ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ &ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΝΕΡΓΟ ΚΑΙ ΕΔΩΔΙΜΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

ΓΑΝΙΑΡΗ ΣΟΦΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ &ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΝΕΡΓΟ ΚΑΙ ΕΔΩΔΙΜΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

ΓΑΝΙΑΡΗ ΣΟΦΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η επίβλεψη του θέματος έγινε από την καθηγήτρια κα. Β. Ωραιοπούλου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Β. Ωραιοπούλου για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για τις συμβουλές και τη συστηματική καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα κ. Δ. Τσιμογιάννη και την υποψήφια διδάκτορα Ε. Χουλιτούδη για το ενδιαφέρον και τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για τη βοήθεια που προσέφεραν όποτε την χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εδώδιμη επικαλυπτική μεμβράνη για την προστασία τροφίμων. Ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο) της οικογένειας *Lamiaceae*, ώστε να κριθεί η αποτελεσματικότητά του τόσο στην τεχνολογία των επικαλυπτικών, όσο και στην αλληλεπίδρασή του με τα τρόφιμα. Τα αντιοξειδωτικά κλάσματα του δενδρολίβανου, αφότου αναλύθηκαν, ενσωματώθηκαν σε ιχθυρά μέσω της εφαρμογής εδώδιμων επικαλυπτικών μεμβρανών. Εκτός από τις δοκιμές με τα ιχθυρά, έγινε μία προσπάθεια παρασκευής προσομοιωτή τροφίμου και μελέτης της οξειδωτικής του πορείας χωρίς επικάλυψη.

Αρχικά, συλλέχθηκε δενδρολίβανο από την Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου και, έπειτα από ξήρανσή του, έγινε η παραλαβή του αιθέριου ελαίου του με υδροατμοαπόσταξη. Στη συνέχεια, το απελαιωμένο δενδρολίβανο κονιοποιήθηκε και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις, σε συσκευή υπερήχων με διαλύτη την αιθανόλη. Έγιναν δοκιμές εκχύλισης ως προς το χρόνο και ως προς τη θέση των φιαλών στο λουτρό υπερήχων για να εντοπισθούν τυχόν διαφορές, όμως δεν μπόρεσε να εξαχθεί κάποιο γενικό συμπέρασμα για το πώς αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την εκχύλιση. Ο χρόνος εκχύλισης που επιλέχθηκε τελικά ήταν τα 60 min. Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις για παραλαβή ικανής ποσότητας εκχυλίσματος, το οποίο αποχρωματίστηκε για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως φυσικό αντιοξειδωτικό στις επικαλυπτικές μεμβράνες. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εξαντλητικές εκχυλίσεις Soxhlet για προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών συστατικών της φυτόμαζας και σύγκριση της δράσης των εκχυλισμάτων με αυτά από τη συσκευή υπερήχων. Η σύγκριση των κλασμάτων έγινε ως προς την περιεκτικότητά τους σε στερεά συστατικά, ολικές φαινόλες και ικανότητα δέσμευση ελευθέρων ριζών. Επίσης έγινε ανάλυση των εκχυλισμάτων με την μέθοδο HPLC, όπου μετά από παραλαβή χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του ροσμαρινικού οξέος.

Τα εκχυλίσματα από συσκευή Soxhlet που παρασκευάστηκαν ήταν τρία: ένα αιθανολικό εκχύλισμα, ένα εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα και ένα αιθανολικό εκχύλισμα έπειτα από την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η σύγκριση των κλασμάτων μεταξύ τους αλλά και με το αιθανολικό εκχύλισμα από υπέρηχους έδειξε ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα από Soxhlet είχαν τη μεγαλύτερη απόδοση τόσο σε ολικά φαινολικά, όσο και σε ικανότητα δέσμευσης ριζών και σε εκχυλισθέντα στερεά συστατικά. Τις χαμηλότερες αποδόσεις παρουσίασε το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα μαζί με το εκχύλισμα από υπερήχους. Οι υπέρηχοι, όμως, αποτελούν μία μέθοδο φιλική προς το περιβάλλον και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούν είναι πολύ χαμηλότερες από αυτές που χρησιμοποιεί η Soxhlet.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση των εκχυλισμάτων κατά την προσθήκη τους σε εδώδιμες μεμβράνες για την επικάλυψη ιχθυρών. Επίσης, διερευνήθηκε η καταλληλότητα του αιθέριου ελαίου του *Rosmarinus officinalis* καθώς τα κλάσματα

