρτάται από τον επιθυμητό βαθμό καβουρδίσματος. Η διαδικασία του καβουρδίσματος προσδίδει σοβαρές αλλαγές στην χημική σύνθεση των φυσικών ουσιών των πράσινων κόκκων του καφέ δίνοντας ενώσεις που προέρχονται από την πυρόλυση των οργανικών ενώσεων και την καραμελοποίηση των υδατανθράκων. (Ludwig κ.ά., 2014)

Η παρασκευή του ροφήματος του καφέ μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων μεθόδων, με τις πιο διάσημες μορφές παρασκευής να είναι η υπό πίεση παρασκευή, δηλαδή ο εσπρέσο, αλλά και ο βρασμός. Οι διαφορετικές μορφές παρασκευής του καφέ προσδίδουν και στο ρόφημα διαφορετικά γνωρίσματα, δηλαδή διαφορετική γεύση και αρώματα, λόγω των βιοδραστικών ενώσεων. Πρωταρχική μέθοδος παρασκευής του καφέ ήταν αυτή του βρασμού, όπως πραγματοποιείται στον τούρκικο ή ελληνικό καφέ. Αυτή η μέθοδος παρασκευής συμπεριλάμβανε την προετοιμασία των κόκκων του καφέ μέσω άλεσης ή σφυροκοπήματος έως ότου σχηματιστεί μία απαλή σκόνη, στην οποία πρόσθεταν νερό μέσα σε ένα δοχείο και το έφερναν σε βρασμό για όχι περισσότερο από μια στιγμή. Μέσω αυτής της τεχνικής παράγεται ένας δυνατός καφές με μία στρώση αφρού στην επιφάνεια (καϊμάκι) και ένα ίζημα (κατακάθι) το οποίο κατακάθεται στον πάτο του ποτηριού. Μία άλλη μέθοδος βρασμού αποτελεί η μέθοδος κατά την οποία βρασμένο νερό πέφτει πάνω σε ένα διατρυπημένο δοχείο στο οποίο έχει τοποθετηθεί ένα φίλτρο που περιέχει καφέ και οι σταγόνες που πέφτουν τελικά μαζεύονται σε ένα δοχείο που είναι από κάτω. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά σε αυτοματοποιημένες μηχανές. (Caprioli κ.ά., 2015)

Όσον αφορά τον καφέ εσπρέσο, αυτός επηρεάζεται από την σύσταση του νερό, τον καφέ και τις τεχνικές συνθήκες της μηχανής. Στην μέθοδο παρασκευής του εσπρέσο χρησιμοποιούνται καβουρδισμένοι και αλεσμένοι κόκκοι καφέ και η πίεση που δημιουργεί η μηχανή προκαλεί την διήθηση μιας ορισμένης ποσότητας καυτού νερού διαμέσου του καφέ σε μικρό χρονικό διάστημα, δίνοντας ένα μικρό φλιτζάνι με συμπυκνωμένο αφρώδες ρόφημα. Εκτός από τους παραδοσιακούς τρόπους παρασκευής, υπάρχουν και άλλοι λιγότερο γνωστοί κατά τους οποίους μπορεί να προστεθεί περισσότερη ποσότητα καφέ ή να πραγματοποιηθεί λιγότερη διήθηση. (Barrea κ.ά., 2023)

Μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής του ροφήματος καφέ, μόνο το 30% της μάζας των βιοδραστικών ενώσεων εκχυλίστηκε, ενώ το υπόλοιπο 70% απομένει στην νωπή σκόνη που πετιέται και είναι γνωστή στη βιβλιογραφία ως Δαπανημένοι Κόκκοι Καφέ – *Spent Coffee Grounds (SCG)* (Bouhzam κ.ά., 2023; Hernández-Varela & Medina, 2023)

Βιοδραστικές Ενώσεις

Ο καφές περιέχει μια περίπλοκη χημική σύσταση, η οποία μπορεί να ξεπεράσει τις χίλιες βιολογικά δραστικές ενώσεις. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι φαινολικές ενώσεις, τα διτερπένια, η καφεΐνη, η τριγωνελίνη, οι φυτικές ίνες και άλλοι δευτερεύοντες μεταβολίτες. Στις φαινολικές ενώσεις έχουμε χαρακτηριστικά το χλωρογενικό οξύ και στα διτερπένια την *cafestol* και την *kahweol*. (Barrea κ.ά., 2023)

Τα υπολείμματα καφέ εσπρέσο παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά σε υδατοδιαλυτές βιοδραστικές ουσίες, όπως η καφεΐνη και το χλωρογενικό οξύ. Οι αλεσμένοι κόκκοι του καφέ που έχουν εκχυλιστεί οφείλουν τα σημαντικά ποσοστά των βιοδραστικών ουσιών στην μειωμένη απόδοση της εκχύλισης κατά τη διάρκεια της παρασκευής του καφέ εσπρέσο. (Cruz κ.ά., 2012)

Η συγκέντρωση των βιοδραστικών ενώσεων διαφέρει στον καφέ και κατ' επέκταση στα υπολείμματα του καφέ, λόγω διαφόρων παραγόντων όπως είναι η ποικιλία του καφέ, το καβούρδισμα που θα υποστεί καθώς και η μέθοδος παρασκευής του καφέ. Συγκεκριμένα, τα δύο πιο γνωστά είδη καφέ, ο Αράμπικα και ο Ρομπούστα, διαφέρουν σημαντικά στην σύστασή τους και μάλιστα στα επίπεδα της καφεΐνης τα οποία είναι συνήθως πιο υψηλά στον καφέ Ρομπούστα. Η διαδικασία καβουρδίσματος παίζει σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη των αρωμάτων, της γεύσης και του χρώματος στο ρόφημα του καφέ. Ταυτόχρονα όμως επηρεάζει την βιολογική δραστηριότητα και την χημική σύνθεση του καφέ με αποτέλεσμα την μείωση κάποιων ενώσεων, όπως του χλωρογενετικού οξέος, αλλά και τον σχηματισμό άλλων, όπως είναι προϊόντα της αντίδρασης *Maillard* π.χ. οι μελανοΐδες. (Barrea κ.ά., 2023)

Μεταβολισμός Καφεΐνης και Οφέλη στην Υγεία

Ο καφές μεταβολίζεται σχεδόν πλήρως από το ήπαρ μέσω των ενζύμων του κυττοχρώματος (CYP) P-450 ιδίως από τις ισομορφές του CYP1A2. Τα ένζυμα αυτά μεταβάλλουν την καφεΐνη σε τρεις κυρίως ενεργούς βιολογικά μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί με αύξουσα σειρά ποσοστών είναι η θεοφυλλίνη, η θεοβρωμίνη και η παραξανθίνη. (Barrea κ.ά., 2023)

Στο ήπαρ οι τρεις αυτοί μεταβολίτες μετατρέπονται μέσω της οξειδωσης και της απομεθυλίωσης σε διμεθυλοξανθάνες, διμέθυλα και μονομεθύλια ουρικών οξέων, παράγωγα

ουρακίλης, τριμεθύλια και διμεθυλαλλαντοΐνη, τα οποία στα νεφρά φιλτράρονται και αποβάλλονται μέσω των ούρων. Στα ούρα περιέχεται καφεΐνη που δεν έχει αλλάξει μορφή μόνο σε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 3% ή και λιγότερο. Επίσης, λόγω της λιπιδοφιλικής του φύσης ο καφές μπορεί και διανέμεται στο σώμα, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, σε ποσότητες των 0,7l/kg. Ο καφές μπορεί ακόμη να περάσει γρήγορα από την μητέρα στο μωρό μέσω του μητρικού γάλακτος, αλλά και μέσω του πλακούντα στις έγκυες γυναίκες εισερχόμενος τελικά στην κυκλοφορία του εμβρύου. (Barrea κ.ά., 2023)

Μία από τις πιο μελετημένες και γνωστές ενώσεις που περιέχονται στον καφέ και τα υπολείμματα αυτού είναι η καφεΐνη. Η καφεΐνη είναι μία ένωση αλκαλοειδούς ξανθίνης (Barrea κ.ά., 2023), η οποία σχηματίζεται ως προϊόν αποικοδόμησης της πουρίνης. Η απορρόφησή της γίνεται πλήρως στο στόμαχο και στο λεπτό έντερο. Μέσω της απορρόφησής της διανέμεται σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα και μεταβολίζεται τέλος από το ήπαρ. (Gökce & Şanlıer, 2019) Στα 45 λεπτά μετά την κατανάλωση της η καφεΐνη απορροφάται πλήρως από τον γαστρεντερικό σωλήνα και διανέμεται ταχύτατα σε όλους τους ιστούς. Τα μέγιστα ποσοστά της καφεΐνης στο πλάσμα μπορούν να παρατηρηθούν στο διάστημα των 15λεπτών με δύο ώρες. (Barrea κ.ά., 2023)

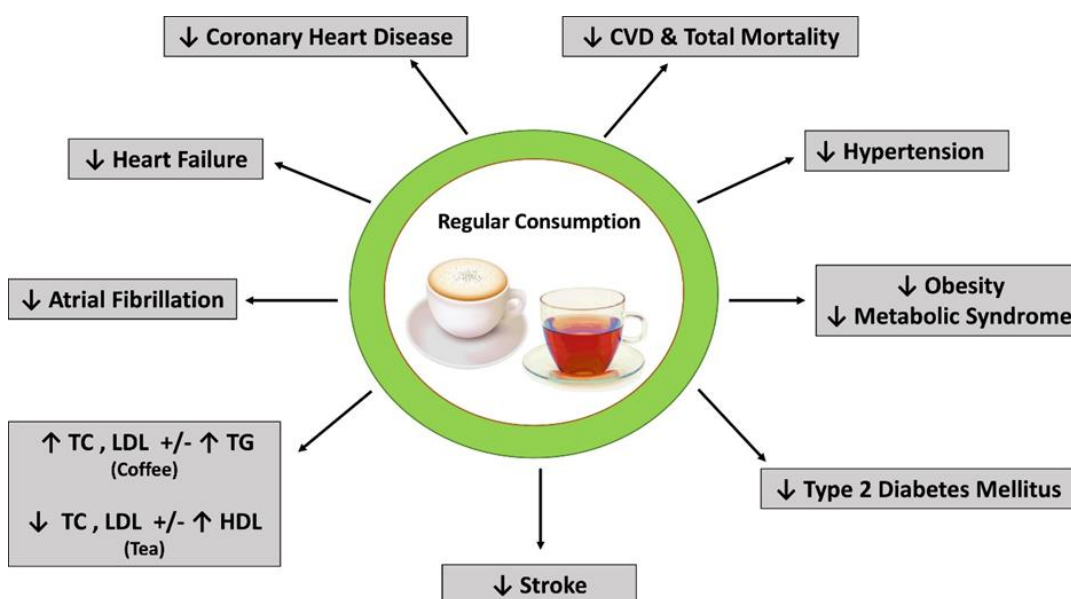
Ο χρόνος ημιζωής της καφεΐνης, δηλαδή για πόσο χρονικό διάστημα θα παραμείνει η καφεΐνη στον οργανισμό μας, σε έναν υγιή ενήλικα είναι περίπου 2,5 με 4,5 ώρες, ωστόσο αυτό μπορεί να διαφέρει εξαιτίας διαφόρων παραγόντων όπως είναι η ηλικία, η λειτουργία του ήπατος, η εγκυμοσύνη, το κάπνισμα, η φαρμακευτική αγωγή και τα επίπεδα των ενζύμων του ήπατος που χρειάζονται για να μεταβολίσουν την καφεΐνη. Για παράδειγμα στους καπνιστές ο μεταβολισμός της καφεΐνης επιταχύνεται με αποτέλεσμα ο χρόνος ημιζωής να μειώνεται περίπου στο 50%, ενώ στις εγκύους ο μεταβολισμός της καφεΐνης μειώνεται και άρα ο χρόνος ημιζωής αυτής παρατείνεται. (Barrea κ.ά., 2023) Η επίδραση της κατανάλωσης καφέ και τσαγιού περιγράφεται και στο διάγραμμα της εικόνας 2.

Οφέλη της Κατανάλωσης του Καφέ στην υγεία

Ο καφές αποτελεί το πρώτο παγκοσμίως ποτό σε κατανάλωση στον κόσμο και αυτό οφείλεται στην ευχάριστη πικρή του γεύση και στη διεγερτική του δράση. Παρόλο που ιστορικά είχε συσχετισθεί με αρνητικά αποτελέσματα για την υγεία, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι είναι πιθανό να έχει οφέλη για την υγεία. (Gökce & Şanlıer, 2019) Αξιόπιστα δεδομένα μάλιστα, έχουν δείξει πως ο καφές μπορεί να προωθήσει την καλή κατάσταση της υγείας. Αυτό συχνά

βλέπουμε να οφείλεται στην σύστασή του η οποία είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (Butt & Sultan, 2011).