αυτά των αρωματικών φυτών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης. Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής ωστόσο διερευνήθηκε η πιθανή παρεμπόδιση της οξείδωσης σε δείγματα στα οποία είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο στο επικαλυπτικό. Τα εκχυλίσματα ενσωματώθηκαν σε επικαλυπτικά διαλύματα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC). Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν εφτά σειρές δειγμάτων. Η πρώτη σειρά δεν είχε καμία επικάλυψη, ενώ η δεύτερη επικαλύφθηκε με μη εμπλουτισμένη με κάποιο αντιοξειδωτικό μεμβράνη CMC. Οι επόμενες τρεις σειρές δειγμάτων επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανολικού εκχυλίσματος δενδρολίβανου, 200, 500 και 800 ppm αντίστοιχα. Η έκτη σειρά δειγμάτων εμπλουτίστηκε με αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε περιεκτικότητα 2000 ppm ενώ η έβδομη και τελευταία σειρά επικαλύφθηκε με CMC εμπλουτισμένο με συνδυασμό αιθέριου ελαίου 2000 ppm και αιθανολικού εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 200 ppm. Από τις εφτά σειρές δειγμάτων, διπλά δείγματα αποθηκεύτηκαν σε δυο θερμοκρασίες, στους 4ºC και στους 10ºC. Δείγματα λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έπειτα από παραλαβή του ιχθυελαίου γινόταν μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων, των συζυγών διενίων και του αριθμού π-ανισιδίνης δηλαδή των πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Τα αποτελέσματα για τα δείγματα στους 4ºC έδειξαν πως η μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC παρείχε μία οριακή προστασία στο προϊόν. Παρόμοια πορεία οξείδωσης παρουσίασαν τα δείγματα με επικάλυψη CMC εμπλουτισμένη με 200 ppm αιθανολικού εκχυλίσματος και αυτά που είχαν εμπλουτιστεί μόνο με αιθέριο έλαιο. Αρκετά ικανοποιητικά προστατεύθηκαν από την οξείδωση τα δείγματα που η επικάλυψή τους περιείχε αντιοξειδωτικό σε συγκέντρωση 500 ppm και αυτά με συνδυασμό αιθέριου ελαίου και 200 ppm εκχυλίσματος στην επικαλυπτική μεμβράνηενώ την καλύτερη αντιοξειδωτική προστασία πρόσφεραν τα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (800 ppm). Στους 10ºC παρατηρήθηκε πολύ γρήγορα μικροβιακή αλλοίωση των δειγμάτων και τα πειράματα διακόπηκαν νωρίς χωρίς να εξαχθεί κάποιο γενικό συμπέρασμα.