Λόγω των πιθανών θετικών επιδράσεων στην υγεία ο καφές πλέον αποτελεί το επίκεντρο των ερευνών. Φαίνεται μάλιστα, πως η υψηλή κατανάλωση του καφέ να έχει συσχετιστεί με μειωμένη θνησιμότητα τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Ακόμη φαίνεται πως η κατανάλωση του καφέ έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων και νευρολογικών παθήσεων, όπου μπορεί να βελτιώσει ορισμένες νευρολογικές συνθήκες και να παρέχει μια προστατευτική δράση από μη θανατηφόρες νευρολογικές παθήσεις. Επιπλέον, η κατανάλωση του καφέ έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο μεταβολικών νοσημάτων και καρκίνου. Οι θετικές αυτές επιδράσεις του καφέ οφείλονται στην παρουσία αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχονται στον καφέ. Επομένως, ο καφές και τα εκχυλίσματα αυτού θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε συνδυασμό με τρέχουσες θεραπείες για την ενίσχυση της συνολικής επιβίωσης και βελτίωσης συμπτωμάτων σε ασθενείς. (Gökçen & Şanlıer, 2019; Grosso κ.ά., 2017; Park κ.ά., 2023; Pauwels & Volterrani, 2021; Safe κ.ά., 2023)



Εικόνα 2. Επίδραση της συνήθους (ήπιας έως μέτριας) κατανάλωσης καφέ και τσαγιού (Chieng & Kistler, 2022)

1.3 Πράσινη Χημεία, Κυκλική Οικονομία, Αξιοποίηση των Υπολειμμάτων Καφέ

Η πράσινη χημεία αποτελεί κομμάτι της βιώσιμης χημείας και έχει στόχο την επίτευξη χημικών διαδικασιών πιο φιλικών προς το περιβάλλον. Εξετάζει ζητήματα αποδοτικότητας, επαναχρησιμοποίησης πόρων και χρήση αβλαβών αντιδραστηρίων. Κυρίως επικεντρώνεται στα προϊόντα και σε αυτό το πλαίσιο ασχολείται με ζητήματα της τοξικότητας των χημικών αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των προϊόντων, την ασφάλεια της διαδικασίας παραγωγής και του χώρου εργασίας. (Fröhling & Hiete, 2020)

Ο καφές είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ποτά με την παγκόσμια αγορά του να αυξάνει μέρα με την μέρα σε κατανάλωση και πληθυσμό. Μάλιστα καθώς η παγκόσμια παραγωγή πρασίνου καφέ αυξάνεται για πάνω από 15% ανά χρόνο, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως μεθοδολογικές διαδικασίες για την αξιοποίηση του βρώσιμου μέρους του φυτού αλλά και των αποβλήτων από βιοπροϊόντα ή των υπολειμμάτων του πρέπει να εφαρμοστούν. (Hernández-Varela & Medina, 2023) Ο καρπός του καφέ υφίσταται μια διαδικασία παρασκευής, αυτή για την παρασκευή του ροφήματος καφέ, η οποία αν και δίνει μια διατροφικά σημαντική σύνθεση, αφήνει πίσω της μια μεγάλη ποσότητα υπολειμμάτων με το πέρας της. Τα υπολείμματα της διαδικασίας είναι ευρέως γνωστά ως *Spent Coffee Grounds* (Δαπανημένοι Κόκκοι Καφέ) (Hernández-Varela & Medina, 2023) Τα περισσότερα από αυτά τα υπολείμματα απορρίπτονται στα σκουπίδια και με αυτόν τον τρόπο καταλήγουν στις χωματερές. Ακόμη μπορεί η απόρριψή τους να γίνει μέσω του συστήματος ύδρευσης και τελικά τα υπολείμματα να καταλήξουν σε υδάτινα σώματα μέσω των λυμάτων. (Fernandes κ.ά., 2017) Λόγω της υψηλής οργανικής περιεκτικότητάς τους τα υπολείμματα αποτελούν απειλή για το περιβάλλον μέσω περιβαλλοντικής μόλυνσης. Επομένως, είναι απαραίτητο τα υπολείμματα να επεξεργάζονται ώστε να μειωθεί το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα (Afriliana κ.ά., 2020).

Μέχρι στιγμής τα υπολείμματα του καφέ χρησιμοποιούνται στην αγροτική βιομηχανία ως κομπόστ για την καλλιέργεια. Η κομποστοποίηση αποτελεί μία αποτελεσματική αλλά και απλή μέθοδο για την μετατροπή απορριμμάτων σε μια μη τοξική, σταθερή και καλή διατροφή για το έδαφος και τα φυτά. (Afriliana κ.ά., 2020) Επίσης, τα υπολείμματα χρησιμοποιούνται για την δημιουργία κοστομοποιήσιμων και βιοαποικοδομήσιμων συσκευασιών που μειώνουν αποτελεσματικά τις χρήσεις πλαστικών παραγώγων πετρελαίου (Hernández-Varela & Medina, 2023) λόγω της συνεπούς σύστασης τους (Oliveira κ.ά., 2021). Ακόμη χρήση των υπολειμμάτων γίνεται και σε βιομηχανίες όπως αυτή του βιοντίζελ, του βιοαερίου, της

τροποποίησης του εδάφους και των πράσινων σύνθετων υλικών. (Hernández-Varela & Medina, 2023) Τα υπολείμματα του καφέ όντας πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις έχουν αξιοποιηθεί και από τον κλάδο της κοσμετολογίας ως ενεργά συστατικά σε καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης. (de Mello κ.ά., 2023)

Ωστόσο, παρά τις διάφορες εναλλακτικές αξιοποίησης των υπολειμμάτων του καφέ σε διαφόρους τομείς είναι φανερό πως υπάρχει ένα κενό στη βιομηχανία των τροφίμων. Με βάση τις αρχές της κυκλικής οικονομίας, της πράσινης χημείας και της βιωσιμότητας μπορεί το κενό που υπάρχει να καλυφθεί μέσω αξιοποίησης των υπολειμμάτων για εμπλουτισμό των ήδη υπαρχόντων τροφίμων με γεύση, άρωμα ή/και βιοδραστικές ενώσεις, αλλά επίσης και μέσω της δημιουργίας νέων προϊόντων. Επιπλέον, τα υπολείμματα του καφέ θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν και στην αρωματοποιεία μέσω αναγωγής των αρωμάτων του καφέ.

1.4 Εκχύλιση

Η Εκχύλιση ορίζεται ως η μεταφορά των αναλυτών στόχων από μία φάση σε μία άλλη διαφορετική όπου μπορεί να συμβεί περεταίρω ανάλυση και επεξεργασία. Συνήθως τα δείγματα βρίσκονται σε ρευστή μορφή και ο αναλυόμενος στόχος που εξάγεται μπορεί να είναι είτε στερεής είτε υγρής μορφής. Η εκχύλιση όπου η μορφή της αναλυόμενης ουσίας στόχου είναι υγρή ονομάζεται Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (*Liquid-Liquid Extraction*), ενώ όταν η μορφή της ουσίας είναι στερεή τότε η εκχύλιση ονομάζεται Εκχύλιση Στερεής Φάσης (*Solid-phase Extraction*). Η κατανομή και η μεταφορά μάζας γίνεται διαμέσου των ορίων υγρού-υγρού και υγρού-στερεού, συγκεκριμένα η κατανομή εξαρτάται από διάφορες ενδομοριακές δυνάμεις όπως είναι οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις, οι δεσμοί υδρογόνου, η υδροφοβική δομή, η διασπορά και τα δίπολα. Οι επιδράσεις αυτές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την χημεία της εκχύλισης. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2020; Raynie, 2006)

Γενικά, η εκχύλιση μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες όπως είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προς ανάλυση δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της εκχύλισης είναι το μέγεθος των σωματιδίων, ο διαλύτης, η θερμοκρασία, ο τύπος και η συγκέντρωση του υποστρώματος, αλλά και άλλοι παράγοντες όπως είναι τα χαρακτηριστικά, η ποιότητα και η αποθήκευση του εκχυλίσματος και σταθερότητα της εκχύλισης. (Sridhar κ.ά., 2022)

Αναλυτικότερα, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την εκχύλιση αυξάνοντας την απόδοσή της μέσω αύξησης της θερμοκρασίας σε θερμικά σταθερές ενώσεις μειώνοντας παράλληλα και τον χρόνο της εκχύλισης. Αντιθέτως, οι θερμοευαίσθητες ενώσεις σε υψηλές θερμοκρασίες

υφίστανται απώλεια των φαινολικών/φλαβονοειδών ενώσεων ή αποδόμηση. (Sridhar κ.ά., 2022) Η αύξηση της θερμοκρασίας επίσης αυξάνει την διαλυτότητα των αναλυτών, την μεταφορά μάζας και τους ρυθμούς διαλυτότητας ενώ μειώνει το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των διαλυτών. Επιπλέον παρατηρήθηκε βελτιωμένη επαφή και καλύτερη αλληλεπίδραση αναλυτή με αύξηση της θερμοκρασίας. Επομένως, ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ρυθμίζεται αναλόγως του είδους του δείγματος, είτε πρόκειται για είδος ποτού ή τροφής. (Oroian κ.ά., 2020; Sridhar κ.ά., 2022) Το μέγεθος του δείγματος, δηλαδή η επιφάνεια επαφή του δείγματος με τον διαλύτη, παίζει μείζον ρόλο στην διαδικασία της εκχύλισης. Ακόμα και μικρές αλλαγές του μεγέθους των σωματιδίων μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές αλλαγές στην απόδοση της εκχύλισης. (Huang κ.ά., 2018) Ο διαλύτης επίσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην εκχύλιση, μάλιστα έχει θεωρηθεί ως ο πιο κρίσιμος παράγοντας για μια επιτυχή διαδικασία εκχύλισης. Η κατάλληλη επιλογή του διαλύτη και κατ' επέκταση το πόσο αποδοτική θα είναι η εκχύλιση εξαρτάται από τα χημικά χαρακτηριστικά του δείγματος και τον τύπο διαλύτη. (Sridhar κ.ά., 2022)

1.5 Μέθοδοι Εκχύλισης

Σήμερα, είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν μέθοδοι εκχύλισης που να είναι ταυτόχρονα αποδοτικές και επιλεκτικές, ώστε να γίνεται απομόνωση και εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών από φυσικά προϊόντα. Οι βιοδραστικές αυτές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας, αλλά κυρίως παρατηρείται χρήση τους στη φαρμακοβιομηχανία καθώς τα φυσικά προϊόντα αποτελούν κύρια πηγή για την ανάπτυξη φαρμάκων. Στα φυσικά αυτά φάρμακα η ποσότητα των φυσικών βιοδραστικών προϊόντων είναι μικρή και έτσι η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων εκχύλισης είναι αναγκαία. (Zhang κ.ά., 2018)

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως τα υπολείμματα καφέ αποτελούν μια σημαντική πηγή βιοδραστικών ενώσεων με σημαντικές βιολογικές δράσεις κυρίως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές. Στις βιολογικές αυτές ενώσεις συμπεριλαμβάνονται, εκτός της καφεΐνης, και πολυφαινόλες. Είναι γνωστό πως, μόνο το 30% της μάζας των κόκκων του καφέ εκχυλίζονται για την παρασκευή του ροφήματος του καφέ με το 70% που απομένει να καταλήγει ως υπόλειμμα και μαζί με τις βιοδραστικές ουσίες που περιέχει να πετιέται. (Bouhzam κ.ά., 2023) Είναι λοιπόν, αναγκαίο να αναπτυχθούν μέθοδοι εκχύλισης που να είναι αποδοτικές, ώστε να γίνεται αξιοποίηση αυτών των βιοδραστικών συστατικών. (Zhang κ.ά., 2018)

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εκχύλισης της καφεΐνης και των πολυφαινολών από τα υπολείμματα του καφέ, συμπεριλαμβανομένου της Εκχύλισης με Υπερήχους – *Ultrasound Assisted Extraction*, της Εκχύλισης Στερεού-Υγρού, της Εκχύλισης με Μικροκύματα, της Υδροθερμικής Επεξεργασίας, της Εκχύλισης *Soxhlet* και άλλων μεθόδων. Ανάμεσα σε αυτές τις τεχνικές η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη είναι η Εκχύλιση Στερεού-Υγρού, καθώς δεν απαιτεί την χρήση ειδικού εξοπλισμού. Στην βιβλιογραφία προτείνεται η χρήση πολικών διαλυτών, όπως η μεθανόλη, η ακετόνη και η αιθανόλη, για την εκχύλιση των πολυφαινολών. Από την άλλη, η καφεΐνη είναι διαλυτή σε αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, αλλά και νερό. (Bouhzam κ.ά., 2023)

Ο πιο πράσινος διαλύτης θεωρείται το νερό, καθώς είναι χαμηλό σε τοξικότητα, είναι μη εκρηκτικό και μη εύφλεκτο, είναι φθινό και φυσικά άφθονο και μπορεί να διαχωριστεί εύκολα από το μείγμα της αντίδρασης. Όμως, μόνο του το νερό δεν φθάνει πάντα την εκχύλιση στην επιθυμητή απόδοση. Γι' αυτόν τον λόγο μερικοί ερευνητές προτείνουν ότι η προσθήκη νερού στους οργανικούς διαλύτες, όπως αυτούς που αναφέρθηκαν πιο πάνω, διευκολύνει την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων διότι δημιουργεί ένα πιο πολικό περιβάλλον. (Bouhzam κ.ά., 2023)

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εκχύλισης είναι κρίσιμης σημασίας, καθώς σε μερικές περιπτώσεις εξαρτάται από την προβλεπόμενη χρήση του εκχυλίσματος. Παράγοντες οι οποίοι πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την επιλογή της μεθόδου εκχύλισης είναι η σταθερότητα της ουσίας στη θέρμανση, η φύση του διαλύτη, το κόστος, η διάρκεια της εκχύλισης, ο τελικός απαιτούμενος όγκος και η προβλεπόμενη χρήση. (Abubakar & Haque, 2020)

Εκχύλιση Στερεού-Υγρού

Οι διαδικασίες εκχύλισης στερεού-υγρού, οι πρόσφατα εισαχθείσες και οι παραδοσιακές, είναι βασισμένες πάνω σε δύο θεμελιώδεις αρχές, την ώσμωση και τη διάχυση. Παραδοσιακές μέθοδοι θεωρούνται η διήθηση και η διαβροχή, ενώ οι πιο πρόσφατες θεωρούνται η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά. Με βάση τις θεμελιώδεις αυτές αρχές καθίσταται δυνατό να γίνουν μερικές γενικές προβλέψεις που έχουν σχέση με το σύστημα εκχύλισης. Επίσης, είναι δυνατό να προβλεφθούν οι χρόνοι εκχύλισης και οι αποδόσεις σε σχέση με μια γενική στερεά μήτρα. Υπάρχουν τρεις παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για να πετύχουν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης. Η πρώτη είναι να μειωθεί η επιφάνεια επαφής του στερεού. Η δεύτερη είναι η θερμοκρασία, καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος μειώνεται ο χρόνος της εκχύλισης λόγω αύξησης

του διηθητικού φαινομένου. Τέλος, η τρίτη είναι η συγγένεια του υγρού εκχύλισης με τις ουσίες που πρόκειται να εκχυλιστούν, καθώς αύξηση της συγγένειας αυτών οδηγεί σε αύξηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας της εκχύλισης. (Naviglio κ.ά., 2019)

Εκχύλιση με Υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction

Η εκχύλιση με υπερήχους είναι μία μέθοδος με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, υψηλή απόδοση εκχύλισης, αλλά και χαμηλή κατανάλωση διαλύτη. (Solomakou κ.ά., 2022) Αποτελεί γενικά, μία αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης που διευκολύνει την διείσδυση του διαλύτη και μία εύκολη στην εφαρμογή μέθοδο που δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, παρά τη χρήση κοινού εργαστηριακού εξοπλισμού αυτού του λουτρού υπερήχων. (Yoo κ.ά., 2018; Panzella κ.ά., 2020) Επίσης, απαιτεί λιγότερο διαλύτη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, όπως η εκχύλιση Soxhlet, και αποτελεί το πλέον κατάλληλο εργαλείο για την εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από φυτικά προϊόντα. (Yoo κ.ά., 2018) Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη μείωση της ποσότητας του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί και του χρόνου εκχύλισης, χωρίς να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων από αγροδιατροφικά απόβλητα. (Panzella κ.ά., 2020)

Η μέθοδος βασίζεται στην διαδικασία σπηλαιώσης, η οποία προκαλείται από κύκλους διαστολής και συμπίεσης που σχετίζονται με την διέλευση των υπερήχων μέσα από το δείγμα. Το εύρος συχνότητας των υπερήχων κυμαίνεται από 20kHz έως 100 MHz. Η έκρηξη των φυσαλίδων σπηλαιώσης προκαλεί διασωματιδιακές συγκρούσεις που επιφέρουν διάσπαση των σωματιδίων και ενισχυμένη διάχυση των εκχυλίσιμων ενώσεων στο διαλύτη. Συνεπώς, η διασπορά ενέργειας των υπερήχων και κατ' επέκταση η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης επηρεάζονται άμεσα από τα χαρακτηριστικά του δείγματος, όπως είναι η κινητικότητα των σωματιδίων. Η εκχύλιση με υπερήχους μπορεί να εκτελεστεί υπό δυναμική λειτουργία, στην οποία τροφοδοτείται συνεχώς φρέσκος διαλύτης, αλλά και υπό στατικές συνθήκες, όπου έχουμε κλειστά δοχεία χωρίς ανανέωση του διαλύτη. (Panzella κ.ά., 2020)

Γενικώς, βλέπουμε πως η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διαδικασία της εκχύλισης έχει θετική επίδραση, καθώς μειώνει το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της συνολικής απόδοσης. Παρόλο αυτά, στην εκχύλιση με υπερήχους οι θερμοκρασίες κυμαίνονται από τη θερμοκρασία δωματίου έως και τους 70°C, με υψηλότερες θερμοκρασίες να μην συστήνονται λόγω του ισομερισμού των θερμοευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων ή της επιτρεπόμενης αποικοδόμησης, που μπορεί να οδηγήσει την απόδοση της εκχύλισης σε μείωση. Από την σκοπιά του χρόνου στην βιβλιογραφία

συστήνεται ως βέλτιστος χρόνος αυτός των 30 λεπτών. Όμως θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν πως στον χρόνο εκχύλισης θα πρέπει να υπάρξει ένας συμβιβασμός ανάμεσα στη μείωση της εισροής ενέργειας και της αύξησης της συνολικής απόδοσης της εκχύλισης. (Ivanonίέ κ.ά., 2020)

2. Ερευνητικό Μέρος

2.1 Δείγμα εσπρέσο: Χαρακτηριστικά και διαδικασία συλλογής

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν υπολείμματα καφέ εσπρέσο από το κατάστημα καφέ «Ρετούς». Τα υπολείμματα ήταν ποικιλίας 100% *Arabica*, με μεσαίο άλεσμα (7/14), που είχαν υπέστη πρώτη εκχύλιση (παραγωγή ροφήματος καφέ) σε θερμοκρασία περίπου 95°C. Στο δείγμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οξύτητας με *Mettler Toledo F20 FiveEasy Benchtop pH Meter* και αυτή βρέθηκε 5,9.

2.2 Μέθοδοι Ανάκτησης Βιοδραστικών Ενώσεων

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν τέσσερις (4) διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης όπου βασίστηκαν σε δύο γνωστές και ευρέως χρησιμοποιούμενες αρχές. Η πρώτη αρχή είναι αυτή της Εκχύλισης με Υπερήχους, όπου και αποτελεί μία από τις μεθόδους, και η δεύτερη είναι η Εκχύλισης Στερεού-Υγρού με τρεις διαφορετικές μεθόδους. Στην Υποβοηθούμενη Εκχύλιση με Υπερήχους (*Ultrasound Assisted Method -UAE*), ο χρόνος της εκχύλισης ήταν 20min και η μέγιστη θερμοκρασία της εκχύλισης 46,6°C. Στις Εκχυλίσσεις Στερεού-Υγρού – *Solid Liquid Extraction (SLE)* χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι: η πρώτη Εκχύλιση Στερεού-Υγρού με διάρκεια 20min και βρασμό με συνεχή ανάδευση, η δεύτερη Εκχύλιση Στερεού-Υγρού όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *Soxhlet* με κάποιες τροποποιήσεις (Τροποποιημένη *Soxhlet*), η διάρκεια εκχύλισης ήταν 20min και η θερμοκρασία 65°C και τέλος η Εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες σε χαμηλή θερμοκρασία (65°C) με συνεχή ανάδευση.

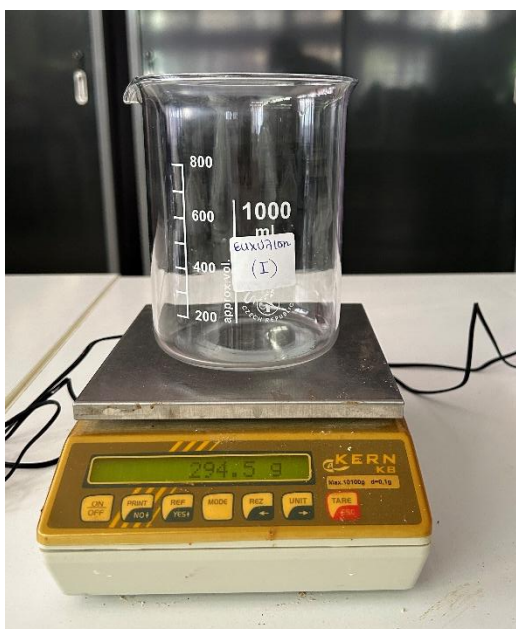
Όλες οι εκχυλίσσεις έγιναν με βάση την αναλογία υπολειμμάτων καφέ : νερό=1:4. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 100g καφέ και 400ml νερού βρύσης σε όλες τις εκχυλίσσεις πλην της Υποβοηθούμενης Εκχύλισης με Υπερήχους – *UAE*. Σε αυτή την μέθοδο, λόγω των προδιαγραφών της συσκευής υπερήχων που απαιτεί τουλάχιστον 3-3,5lt διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν 1kg υπολειμμάτων καφέ και 4lt νερό. Η ζύγιση της μάζας των υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο έγινε με χρήση ζυγαριάς ακρίβειας δύο δεκαδικών ψηφίων.

Μετά το πέρας κάθε εκχύλισης τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε *Falcon* και φυγοκεντρήθηκαν. Έπειτα, 100ml από τα φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα της κάθε μεθόδου τοποθετήθηκαν σε τρυβλία *petri* και έπειτα στην κατάψυξη για να ακολουθήσει η κρυοξήρανση. Από κάθε μέθοδο κρατήθηκε αντιδείγμα ποσότητας 120ml σε πλαστικό δοχείο και διατηρήθηκε στην κατάψυξη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή λυοφιλιοποίησης και μετά το πέρας της διαδικασίας της κρυοξήρανσης τα τρυβλία *petri* ζυγίστηκαν ώστε να βρεθεί η ποσότητα σκόνης που ανακτήθηκε από την κάθε μέθοδο. Η σκόνη της κάθε μεθόδου

χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών με την μέθοδο *Folin-Ciocalteu* και τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιώντας την μέθοδο DPPH.



Εικόνα 3: Ποτήρια ζέσεως



Εικόνα 4: Ζύγιση δοχείων με τις ετικέτες



Εικόνα 5 Ζύγιση 100g καφέ.

2.2.1 Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους – Ultrasound Assisted Extraction (UAE)

Η εκχύλιση με υπερήχους αποτελεί μία πράσινη μέθοδο εκχύλισης. Περιλαμβάνει την χρήση συσκευής τροφοδοτικού υπερήχων και τον θάλαμο υπερήχων με αναδευτήρα. Στην εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν υπολείμματα καφέ με μεσαίο άλεσμα και νερό βρύσης με αναλογία 1:4. Για την μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων (GLOBUS DIA – SONIC EXTRACTORS Mod. 5 – 20 l).

Υλικά:

1. Καφές – Υπολείμματα καφέ εσπρέσο με μεσαίο άλεσμα (7/14)
2. Νερό – Νερό βρύσης
3. Ποτήρι ζέσεως
4. Ζυγαριά με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων
5. Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους
6. Σωληνάρια Falcon – Τοποθέτηση εκχυλίσματος καφέ για φυγοκέντρωση
7. Συσκευή φυγοκέντρωσης
8. Τρυβλία petri

Μέθοδος:

1. Συλλογή υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο με μεσαίο άλεσμα (7/14).
2. Ζύγιση 1kg υπολειμμάτων καφέ και 4l νερού βρύσης.
3. Τοποθέτηση των υπολειμμάτων καφέ και του νερού στον θάλαμο υπερήχων.
4. Ρύθμιση της συσκευής: συνεχόμενη δεξιόστροφη ανάδευση, συνεχείς υπέρηχοι, εύρος συχνότητας υπερήχων 38kHz, μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να φτάσει το δείγμα στους 50°C, χρονόμετρο στα 20min.
5. Με το πέρας της εκχύλισης (20 λεπτά) αδειάζουμε το εκχύλισμα σε ποτήρια ζέσεως.
6. Τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε σωληνάρια Falcon των 50ml και φυγοκέντρωση αυτών για 15min και σε 4500rpm
7. Αποθήκευση και Συντήρηση: 100ml του εκχυλίσματος μετά από διήθηση τοποθετούνται σε τρυβλία petri και αποθηκεύονται στην κατάψυξη στους -80°C ώστε να ακολουθήσει λυοφιλίωση.