Σε άλλο ένα πείραμα έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός προσομοιωτή τροφίμου πάνω στον οποίο να μπορούν να πραγματοποιηθούν μελέτες για την πορεία οξείδωσής του με ή χωρίς επικαλυπτικό. Παρασκευάστηκε ζυμάρι από αλεύρι, φοινικέλαιο και νερό, το οποίο χωρίστηκε σε δείγματα των 35±5 g. Τα μισά δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 10ºC και τα υπόλοιπα στους 40ºC, όλα χωρίς επικάλυψη. Στη συνέχεια μελετήθηκε η πορεία οξείδωσης της ζύμης, μετά από παραλαβή του ελαίου από τα αποθηκευμένα δείγματα. Λήφθηκαν, δηλαδή δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έγινε προσδιορισμός των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης μέσω του αριθμού υπεροξειδίων και των συζυγών διενίων, ενώ ο προσδιορισμός των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης έγινε με τον αριθμό π-ανισιδίνης. Τα αποτελέσματα δεν μπόρεσαν να οδηγήσουν σε εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος καθώς τα δείγματα ζύμης που βρίσκονταν στους 10ºC μετά τις 41 ημέρες είχαν χαλάσει εμφανώς μικροβιολογικά επομένως απορρίφθηκαν και δεν εξετάστηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όσο δηλαδή διήρκεσε το πείραμα των 40ºC, ενώ η οξείδωση δεν παρουσίασε μεγάλες διαφορές για τις δύο θερμοκρασίες. Σε μελλοντικό πείραμα, ίσως θα έπρεπε να προτιμηθούν διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, και ιδιαίτερα παρασκευής άλλων προσομοιωτών τροφίμων για παρακολούθηση της οξείδωσης.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ……………………………………………...……………………..15

1. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ…………………………………...17

1.1 Λιπίδια………………………………………………………………17

1.2 Οξείδωση λιπιδίων…………………...20

1.3 Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων…………………………………………....22

1.4 Μέθοδοι μέτρησης και υπολογισμού των προϊόντων οξείδωσης…………...25

2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ………………………………………………………..29

2.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών……………………………………………….29

2.1.1 Πρωτογενή αντιοξειδωτικά (chain-breakingantioxidants)……………….29

2.1.2 Δευτερογενή αντιοξειδωτικά (preventiveantioxidants)…………………..30

2.1.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά………………………………………………...31

2.1.4 Φυσικά αντιοξειδωτικά…………………………………………………...33

2.1.4.1 Φαινολικές ενώσεις………………………………………………………..33

2.1.4.2 Καροτενοειδή……………………………………………………………...36

2.2 Αρωματικά φυτά ως πηγές αντιοξειδωτικών..……………………………...38

2.2.1 Ρίγανη (*Origanum vulgare*)……………………………………………….39

2.2.2 Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)………………………………………………...39

2.2.3 Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)…………………………………..40

3. ΕΔΩΔΙΜΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΑΛΥΠΤΙΚΑ……………………...45

3.1 Εισαγωγή……………………………………………………………………45

3.2 Χρήση εδώδιμων μεμβρανών……………………………………………….46

3.3 Συστατικά εδώδιμων μεμβρανών…………………………………………...47

3.3.1 Επικαλυπτικά από πολυσακχαρίτες………………………………………48

3.3.1.1 Κυτταρίνη και παράγωγά της……………………………………….48

3.3.1.1.1 Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC)…………………………………...49

3.3.1.2 Χιτίνη και Χιτοζάνη………………………………………………………49

3.3.1.3 Καραγεννάνη……………………………………………………….....50

3.3.1.4 Πηκτίνη……………………………………………………………....50

3.3.1.5 Άμυλο………………………………………………………………...51

3.3.1.6 Άλατα αλγινικού οξέος…………………………………………....51

3.3.2 Επικαλυπτικά από Λιπίδια……………………………………………..51

3.3.2.1 Κηροί……………………………………………………………....52

3.3.2.2 Ακετογλυκερίδια……………………………………………………..52

3.3.3 Επικαλυπτικά από πρωτεΐνες……………………………………………..52

3.3.3.1 Ζελατίνη……………………………………………………………...53

3.3.3.2 Ζεΐνη καλαμποκιού…………………………………………………..53

3.3.3.3 Γλουτένη σιταριού………………………………………………....54

3.3.3.4 Πρωτεΐνη σόγιας……………………………………………………..54

3.3.3.5 Πρωτεΐνη γάλακτος…………………………………………………..54

3.3.4 Συνθετικά επικαλυπτικά………………………………………………..55

3.4 Ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε επικαλυπτικά και μεμβράνες…55

3.4.1 Εκχυλίσματα……………………………………………………………55

3.4.2 Αιθέρια έλαια…………………………………………………………..56

3.5 Έρευνες και πειράματα με ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε επικαλυπτικά και μεμβράνες…………………………………………………………57

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ……………………………………………...73

4.1 Σχεδιασμός πειραμάτων…………………………………………………73

4.2 Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια……………………………………………...74

4.3 Συσκευές…………………………………………………………………75

4.4 Πειραματικές τεχνικές……………………………………………………75

4.4.1 Υδροατμοαπόσταξη……………………………………………………75

4.4.2 Παραλαβή αντιοξειδωτικών συστατικών με διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet..