Εικόνα 6 Συσκευή Υπερηχητικής Εκχύλισης - Ultrasonic Extraction Tank



Εικόνα 7 Τέλος Εκχύλισης με την μέθοδο Υπερήχων



Εικόνα 8 Συλλογή δείγματος μετά το τέλος της Υποβοηθούμενης Εκχύλισης με Υπερήχους

2.2.2 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), 20 min Βρασμός και Ανάδευση

Η διαδικασία της μεθόδου περιλαμβάνει την χρήση θερμαινόμενου μαγνητικού αναδευτήρα, νερού και άλεσμα υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο με αναλογία καφές/νερό = 1/4

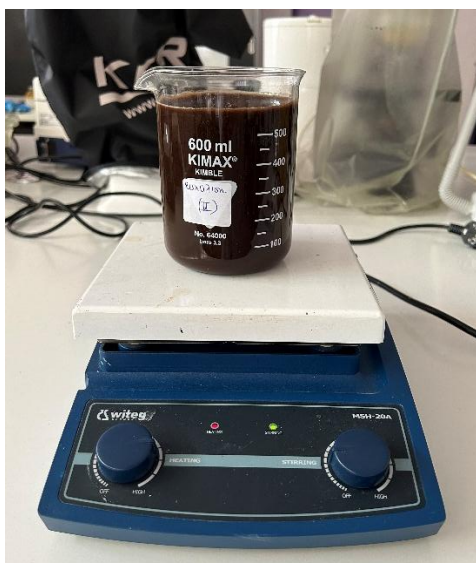
Υλικά:

1. Υπόλειμμα Καφέ Εσπρέσο με Μεσαίο Άλεσμα
2. Νερό βρύσης
3. Ποτήρι ζέσεως
4. Ζυγαριά ακρίβειας δυο δεκάδικων ψηφίων
5. Μαγνήτης ανάδευσης
6. Θερμαινόμενος Μαγνητικός Αναδευτήρας
7. Σωληνάρια Falcon
8. Συσκευή φυγοκέντρωσης
9. Τρυβλία petri

Μέθοδος:

1. Συλλογή και ζύγιση 100gr υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο με μεσαίο άλεσμα
2. Τοποθέτηση 100gr υπολειμμάτων καφέ στο ποτήρι ζέσεως
3. Στο ποτήρι ζέσεως προσθήκη 400ml νερού μαζί με μαγνήτη ανάδευσης για συνεχή ανάδευση του διαλύματος
4. Προετοιμασία και Εκχύλιση – Η διαδικασία παρασκευής εκχυλίσματος αρχίζει με σταθερή θέρμανση στους 95°C για 20λεπτά με συνεχή ανάδευση, τοποθετώντας πώμα στην κωνική φιάλη προκειμένου να αποφευχθεί απώλεια/εξάτμιση του διαλύτη (νερό). Αυτό θα βοηθήσει την εξαγωγή γεύσεων και αρωμάτων, καθώς επίσης και των αντιοξειδωτικών ουσιών του καφέ.
5. Θερμοκρασία – Εφαρμόζεται σταθερή θέρμανση στους 95°C σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης.
6. Συλλογή Εκχυλίσματος – Έπειτα από 20λεπτά όπου η διαδικασία της εκχύλισης θα έχει ολοκληρωθεί, σταματάμε τη θέρμανση και την ανάδευση και αποσύρουμε το ποτήρι ζέσεως από την θερμαινόμενη πλάκα. Έπειτα συλλέγουμε το εκχύλισμα και το τοποθετούμε σε σωληνάρια Falcon των 50ml για φυγοκέντρωση.
7. Φυγοκέντρωση – Τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε σωληνάρια Falcon των 50ml και φυγοκέντρωση για 15min σε 4500rpm

8. Αποθήκευση και Συντήρηση – Τοποθέτηση 100ml του εκχυλίσματος μετά από φυγοκέντρηση σε τρυβλία petri και αποθήκευση τους στην κατάψυξη στους -80°C για προετοιμασία του εκχυλίσματος ώστε να ακολουθήσει λυοφιλίωση.



Εικόνα 9 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού - Solid Liquid Extraction (SLE) 20λεπτά βρασμός με συνεχή ανάδευση



Εικόνα 10 Τοποθέτηση Μαγνήτη Ανάδευσης στο δείγμα για συνεχή ανάδυσή του



Εικόνα 11 Συνεχής ανάδευση του δείγματος πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα

2.2.3 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), Τροποποιημένη Soxhlet

Η Τροποποιημένη Soxhlet αποτελεί την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο παρασκευής εκχυλίσματος καφέ. Πρόκειται για την εκχύλιση με καφετιέρα φίλτρου οικιακής χρήσης, κατά την οποία ο διαλυτής (νερό) έχοντας υψηλή θερμοκρασία πέφτει πάνω στο δείγμα και το διαπερνά τραβώντας μαζί του και τις προς εκχύλιση επιθυμητές ουσίες. Περιλαμβάνει την χρήση καφετιέρας φίλτρου οικιακής χρήσης, διηθητικού χαρτιού (φίλτρου καφέ) και νερού σε συνδυασμό με άλεσμα καφέ. Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής χρησιμοποιήθηκε αναλογία καφές:νερό = 1/4 .

Υλικά:

1. Καφές - Υπολείμματα καφέ εσπρέσο
2. Φίλτρο – Απλά φίλτρα καφέ κατάλληλα για την καφετιέρα
3. Νερό – νερό βρύσης
4. Μηχανή παρασκευής καφέ φίλτρου – Καφετιέρα φίλτρου οικιακής χρήσης
5. Σωληνάρια Falcon – Τοποθέτηση εκχυλίσματος καφέ
6. Συσκευή Φυγοκέντρωσης
7. Τρυβλία petri

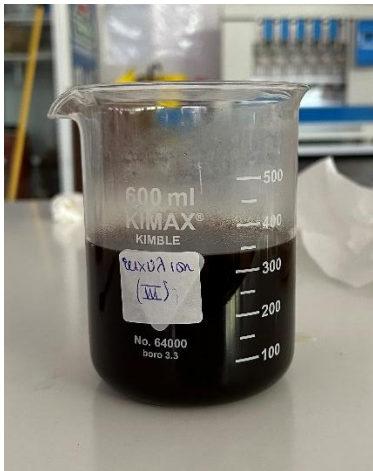
Μέθοδος:

1. Καφές – Συλλογή υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο με μεσαίο άλεσμα
2. Προετοιμασία καφετιέρας – Τοποθέτηση φίλτρου στην καφετιέρα και προσθήκη ποσότητας 100γρ υπολειμμάτων καφέ στο ειδικό δοχείο

3. Νερό – Προσθήκη 400ml νερού στην καφετιέρα. Αφήνουμε το νερό να ζεσταθεί στην καφετιέρα και να προετοιμαστεί για την εκχύλιση
4. Προετοιμασία και Εκχύλιση – Η διαδικασία παρασκευής του εκχυλίσματος ξεκινάει, καθώς η καφετιέρα εκχέει το ζεστό νερό πάνω από τον καφέ σε μικρές, ομοιόμορφες κινήσεις. Με αυτόν τον τρόπο θα εξάγει τις γεύσεις και τα αρώματα καθώς επίσης και τις αντιοξειδωτικές ουσίες του καφέ.
5. Θερμοκρασία – Περίπου στα μισά της διαδικασίας της εκχύλισης μετράμε την θερμοκρασία του εκχυλίσματος. Η θερμοκρασία του εκχυλίσματος βρέθηκε στους 65°C.
6. Συλλογή Εκχυλίσματος – Αφού η διαδικασία της εκχύλισης ολοκληρώθηκε, αφαιρούμε το φίλτρο μαζί με τα υπολείμματα και τοποθετούμε το εκχύλισμα σε ποτήρι ζέσεως.
7. Φυγοκέντρηση – Τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε σωληνάρια Falcon των 50ml και φυγοκέντρηση για 15min σε 4500rpm
8. Αποθήκευση και Συντήρηση – Τοποθέτηση του εκχυλίσματος μετά από φυγοκέντρηση σε τρυβλία petri στην κατάψυξη στους -80°C για διατήρηση του εκχυλίσματος.



Εικόνα 12 Συσκευή Εκχύλισης Τροποποιημένης Soxhlet Solid Liquid Extraction - Τροποποιημένη Soxhlet



Εικόνα 13 Εκχύλισμα Τροποποιημένης Soxhlet

2.2.4 Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction (SLE), Βρασμός και Ανάδευση για 24ώρες

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει χρήση θερμαινόμενου μαγνητικού αναδευτήρα, νερού και μαγνήτη ανάδευσης σε συνδυασμό με υπολείμματα καφέ εσπρέσο μεσαίου αλέσματος με αναλογία καφέ/νερό = 1/4.

Υλικά:

1. Καφές – Υπολείμματα καφέ εσπρέσο
2. Νερό – νερό βρύσης
3. Ποτήρι ζέσεως
4. Θέρμανση – Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
5. Μαγνήτη ανάδευσης
6. Σωληνάρια Falcon των 50ml
7. Συσκευή Φυγοκέντρωσης
8. Τρυβλία petri

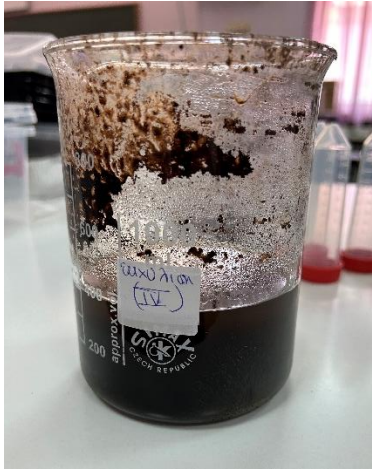
Μέθοδος:

1. Συλλογή υπολειμμάτων καφέ εσπρέσο με μεσαίο άλεσμα
2. Ετοιμασία δείγματος – τοποθέτηση ποσότητας 100gr από τα υπολείμματα καφέ εσπρέσο στο ποτήρι ζέσεως
3. Προσθήκη 400ml νερού βρύσης στο ποτήρι ζέσεως μαζί με ένα μαγνητάκι για συνεχή ανάδευση του δείγματος

4. Προετοιμασία και Εκχύλιση – Ξεκινά η διαδικασία παρασκευής εκχυλίσματος καφέ με σταθερή θέρμανση στους 65°C για 24ώρες τοποθετώντας πώμα στην κωνική φιάλη, προκειμένου να αποφευχθούν απώλειες του διαλύτη (νερό) μέσω της εξάτμισης.
5. Θερμοκρασία – Εφαρμόζεται σταθερή θερμοκρασία στους 65°C σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
6. Συλλογή Εκχυλίσματος – Έπειτα από 24ώρες όπου η διαδικασία της εκχύλισης θα έχει ολοκληρωθεί, σταματάμε τη θέρμανση και την ανάδευση και αποσύρουμε το ποτήρι ζέσεως από την θερμαινόμενη πλάκα.
7. Φυγοκέντρηση – Τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε σωληνάρια Falcon των 50ml και φυγοκέντρηση για 15min σε 4500rpm.
8. Αποθήκευση και Συντήρηση – Τοποθέτηση του εκχυλίσματος μετά από φυγοκέντρηση σε τρυβλία petri στην κατάψυξη στους -80°C για προετοιμασία του εκχυλίσματος για λυοφιλίωση.



Εικόνα 14 Solid Liquid Extraction 24ώρες βρασμός με συνεχή ανάδευση



Εικόνα 15 Τέλος 24ωρης Εκχύλισης Στερεού-Υγρού

2.3 Φυγοκέντρωση

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με Φυγόκεντρο (*New Thermo Scientific Small Benchtop Centrifuge SL 8*) για 15 λεπτά στις 4500rpm ώστε να παραλάβουμε τα υδατικά εναιωρήματα, όπου και βρίσκονται οι φαινολικές ενώσεις, αποφεύγοντας έτσι την τυχόν παρουσία ποσότητας στερεού ιζήματος από τα υπολείμματα καφέ. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα καταψύχθηκαν στους -80°C και λυοφιλιώθηκαν.



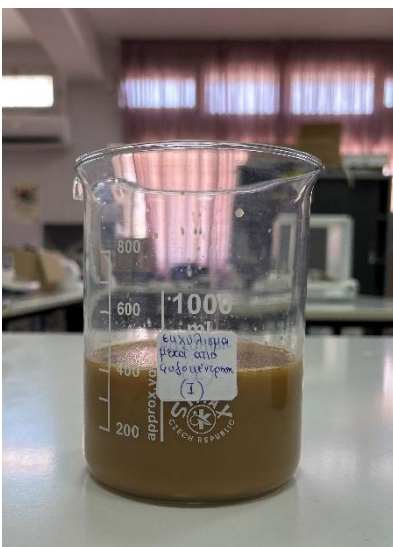
Εικόνα 16 Δείγμα Εκχύλισης σε Falcon πριν την φυγοκέντρωση



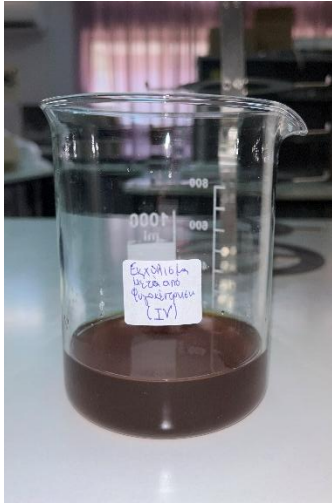
Εικόνα 17 Φυγόκεντρος με Falcon στις 4 θέσεις



Εικόνα 18 Δείγμα μετά το πέρας της Φυγοκέντρωσης. Στο κάτω μέρος του Falcon διακρίνεται ίζημα



Εικόνα 19 Εκχύλισμα Υπερήχων μετά την Φυγοκέντρωση



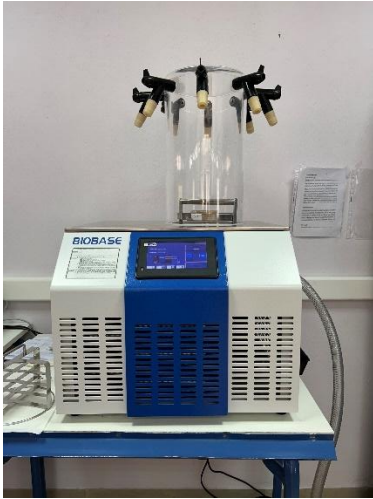
Εικόνα 20 Εκχύλισμα 24ωρης Εκχύλισης Στερεού-Υγρού μετά από Φυγοκέντρωση

2.4 Λυοφιλίωση -Freeze Dry

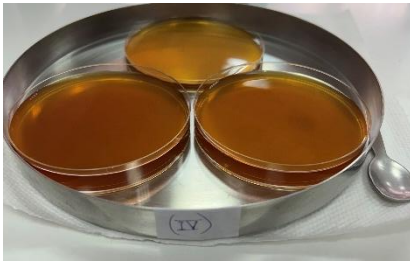
Όλα τα δείγματα μετά την φυγοκέντρωση τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη σε θερμοκρασία -23°C για να προετοιμαστούν για τη διαδικασία της λυοφιλίωσης. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον θάλαμο δειγμάτων της συσκευής λυοφιλίωσης όπου πρώτα απέκτησαν την κατάλληλη θερμοκρασία των -80°C και έπειτα με την εφαρμογή της κατάλληλης πίεσης και μέσω της διαδικασίας της εξάχνωσης τα δείγματα μετατράπηκαν σε σκόνη. Η μετατροπή αυτή των δειγμάτων μας δίνει «καθαρά προς επεξεργασία δείγματα», δηλαδή απαλλαγή των εκχυλισμάτων από τον διαλύτη τους (νερό) αφήνοντας μόνο τις βιοδραστικές ουσίες του καφέ που θέλουμε να εξετάσουμε σε μορφή σκόνης.

Η συσκευή λυοφιλίωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Table Top Freeze Dryer BK-FD10P – BIOBASE.

Σε κάθε μέθοδο δόθηκε μία κωδική ονομασία I, II, III, IV για την εκχύλιση με υπερήχους, την εκχύλιση στέρεου-υγρού 20λεπτων, την Τροποποιημένη Soxhlet και την εκχύλιση στέρεου-υγρού 24ωρων αντίστοιχα. Από κάθε μέθοδο εκχύλισης μετρήθηκαν τα απόβαρα των τρυβλίων petri που χρησιμοποιήθηκαν για την αποθήκευση των 100ml εκχυλίσματος, ώστε να βρεθεί η απόδοση των μεθόδων ποσοτικά.



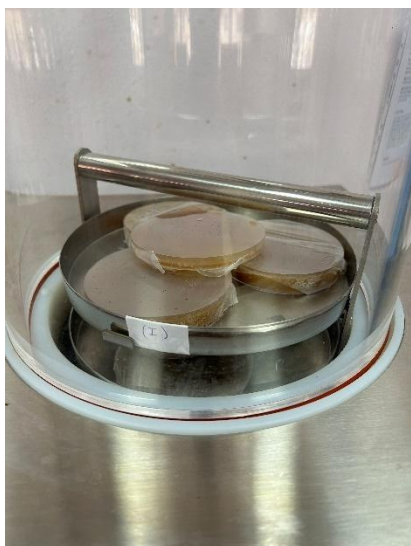
Εικόνα 21 Συσκευή Ανοφιλιοποίησης



Εικόνα 22 Τοποθετημένα δείγματα της Εκχύλισης Υποβοηθούμενης με Υπερήχους έπειτα από την φυγοκέντρηση σε τρυβλία petri.



Εικόνα 23 Εκχύλισμα μετά από προετοιμασία στους -23°C



Εικόνα 24 Πρώτο στάδιο της διαδικασίας Λυοφιλοποίησης. Τα δείγματα πριν μπουν στην συσκευή λυοφιλοποίησης καταψύχθηκαν και καλύφθηκαν με μεμβράνη στην οποία δημιουργήθηκαν μικρές τρύπες για να επιτευχθεί η Εξάχνωση.



Εικόνα 25 Δεύτερο στάδιο της διαδικασίας λυοφιλοποίησης. Σε κάθε ταψάκι βρίσκονται και τα δείγματα από κάθε εκχύλιση.



Εικόνα 26 Θερμοκρασίες στους θαλάμους της συσκευής Λυοφιλοποίησης σε μια χρονική στιγμή του πειράματος

2.5 Μέθοδοι Αξιολόγησης Εκχυλισμάτων

2.5.1 Μέτρηση pH

Για κάθε μέθοδο εκχύλισης καθώς και για το διάλυμα του καφέ πριν την εκχύλιση πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οξύτητας με *Mettler Toledo F20 FiveEasy Benchtop pH Meter*. Ο Πίνακας 3 που ακολουθεί περιέχει τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

2.5.2 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μία μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών πολυφαινολών στα τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή για την επαναληψιμότητα και για την απλότητά της, παρέχοντας ακριβή και αξιόπιστα δεδομένα για διάφορες ομάδες φαινολικών ενώσεων. (Blainski κ.ά., 2013; Pérez κ.ά., 2023) Πρόκειται για μία χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται σε μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων στην οποία το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δρα ως οξειδωτικό ενώ ο αντιοξειδωτικός παράγοντας (φαινολική ένωση) ως δότης ηλεκτρονίου. (Pérez κ.ά., 2023; Sánchez-Rangel κ.ά., 2013) Η αντίδραση σχηματίζει ένα μπλε χρωμοφόρο αποτελούμενο από το σύμπλοκο του φωσφομολυβδαίνιου με το φωσφοβολγικό. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu έχει χρώμα έντονο κίτρινο, ενώ η οξείδωσή του οδηγεί σε χρώμα μπλε. Κατά την διάρκεια της μεθόδου, η αντίδραση ανάμεσα στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και την φαινολική ένωση πραγματοποιείται σε pH περίπου 10, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου. Μερικά τρόφιμα μπορεί να περιέχουν ουσίες οι οποίες μπορούν να

παρέμβουν στην αντίδραση με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δίνοντας έτσι διαστρεβλωμένα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού φορτίου. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι το δευδροασκοβρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ και τα αναγωγικά σάκχαρα όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, έχουν τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στην παρεμπόδιση της ακρίβειας της ανάλυσης. (Blainski κ.ά., 2013; Sánchez-Rangel κ.ά., 2013)

Παρασκευή Na_2CO_3 :

Αραίωση 7,5 ml άνυδρο Na_2CO_3 σε 100ml απιονισμένο νερό. Τοποθέτηση του διαλύματος σε συνεχή ανάδευση έως ότου να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Παρασκευή δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu:

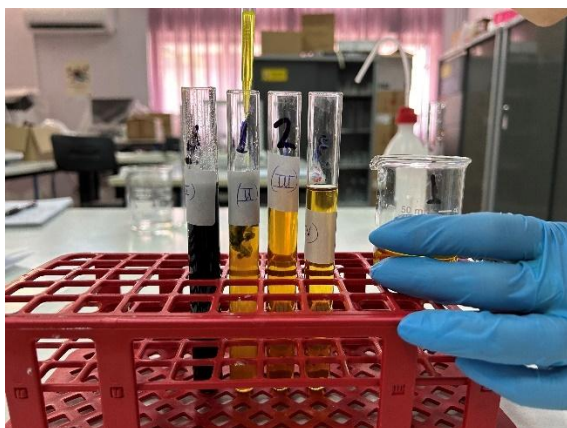
Τα μητρικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με αραίωση 1:10 προσθέτοντας 100μl δείγματος και 900μl απιονισμένο νερό. Η παρασκευή των διαλυμάτων έγινε μέσω προσθήκης 100μl δείγματος από τα μητρικά διαλύματα, 100μl αντιδραστηρίου Folin και με το πέρας 2 λεπτών 800μl Na_2CO_3 5%. Τέλος, τοποθετούμε τα διαλύματα σε υδατόλουτρο 40°C για 20λεπτά. Η απορρόφηση γίνεται στα 740nm με Φασματοφωτόμετρο UV/VIS LLG-uniSPEC 2.

Για την παρασκευή του τυφλού και του πρότυπου διαλύματος έγινε την ίδια σειρά προσθήκης των συστατικών που αναφέρθηκε πιο πάνω, αντί όμως για το δείγμα προστέθηκε απιονισμένο νερό και γαλλικό οξύ αντίστοιχα.

Αφού παρασκευάστηκαν τα διαλύματα αυτά τοποθετήθηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η μέγιστη ώρα που μπορούν τα διαλύματα να αφεθούν στο σκοτάδι είναι δύο ώρες.



Εικόνα 27 Παρασκευή δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu



Εικόνα 28 Παρασκευή δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Προσθήκη αντιδραστηρίου Folin



Εικόνα 29 Φασματοφωτόμετρο LLG-uniSPEC 2

2.5.3 Μέτρηση Αντιοξειδωτικής Ικανότητας με την χρήση της Δραστικής Ρίζας 2,2-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλη (DPPH)

Η ρίζα 2-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλη (DPPH) είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μέτρηση της εξουδετέρωσης της ρίζας από αντιοξειδωτικό μέσο. Με την εξουδετέρωση της ρίζας το διάλυμα από μωβ χρώμα αρχίζει να αποχρωματίζεται, η ρίζα DPPH εμφανίζει υψηλές απορροφήσεις στα 517nm και κατ' επέκταση με την εξουδετέρωση αυτής από ένα αντιοξειδωτικό μέσο σημαίνει πως η απορρόφηση του διαλύματος θα μειωθεί. (Kedare & Singh, 2011)

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μετρήθηκε μέσω της μεθόδου δέσμευσης της δραστικής ρίζας DPPH. Για την παρασκευή του δείγματος DPPH προστέθηκαν σε 38,1ml απιονισμένο νερό 3mg DPPH. Το διάλυμα DPPH καλύπτεται με αλουμινόχαρτο καθώς το δείγμα είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στους +4°C έως και 3 ημέρες. Η

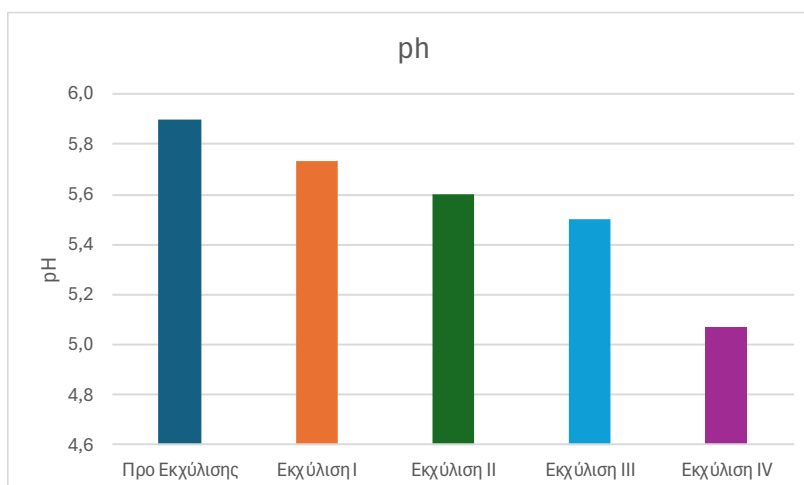
παρασκευή των μητρικών δειγμάτων των εκχυλισμάτων έγινε με βάση των πίνακα 6. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είχαν συνολικό όγκο 1ml και παρασκευάστηκαν, όπως φαίνεται και στον πίνακα 7, προσθέτοντας 100μl από τα μητρικά διαλύματα των εκχυλίσεων, για τις αραιώσεις 1:100, 1:50, 1:20 και 1:10, 850μl νερό και 50μl της παρασκευασμένης ρίζας DPPH. Τα πυκνά διαλύματα περιείχαν μόνο 1ml από τα μητρικά τους διαλύματα, τα τυφλά διαλύματα περιείχαν 1ml νερού και τα διαλύματα Control περιείχαν 850μl νερό και 50μl από το παρασκευασμένο διάλυμα DPPH. Τέλος τα δείγματα αφέθηκαν στο σκοτάδι για 30 λεπτά και η απορρόφηση τους μετρήθηκε στα 517nm με φασφατοφωτόμετρο (*Spectrophotometer XD 7000 (VIS) - Lovibond*).

Πειραματική Διαδικασία

- i. Σε σωλήνες Eppendorf του 1ml προσθέτουμε το δείγμα της κάθε εκχύλισης, το απιονισμένο νερό και τελευταίο το DPPH
- ii. Αναδεύουμε καλά σε vortex
- iii. Επωάζουμε για τουλάχιστον 20λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου
- iv. Μηδενίζουμε με το «Τυφλό» που περιέχει μόνο απιονισμένο νερό
- v. Αρχίζουμε να μετράμε στα 517nm

3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Από την μέτρηση του pH στα δείγματα των εκχυλίσεων καθώς και στο δείγμα που δεν υπέστη εκχύλιση βλέπουμε πως τα δεδομένα που πήραμε ήταν συνεπή, Πίνακας 6 και Σχήμα 1. Επίσης, παρατηρούμε πως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της οξύτητας μεταξύ των μεθόδων εκχύλισης, εκτός από μία ήπια μεταβολή της οξύτητας από 0,1 έως 0,8.



Σχήμα 1. Γραφική παράσταση (ραβδόγραμμα) των Μέσων Όρων pH προ εκχύλισης και των τεσσάρων Μεθόδων Εκχύλισης

Από την διαδικασία της κρυοξήρανσης πήραμε σε μορφή σκόνης 1,3g από την μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους, 0,8g από την 20λεπτη μέθοδο εκχύλιση στερεού-υγρού, 0,8g από την μέθοδο εκχύλισης τροποποιημένης Soxhlet και 0,6g από την 24ωρη μέθοδο εκχύλισης στερεού-υγρού. Για την κάθε μέθοδο οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Όπως φαίνεται, η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους έχει την καλύτερη απόδοση όσον αφορά την ανάκτηση των στερεών βιοδραστικών ουσιών από τα υπολείμματα καφέ εσπρέσο. Ακολουθούν η τροποποιημένη Soxhlet και η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού, με τελευταία την 24ωρη εκχύλιση. Αυτό ίσως να συμβαίνει διότι με το πέρας του χρόνου και τη συνεχή έκθεση του εκχυλίσματος σε θερμοκρασία άνω των 60°C να ταλαιπωρείται το δείγμα με αποτέλεσμα την καταστροφή των βιοδραστικών ουσιών του. Αντίθετα, οι άλλες τρεις μέθοδοι που η διάρκειά τους ήταν 20 λεπτά βλέπουμε να διατηρούν υψηλή απόδοση δίνοντας μεγαλύτερη ποσότητα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος. Όμως, αν και στην 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού με συνεχή ανάδευση η θερμοκρασία ήταν αρκετά υψηλή (95⁰) η μικρή διάρκεια της μεθόδου βοηθά στην διατήρηση της απόδοσης, δίνοντας έτσι μεγαλύτερη ποσότητα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος. Επομένως, αποδεικνύεται ότι και οι δύο παράμετροι, χρόνος και θερμοκρασία, είναι σημαντικές.

Όπως διαπιστώθηκε σε αυτή την πτυχιακή εργασία, η 24ωρη εκχύλιση διεξήχθη σε σταθερή θερμοκρασία αυτή των 65°C, που ήταν ίδια και για την εκχύλιση της τροποποιημένης Soxhlet, όμως οι εκχυλίσσεις έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα με την δεύτερη να έχει καλύτερη απόδοση. Επίσης, όσον αφορά την θερμοκρασία βλέπουμε πάλι πως ο ρόλος της έπαιξε δευτερεύοντα ρόλο σε σχέση με τον χρόνο καθώς η εκχύλιση με υπερήχους που πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία (46,6°C) είχε καλύτερη απόδοση από την 24ωρη εκχύλιση. Όμως ανάμεσα στους 65°C και στους 46,6°C φαίνεται πως η χαμηλότερη θερμοκρασία καταφέρνει να διατηρήσει περισσότερες βιοδραστικές ενώσεις δίνοντας μεγαλύτερη ποσότητα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος. Άρα, όσον αφορά την ποσότητα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος που θα ανακτηθεί από την διαδικασία της λυοφιλίωσης φαίνεται πως σημαντικό ρόλο παίζει ο χρόνος της εκχύλισης καθώς και η θερμοκρασία, με τον μικρότερο χρόνο και τις ήπιες θερμοκρασίες να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα απόδοσης. Αναλυτικά τα αποτελέσματα στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

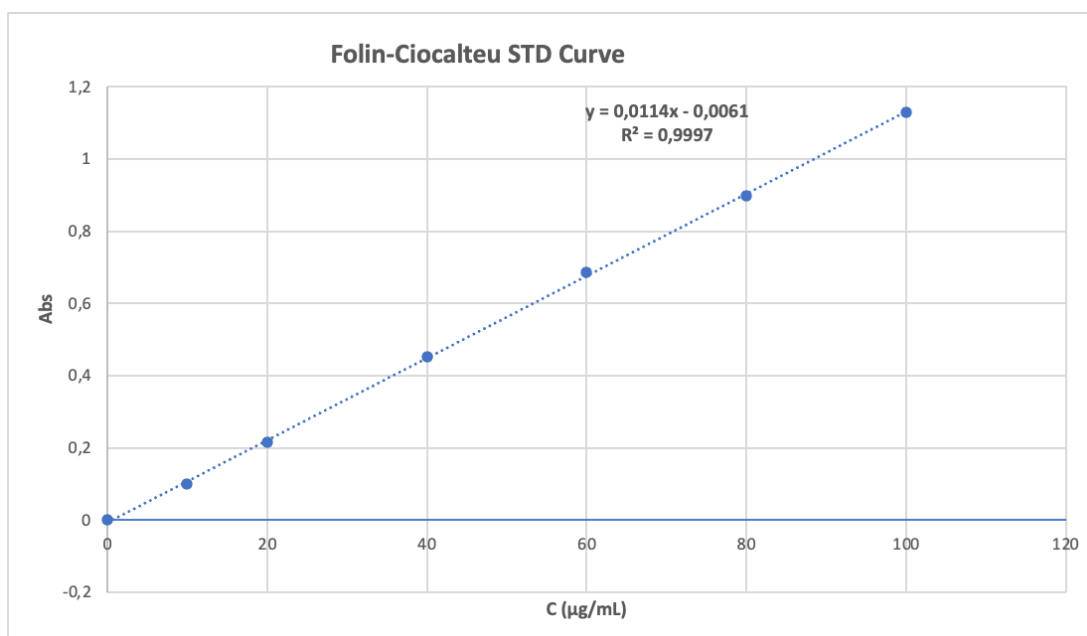
Πίνακας 1. Σύγκριση Χρόνων, Θερμοκρασιών, και Σκόνης που ανακτήθηκε από κάθε Μέθοδο Εκχύλισης

Μέθοδος Εκχύλισης	Χρόνος Εκχύλισης σε min	Θερμοκρασία Εκχύλισης σε °C	Στερεό-Λυοφιλιώμενο Εκχύλισμα που ανακτήθηκε σε g
Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους – Ultrasound Assisted Method	20	46,6	1,3
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction 20min συνεχή ανάδευση και βρασμός	20	95	0,8
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction Τροποποιημένη Soxhlet	20	65	0,8
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction 24h συνεχή ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία	1440	65	0,6

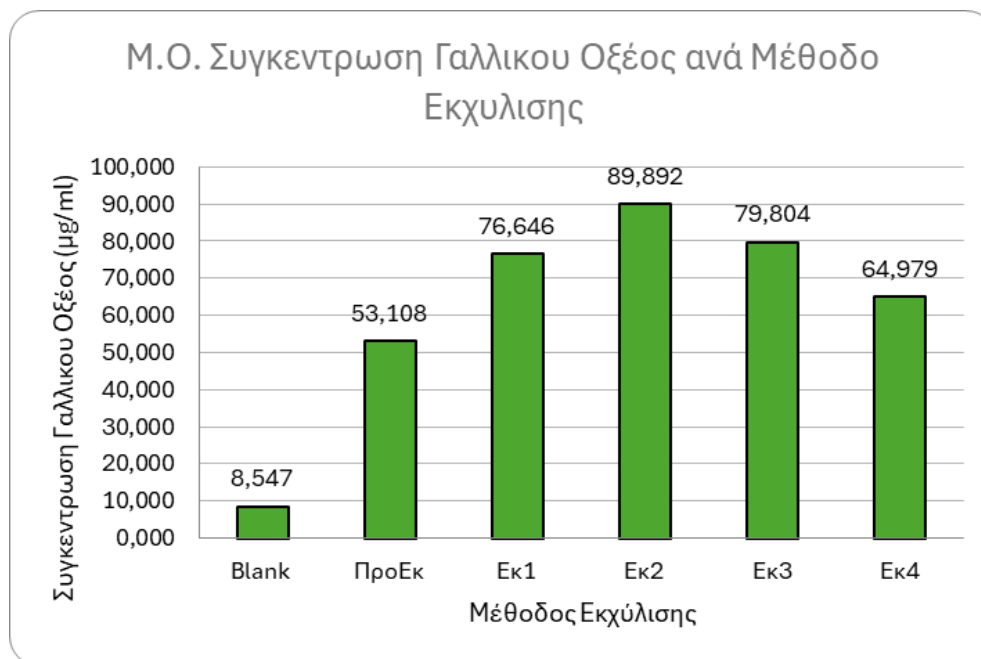
Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 θα περιμέναμε πως η εκχύλιση μέσω υπερήχων θα είχε και την μέγιστη ανάκτηση φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τις άλλες τρεις μεθόδους, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας στερεού-λυοφιλικού εκχυλίσματος που ανακτήσαμε. Τα αποτελέσματα από την φασματοφωτομετρία όμως έδειξαν διαφορετικά από τα αναμενόμενα αποτελέσματα δείχνοντας την εκχύλιση με υπερήχους ως την δεύτερη λιγότερο αποδοτική για την ανάκτηση των ολικών φαινολών. Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων στα 740nm περιγράφονται στον Πίνακα 8. Το Σχήμα 2 απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Folin-Ciocalteu και την εξίσωση με βάση την οποία μετατράπηκαν τα αποτελέσματα των απορροφήσεων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/L), όπως φαίνεται και στον πίνακα 9, ώστε να γίνει σύγκριση των εκχυλίσεων. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί:

$$y = 0,0114x - 0,0061$$

Σχήμα 2. Πρότυπη Καμπύλη για την μέθοδο Folin-Ciocalteu



Από τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρίας (Πίνακας 8) βλέπουμε πως η μέθοδος της 24ωρης εκχύλισης στερεού-υγρού είχε την μικρότερη απορρόφηση από όλες τις μεθόδους, ενώ η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού είχε την μεγαλύτερη. Μετά την 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού ακολουθεί η τροποποιημένη Soxhlet και έπειτα η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Μετατρέποντας τα αποτελέσματα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος είδαμε πως όντως η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού είναι η πιο αποδοτική μέθοδος για την ανάκτηση των ολικών φαινολικών ενώσεων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. Γράφημα των Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων Γαλλικού Οξέος ανά Μέθοδο Εκχύλισης

Από το γράφημα του Σχήματος 3 βλέπουμε πως η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού (Εκ2) είναι πρώτη σε συγκέντρωση ισοδυνάμων γαλλικού οξέος με διαφορά συγκέντρωσης περίπου 10,000μg/ml από την δεύτερη πιο αποδοτική εκχύλιση (Εκχύλιση Τροποποιημένης Soxhlet) για την ανάκτηση ολικών φαινολικών ενώσεων. Όσον αφορά, τις υπόλοιπες εκχυλίσσεις φαίνεται πως η μέθοδος εκχύλισης υποβοηθούμενη από υπερήχους και η εκχύλιση στερεού-υγρού τροποποιημένης Soxhlet δίνουν παρόμοια αποτελέσματα με ελαφρώς καλύτερα αυτά της τροποποιημένης Soxhlet. Η 24ωρη εκχύλιση στερεού-υγρού φαίνεται πως είναι η λιγότερο αποδοτική μέθοδος ανάκτησης φαινολικών ενώσεων με διαφορά συγκέντρωσης 11,667μg/ml από την δεύτερη λιγότερο αποδοτική μέθοδο εκχύλισης αυτήν της εκχύλισης με υπερήχους. Ωστόσο, όλες οι μέθοδοι εκχύλισης σε σχέση με το προ εκχύλισης δείγμα είχαν καλύτερη απόδοση στην ανάκτηση ολικών φαινολικών ενώσεων. Επομένως, ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους η καλύτερη μέθοδος εκχύλισης για την ανάκτηση των συνολικών φαινολικών ενώσεων είναι η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού και η λιγότερο κατάλληλη μέθοδος η 24ωρη εκχύλιση.

Βλέπουμε πως το βάρος του στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος και η απορρόφηση των δειγμάτων δεν μπορούν κάπως να συσχετιστούν, καθώς από την μέθοδο που πήραμε το μεγαλύτερο δείγμα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος (εκχύλιση με υπερήχους) δεν είχε τη μεγαλύτερη απορρόφηση και κατ' επέκταση την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές φαινολικές ενώσεις. Παρόλα αυτά, αν εστιάσουμε την προσοχή μας στην εκχύλιση που μας έδωσε την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και σε αυτή που μας έδωσε

την μικρότερη συγκέντρωση βλέπουμε πως ίσως να υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στο βάρος του στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος και στο συνολικό φαινολικό φορτίο. Αυτό μπορεί να ειπωθεί καθώς η 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού έδωσε 0,8g σκόνης και την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, ενώ η 24ωρη εκχύλιση στερεού-υγρού έδωσε 0,6g και την μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων.

Ίσως, αυτό να οφείλεται στο κατά πόσο το δείγμα θα ταλαιπωρηθεί κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Δηλαδή, στην Τροποποιημένη Soxhlet το δείγμα και ο διαλύτης δεν έρχονται σε ολοκληρωτική επαφή μεταξύ τους, καθώς ο διαλύτης πέφτει πάνω στο δείγμα με αργά σταθερό ρυθμό και σε σταγόνες. Έτσι η εκχύλιση γίνεται με πιο ήπιο τρόπο. Επιπλέον, ο διαλύτης καθώς διαπερνά το δείγμα και παίρνει μαζί του και τις βιοδραστικές ουσίες του καταλήγει σε ένα δοχείο εκτός του συστήματος εκχύλισης, αποφεύγοντας έτσι τη συνεχή επαφή με υψηλής θερμοκρασίας διαλύτη και κατ' επέκταση μειώνοντας τον κίνδυνο καταστροφής των φαινολικών ενώσεων. Στην 24ωρη εκχύλιση στερεού-υγρού αν και υπήρχε μεγάλος χρόνος εκχύλισης, αλληλεπίδρασης του διαλύτη με το δείγμα, δεν υπήρξε μεγάλη «ταλαιπωρία» στο δείγμα λαμβάνοντας υπόψιν την χαμηλή θερμοκρασία της εκχύλισης. Αντιθέτως, στην 20λεπτη εκχύλιση στερεού-υγρού φαίνεται η θερμοκρασία να μην έπαιξε σημαντικά αρνητικό ρόλο στη διατήρηση των φαινολικών ενώσεων, καθώς ο βρασμός δεν φαίνεται να προκάλεσε διάλυση αρκετών φαινολών ενώσεων.

Τέλος, κοιτώντας με μια πιο προσεκτική ματιά την μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους βλέπουμε πως παρόλο που κράτησε την θερμοκρασία πιο χαμηλή από τις υπόλοιπες μεθόδους κατάφερε και ταλαιπώρησε εξαιρετικά το δείγμα. Λόγω της μεθόδου των υπερήχων η οποία βασίζεται στην διαδικασία της σπηλαιώσης, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, μιας σειράς κύκλων συμπίεσης και διαστολής με αποτέλεσμα τελικά την διέλευση αυτών στο δείγμα, να ταλαιπώρησε το ήδη ταλαιπωρημένο δείγμα με αποτέλεσμα την πιθανή καταστροφή κάποιων φαινολικών ενώσεων. Ίσως βέβαια και η ισχύς των υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την πτυχιακή εργασία να ήταν αρκετά υψηλοί.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως για την μέγιστη ανάκτηση του συνολικού φαινολικού φορτίου από υπολείμματα καφέ εσπρέσο πρωταρχικό ρόλο έχει ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει η εκχύλιση, ο οποίος θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό λιγότερο παρεμβατικός. Για να επιτευχθεί αυτό καλό είναι η διάρκεια της εκχύλισης να είναι σχετικά σύντομη, όπως ένα διάστημα 20 λεπτών, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης να μην ασκούνται βίαιες προς το δείγμα μέθοδοι όπως η υψηλή συχνότητα υπερήχων και ο υψηλός χρόνος εκχύλισης. Όσον αφορά τη θερμοκρασία διεξαγωγής της εκχύλισης φαίνεται πως θερμοκρασίες που κυμαίνονται

γύρω στους 65°C να είναι περισσότερο ωφέλιμες. Ωστόσο, όταν κατά την διάρκεια της εκχύλισης εφαρμοστεί μια υψηλότερη θερμοκρασία όπως αυτή του βρασμού φαίνεται πως αυτή δεν επηρεάζει αρνητικά την εκχύλιση όταν αυτή ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και μάλιστα σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής εργασίας φαίνεται πως συνδέεται με θετικά αποτελέσματα, δηλαδή με ανάκτηση περισσότερων ολικών φαινολικών ενώσεων. Επομένως, μια μέθοδος εκχύλισης όπως αυτή της 20λεπτης εκχύλισης στερεού-υγρού με βρασμό και ανάδευση ή της Τροποποιημένης Soxhlet φαίνεται να είναι η καταλληλότερη επιλογή για την ανάκτηση του συνολικού φαινολικού φορτίου στα υπολείμματα του καφέ εσπρέσο. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί συγκρίνονται οι μέθοδοι εκχύλισης με βάση τις συνθήκες στις οποίες διεξήχθησαν, το στερεό-λυοφιλιώμενο εκχύλισμα και η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος.

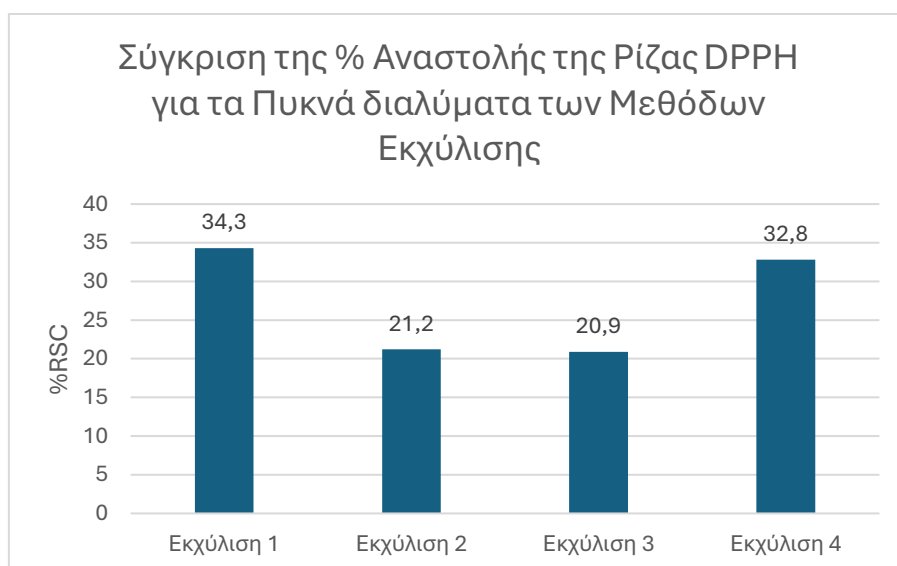
Πίνακας 2. Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης σε σχέση με τις συνθήκες εκχύλισης, την σκόνη εκχυλίσματος που ανακτήθηκε και την απορρόφηση

Μέθοδος Εκχύλισης	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Θερμοκρασία Εκχύλισης (°C)	Στερεό-Λυοφιλιώμενο Εκχύλισμα που ανακτήθηκε σε g	Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος (mg GAE/ml)
Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους – Ultrasound Assisted Method	20	46,6	1,3	76,6463
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction 20min συνεχή ανάδευση και βρασμός	20	95	0,8	89,892
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction Τροποποιημένη Soxhlet	20	65	0,8	79,8043
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction	1440	65	0,6	64,9793

24h συνεχή ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία				
---	--	--	--	--

Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (οι απορροφήσεις των εκχυλισμάτων με DPPH και χωρίς DPPH φαίνεται στους Πίνακες 10, 11, 12 και 13) έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα από την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Συγκεκριμένα, βλέπουμε πως η 20λεπτη εκχύλιση Στερεού-Υγρού που σε ολικές φαινολικές ενώσεις ήταν πρώτη όταν αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική της ικανότητα αυτή ήταν η δεύτερη λιγότερη αποδοτική μέθοδος για την αναστολή της ρίζας DPPH. Αντιθέτως, η εκχύλιση των υπερήχων και η 24ωρη εκχύλιση που είχαν το λιγότερο συνολικό φαινολικό φορτίο, είχαν τις καλύτερες αποδόσεις για την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH, δηλαδή την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, η μέθοδος της Τροποποιημένης Soxhlet φαίνεται πως είχε την λιγότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από όλες τις εκχυλίσεις.

Σε μια προσπάθεια να συσχετίσουμε την ποσότητα στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος και την αντιοξειδωτική ικανότητα θα μπορούσαμε να πούμε πως συσχετίζονται λόγω ότι η εκχύλιση με υπερήχους είχε την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και την μεγαλύτερη ανάκτηση στερεού-λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος. Όμως, αυτό δεν μπορεί να ισχυριστεί καθώς η εκχύλιση στερεού-υγρού για 24ώρες που είχε την μικρότερη ανάκτηση στερεού-υγρού λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος είχε την δεύτερη πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (32,8%) και μάλιστα με ελάχιστη διαφορά από την πρώτη (34,3%), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.



Σχήμα 4. Σύγκριση Ποσοστών Εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH των τεσσάρων εκχυλίσεων για πυκνά διαλύματα

Όσον αφορά τον χρόνο βλέπουμε πως και αυτός δεν μπορεί να συσχετιστεί κάπως λόγω του ότι η πρώτη σε αντιοξειδωτική ικανότητα εκχύλιση και η δεύτερη, που έχουν διαφορά μόνο 1,5 μονάδες, έχουν μεγάλη διαφορά. Συγκεκριμένα η πρώτη σε αντιοξειδωτική ικανότητα εκχύλιση αυτή των υπερήχων ολοκληρώθηκε σε 20 λεπτά, ενώ η δεύτερη δηλαδή η 24ωρη εκχύλιση στερεού-υγρού ολοκληρώθηκε έπειτα από 24 ώρες.

Η θερμοκρασία ίσως θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς η χαμηλότερη θερμοκρασία (46,6⁰C) έδωσε και την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μάλιστα, όσο η θερμοκρασία της εκχύλισης αυξανόταν η αντιοξειδωτική ικανότητα μειωνόταν. Όμως, στην τροποποιημένη εκχύλιση Soxhlet που η θερμοκρασία δεν ήταν η υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα της εκχύλισης αυτής ήταν η μικρότερη.

Επομένως, φαίνεται πως για την αντιοξειδωτική ικανότητα κύριο ρόλο έχει η θερμοκρασία στην οποία το δείγμα θα εκχυλιστεί. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH μπορούμε να πούμε πως η εφαρμογή ήπιων θερμοκρασιών βοηθά την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων.

Κοιτώντας τις μεθόδους εκχύλισης και τις παραμέτρους τους συνολικά είναι εμφανές πως η θερμοκρασία και ο χρόνος παίζουν ξεχωριστό και εξίσου σημαντικό ρόλο τροποποιώντας διαφορετικά χαρακτηριστικά στα εκχυλίσματα, όπως φαίνεται συγκριτικά στον Πίνακα 3. Είναι λοιπόν αναγκαίο να βρεθεί η κατάλληλη αναλογία του χρόνου και της θερμοκρασίας που θα εφαρμοστεί στις εκχυλίσεις ώστε να επιτευχθεί και η μέγιστη απόδοση από τις μεθόδους εκχύλισης.

Πίνακας 3 Σύγκριση Μεθόδων Εκχύλισης ως προς τον Χρόνο, τη Θερμοκρασία, το Στερεό-Λυοφιλιώμενο Εκχύλισμα, τα Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος και την % Αναστολή της ρίζας DPPH για τα πυκνά διαλύματα

Μέθοδος Εκχύλισης	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Θερμοκρασία Εκχύλισης (°C)	Στερεό-Λυοφιλιώμενο Εκχύλισμα που ανακτήθηκε (g)	Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος (mg GAE/ml)	%RSC για τα Πυκνά Διαλύματα
Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους – Ultrasound Assisted Method	20	46,6	1,3	76,6463	34,3
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction 20min συνεχή ανάδευση και βρασμός	20	95	0,8	89,892	21,1
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction Τροποποιημένη Soxhlet	20	65	0,8	79,8043	20,9
Εκχύλιση Στερεού-Υγρού – Solid Liquid Extraction 24h συνεχή ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία	1440	65	0,6	64,9793	32,8

Συμπερασματικά, ο καφές αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα ποτά στην παγκόσμια αγορά με μεγάλο περιβαλλοντικό αποτύπωμα καθώς αφήνει πίσω του μια μεγάλη ποσότητα υπολειμμάτων (Hernández-Varela & Medina, 2023) τα οποία συνήθως καταλήγουν να απορρίπτονται στο περιβάλλον είτε μέσω του συστήματος ύδρευσης είτε μέσω των χωματερών, βάζοντας σε κίνδυνο την ευημερία του περιβάλλοντος και τελικά του ανθρώπου. (Fernandes κ.ά., 2017) Ο όγκος αυτός των υπολειμμάτων του καφέ, όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από μια πλούσια οργανική περιεκτικότητα κυρίως με την μορφή φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις είναι τοξικές για τη φύση και επομένως προκαλούν μόλυνση του περιβάλλοντος. Είναι λοιπόν, αναγκαίο τα υπολείμματα του καφέ να υφίστανται μια επεξεργασία η οποία θα «καθαρίζει» τα υπολείμματα από τις ουσίες αυτές με σκοπό την μείωση

του περιβαλλοντικού αποτυπώματος (Afriliana κ.ά., 2020). Μέχρι στιγμής, τα υπολείμματα του καφέ αξιοποιούνται ως βιοκαύσιμο, κομπόστ, αλλά και ως συστατικό σε προϊόντα καλλωπισμού.(Afriliana κ.ά., 2020; de Mello κ.ά., 2023; Hernández-Varela & Medina, 2023) Ωστόσο, τα υπολείμματα του καφέ δεν έχουν ακόμη αξιοποιηθεί για τον εμπλουτισμό υπαρχόντων τροφίμων ή για τη δημιουργία νέων προϊόντων στη βιομηχανία των τροφίμων ως συστατικό που θα μπορούσε να προσδώσει γεύση, άρωμα ακόμη βιοδραστικές ενώσεις.

Τα υπολείμματα του καφέ εσπρέσο αποτελούν μια πηγή πλούσια σε υδατοδιαλυτές βιοδραστικές ουσίες, όπως το χλωρογενικό οξύ και η καφεΐνη, λόγω της μειωμένης απόδοσης της εκχύλισης κατά την διάρκεια της παρασκευής του ροφήματος του καφέ εσπρέσο (Cruz κ.ά., 2012). Οι φαινολικές ενώσεις των υπολειμμάτων του καφέ εσπρέσο είναι κυρίως το χλωρογενικό οξύ και τα διτερπένια kahweol και cafestol.(Barrea κ.ά., 2023)

Στην πτυχιακή αυτή μελέτησαμε τέσσερεις τρόπους εκχύλισης χρησιμοποιώντας έναν πράσινο διαλύτη, το νερό, για να δούμε ποια από τις μεθόδους εκχύλισης είναι η πιο αποδοτική όσον αφορά την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων, την αντιοξειδωτική ικανότητα, την στερεή σκόνη εκχυλίσματος καθώς και την ένταση του χρώματος και την οξύτητα.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνεται πως η εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους δίνει εκχύλισμα με πιο αλκαλικό pH, ενώ η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες δίνει πιο όξινο εκχύλισμα. Όσον αφορά την ένταση του χρώματος φαίνεται πως η εκχύλιση της Τροποποιημένης Soxhlet είναι αυτή που δίνει εντονότερο χρώμα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Την λιγότερη ένταση του χρώματος φαίνεται να δίνει η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες.

Με την μέθοδο Folin-Ciocalteu συγκρίναμε την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων σε κάθε μέθοδο. Φάνηκε πως η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 20λεπτά ότι ήταν η καταλληλότερη μέθοδος εκχύλισης για ανάκτηση φαινολικών ενώσεως από τα υπολείμματα του καφέ εσπρέσο. Ενώ, η εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες έδειξε πως ήταν η λιγότερο κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων.

Τέλος, όταν συγκρίναμε τις μεθόδους με βάση την αντιοξειδωτική τους ικανότητα η εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους έδειξε πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα με μικρές διαφορές από την εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24ώρες. Η μέθοδος εκχύλισης Τροποποιημένη Soxhlet φάνηκε να έχει την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα με κάποια διαφορά από τις άλλες τρεις μεθόδους.

4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 4. Παρασκευή Μητρικών Διαλυμάτων

	1:100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό
Εκχύλισμα	10 μl	20 μl	50 μl	100 μl	1000 μl
Νερό	990 μl	980 μl	950 μl	900 μl	-
V_{τελικό}	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 5. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	1:10	1:20	1:50	1:100	Πυκνό
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	1000μl
Νερό	1000 μl	850 μl	850 μl	850 μl	850 μl	850 μl	-
DPPH	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	-
V_{τελικό}	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 6. Τιμές pH προ εκχύλισης και ανά Μέθοδο Εκχύλισης

	pH ανά Μέθοδο Εκχύλιση				
Μέτρηση	Προ Εκχύλισης	Εκχύλιση I	Εκχύλιση II	Εκχύλιση III	Εκχύλιση IV
1^η	5,9	5,8	5,6	5,5	5,1
2^η	5,9	5,7	5,6	5,5	5,1
3^η	5,9	5,7	5,6	5,5	5,0
Μέσος Όρος	5,9	5,73	5,6	5,5	5,06

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Λυοφιλοποίησης

Μέθοδος Εκχύλισης	Απόβαρο (g)	Τελικό Βάρος (g)	ml Εκχυλίσματος	Στερεό-Λυοφιλιωμένο Εκχυλίσμα (g)
I	24	25,3	100	1,3
II	24	24,8	100	0,8
III	22,8	23,6	100	0,8
IV	24	24,6	100	0,6

I: Εκχύλιση με Υπερήχους

II: Εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 20min

III: Εκχύλιση Στερεού-Υγρού Τροποποιημένη Soxhlet

IV: Εκχύλιση Στερεού-Υγρού για 24h

Απόβαρο: Βάρος τρυβλίων petri σε γραμμάρια

Τελικό Βάρος: Βάρος τρυβλίων petri και Εκχυλίσματος μετά από λυοφυλίωση σε γραμμάρια

Σκόνη Εκχυλίσματος: Καθαρό βάρος της Σκόνης εκχυλίσματος σε γραμμάρια

Πίνακας 8. Απορρόφηση στα 740nm για το Τυφλό, για το Προ Εκχύλισης και για τις τέσσερις Μεθόδους Εκχύλισης για τις τρεις μετρήσεις και ο Μέσος Όρος τους

	Απορρόφηση στα 740nm					
Μέτρηση	Τυφλό	Προ Εκχύλισης	Εκχύλιση I	Εκχύλιση II	Εκχύλιση III	Εκχύλιση IV
1 ^η	0,088	0,572	0,846	1,131	0,995	0,726
2 ^η	0,090	0,618	0,837	0,909	0,770	0,747
3 ^η	0,096	0,608	0,920	1,016	0,946	0,731
Μέσος Όρος	0,091	0,599	0,867	1,018	0,903	0,734

Πίνακας 9. Συγκέντρωση Ισοδυνάμων Γαλλικού Οξέος για κάθε μέθοδο εκχύλισης

Ισοδύναμα Γαλλικού Οξέος (mg GAE/ml)						
	Blank	ΠροΕκ	Εκχ1	Εκχ2	Εκχ3	Εκχ4
Μετρηση 1	8,254	50,711	74,746	99,746	87,816	64,219
Μετρηση 2	8,430	54,746	73,956	80,272	68,079	66,061
Μετρηση 3	8,956	53,868	81,237	89,658	83,518	64,658
Μέσος Όρος	8,547	53,1083	76,6463	89,892	79,8043	64,9793

Πίνακας 10. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης

1

Εκχύλιση 1							
Με DPPH							
	Τυφλό	Control	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό
Abs1	0,104	0,320	0,303	0,314	0,310	0,314	0,427
Abs2	0,095	0,350	0,329	0,302	0,258	0,317	0,457
Abs3	0,108	0,349	0,321	0,302	0,299	0,322	0,441
M.O.	0,102	0,340	0,318	0,306	0,289	0,318	0,442
ΧΩΡΙΣ DPPH							
	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό		
Abs1	0,105	0,096	0,121	0,136	0,287		
Abs2	0,105	0,096	0,121	0,147	0,315		
Abs3	0,111	0,104	0,126	0,153	0,361		
M.O.	0,107	0,099	0,123	0,145	0,321		

Πίνακας 11. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης
2

Εκχύλιση 2							
Με DPPH							
	Τυφλό	Control	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό
Abs1	0,112	0,701	0,584	0,577	0,627	0,629	0,758
Abs2	0,111	0,733	0,582	0,564	0,679	0,690	0,782
Abs3	0,110	0,730	0,501	0,634	0,660	0,623	0,753
M.O.	0,111	0,721	0,556	0,592	0,655	0,647	0,764
ΧΩΡΙΣ DPPH							
	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό		
Abs1	0,128	0,128	0,125	0,137	0,309		
Abs2	0,129	0,125	0,126	0,146	0,308		
Abs3	0,125	0,125	0,123	0,138	0,303		
M.O.	0,1273	0,126	0,1247	0,1403	0,3067		

Πίνακας 12. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης
3

Εκχύλιση 3							
Με DPPH							
	Τυφλό	Control	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό
Abs1	0,226	0,997	0,932	0,900	0,905	0,932	0,872
Abs2	0,219	1,007	0,930	0,954	0,938	0,864	0,923
Abs3	0,232	1,017	0,883	0,907	0,881	0,821	0,969
M.O.	0,226	1,007	0,915	0,920	0,908	0,872	0,921
ΧΩΡΙΣ DPPH							
	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό		
Abs1	0,252	0,244	0,245	0,252	0,343		
Abs2	0,247	0,245	0,243	0,253	0,351		
Abs3	0,246	0,242	0,245	0,245	0,358		
M.O.	0,248	0,244	0,244	0,250	0,351		

Πίνακας 13. Απορροφήσεις με την προσθήκη αντιδραστηρίου DPPH για την μέθοδο Εκχύλισης 4

Εκχύλιση 4							
Με DPPH							
	Τυφλό	Control	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό
Abs1	0,251	0,998	0,843	0,919	0,868	0,819	0,670
Abs2	0,255	1,052	0,908	0,933	0,903	0,808	0,764
Abs3	0,252	1,049	0,928	0,938	0,899	0,871	0,723
M.O.	0,253	1,033	0,893	0,930	0,890	0,833	0,719
ΧΩΡΙΣ DPPH							
	1/100	1:50	1:20	1:10	Πυκνό		
Abs1	0,229	0,231	0,238	0,234	0,277		
Abs2	0,230	0,226	0,227	0,233	0,277		
Abs3	0,231	0,227	0,217	0,231	0,277		
M.O.	0,230	0,228	0,227	0,233	0,277		

Πίνακας 14. % Αναστολή της ρίζας DPPH για κάθε αραίωση των εκχυλισμάτων

%RSC				
	Εκχύλιση 1	Εκχύλιση 2	Εκχύλιση 3	Εκχύλιση 4
1/100	7,9	25,2	11,4	11,4
1:50	8,8	20,1	10,4	7,6
1:20	20,9	11	11,7	11,4
1:10	19,1	14,3	15,8	17,5
Πυκνό	34,3	21,2	20,9	32,8

Βιβλιογραφία

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Afriliana, A., Hidayat, E., Mitoma, Y., Masuda, T., & Harada, H. (2020). Studies on Composting Spent Coffee Grounds by *Aspergillus* sp and *Aspergillus* sp in Aerobic Static Batch Temperature Control. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.4236/jacen.2021.101007>
- Barrea, L., Pugliese, G., Frias-Toral, E., El Ghoch, M., Castellucci, B., Chapela, S. P., Carignano, M. de los A., Laudisio, D., Savastano, S., Colao, A., & Muscogiuri, G. (2023). Coffee consumption, health benefits and side effects: A narrative review and update for dietitians and nutritionists. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(9), 1238–1261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963207>
- Blainski, A., Lopes, G., & De Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Bouhzam, I., Cantero, R., Margallo, M., Aldaco, R., Bala, A., Fullana-i-Palmer, P., & Puig, R. (2023). Extraction of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds Using Ethanol and Acetone Aqueous Solutions. *Foods*, 12(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/foods12244400>
- Butt, M. S., & Sultan, M. T. (2011). Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 363–373. <https://doi.org/10.1080/10408390903586412>
- Caprioli, G., Cortese, M., Sagratini, G., & Vittori, S. (2015). The influence of different types of preparation (espresso and brew) on coffee aroma and main bioactive constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5), 505–513. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1064871>
- Chieng, D., & Kistler, P. M. (2022). Coffee and tea on cardiovascular disease (CVD) prevention. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 32(7), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2021.08.004>
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., & Casal, S. (2012). Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7777–7784. <https://doi.org/10.1021/jf3018854>
- de Mello, V., de Mesquita Júnior, G. A., Alvim, J. G. E., Costa, J. de C. da, & Vilela, F. M. P. (2023). Recent patent applications for coffee and coffee by-products as active ingredients in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 45(3), 267–287. <https://doi.org/10.1111/ics.12843>
- Fernandes, A. S., Mello, F. V. C., Thode Filho, S., Carpes, R. M., Honório, J. G., Marques, M. R. C., Felzenszwalb, I., & Ferraz, E. R. A. (2017). Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.011>

- Fredholm, B. B. (2011). *Methylxanthines* (τ. 200). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2>
- Fröhling, M., & Hiete, M. (Επιμ.). (2020). *Sustainability and Life Cycle Assessment in Industrial Biotechnology* (τ. 173). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-47066-1>
- Gichuru, E., Alwora, G., Gimase, J., & Kathurima, C. (2021). Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) in Kenya—A Review. *Agronomy*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122590>
- Gökçen, B. B., & Şanlıer, N. (2019). Coffee consumption and disease correlations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(2), 336–348. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1369391>
- Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., & Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annual Review of Nutrition*, 37(1), 131–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064941>
- Hansen, F. A., & Pedersen-Bjergaard, S. (2020). Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, 92(1), 2–15. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04677>
- Hernández-Varela, J. D., & Medina, D. I. (2023). Revalorization of Coffee Residues: Advances in the Development of Eco-Friendly Biobased Potential Food Packaging. *Polymers*, 15(13), 2823. <https://doi.org/10.3390/polym15132823>
- Huang, X., Li, D., & Wang, L. (2018). Effect of particle size of sugar beet pulp on the extraction and property of pectin. *Journal of Food Engineering*, 218, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.001>
- Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (1991). COFFEE. Στο *Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507020/>
- Ivanović, M., Islamčević Razboršek, M., & Kolar, M. (2020). Innovative Extraction Techniques Using Deep Eutectic Solvents and Analytical Methods for the Isolation and Characterization of Natural Bioactive Compounds from Plant Material. *Plants*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/plants9111428>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Ludwig, I. A., Clifford, M. N., Lean, M. E. J., Ashihara, H., & Crozier, A. (2014). Coffee: Biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.*, 5(8), 1695–1717. <https://doi.org/10.1039/C4FO00042K>
- Muñoz-Pajares, A. J., Várzea, V., & Silva, M. D. C. (2023). The story of coffee: Legend and truth. *Trends in Plant Science*, 28(5), 501–504. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.02.012>
- 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*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/foods8070245>

- Oliveira, G., Passos, C. P., Ferreira, P., Coimbra, M. A., & Gonçalves, I. (2021). Coffee By-Products and Their Suitability for Developing Active Food Packaging Materials. *Foods*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods10030683>
- Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105021. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105021>
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Frontiers in Nutrition*, 7, 60. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00060>
- Park, Y., Cho, H., & Myung, S.-K. (2023). Effect of Coffee Consumption on Risk of Coronary Heart Disease in a Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *The American Journal of Cardiology*, 186, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2022.10.010>
- Pauwels, E. K. J., & Volterrani, D. (2021). Coffee Consumption and Cancer Risk: An Assessment of the Health Implications Based on Recent Knowledge. *Medical Principles and Practice*, 30(5), 401–411. <https://doi.org/10.1159/000516067>
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Raynie, D. E. (2006). Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry*, 78(12), 3997–4004. <https://doi.org/10.1021/ac060641y>
- Safe, S., Kothari, J., Hailemariam, A., Upadhyay, S., Davidson, L. A., & Chapkin, R. S. (2023). Health Benefits of Coffee Consumption for Cancer and Other Diseases and Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2706. <https://doi.org/10.3390/ijms24032706>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Solomakou, N., Loukri, A., Tsafrakidou, P., Michaelidou, A.-M., Mourtzinou, I., & Goula, A. M. (2022). Recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds through optimized extraction processes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 25, 100592. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100592>
- Sridhar, A., Vaishampayan, V., Senthil Kumar, P., Ponnuchamy, M., & Kapoor, A. (2022). Extraction techniques in food industry: Insights into process parameters and their optimization. *Food and Chemical Toxicology*, 166, 113207. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113207>
- Yoo, D. E., Jeong, K. M., Han, S. Y., Kim, E. M., Jin, Y., & Lee, J. (2018). Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds. *Food Chemistry*, 255, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.096>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