……………………………………………………………………………..76

4.4.3 Παραλαβή αντιοξειδωτικών συστατικών με εκχύλιση με υπερήχους……77

4.4.4 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος…………………………………...77

4.4.5 Αποχρωματισμός αιθανολικού εκχυλίσματος από υπερήχους……………78

4.4.6 Παρασκευή προσομοιωτών……………………………………………….78

4.4.7 Παρασκευή διαλυμάτων επικάλυψης……………………………………..78

4.4.8 Ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών στα διαλύματα επικάλυψης……………...79

4.4.9 Επικάλυψη και αποθήκευση ιχθυρών……………………………………79

4.5 Αναλυτικές μέθοδοι…………………………………………………………82

4.5.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu………………………………………………....82

4.5.2 Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με ρίζα DPPH…………………..83

4.5.3 Παραλαβή ελαίου από τον προσομοιωτή τροφίμου……………………....83

4.5.4 Παραλαβή ελαίου από τα δείγματα ιχθυρών……………………………...83

4.5.5 Μέθοδος μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (P.V.)………………………..84

4.5.6 Μέθοδος μέτρησης αριθμού συζυγών διενίων-τριενίων (CD)…………....84

4.5.7 Μέθοδος μέτρησης αριθμού π-ανισιδίνης (p-AV)………………………..85

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ……………………………………….87

5.1 Ανάλυση εκχυλισμάτων δενδρολίβανου…………………………...........87

5.2 Απόδοση εκχυλίσεων σε λουτρό υπερήχων………………………………...88

5.3 Απόδοση εκχυλίσεων σε συσκευή Soxhlet…………………………………95

5.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC………………………………97

5.5 Παρασκευή εκχυλίσματος για χρήση ως φυσικό αντιοξειδωτικό…………100

5.6 Αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος δενδρολίβανου κατά την προσθήκη του σε επικαλυπτικό CMC για την επικάλυψη ιχθυρών…………………………101

5.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων………………………………….111

5.8 Πορεία οξείδωσης προσομοιωτών τροφίμων……………………………...112

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ……………………………………115

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……………………………………………………………..117

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εξασφάλιση της ποιότητας των λιπαρών υλών κατά το χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση των τροφίμων αποτελεί ένα πολύ σοβαρό θέμα που αφορά τόσο τους καταναλωτές όσο και τις βιομηχανίες τροφίμων. Τα λιπίδια είναι σημαντικά δομικά και λειτουργικά συστατικά των τροφίμων. Στα τρόφιμα, τα λιπίδια έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα, ακόμα και αν συναντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες. Η αντίδραση του μοριακού οξυγόνου με οργανικά μόρια είναι μία διεργασία η οποία μελετάται εδώ και πολλά χρόνια και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Παρ' ότι ένας μεγάλος όγκος οργανικών μορίων είναι ευάλωτος σε αντιδράσεις με το οξυγόνο, μεγάλο μέρος της προσοχής των επιστημόνων έχει εστιαστεί στα λιπίδια εξαιτίας των συνεπειών της οξειδωτικής αντίδρασης. Στον τομέα των τροφίμων, η οξείδωση των λιπιδίων είναι η κύρια χημική δράση για την οποία το τρόφιμο υποβαθμίζεται, χάνοντας σε γεύση, άρωμα αλλά και σε θρεπτική αξία και ασφάλεια.

Ως αντιοξειδωτικό σε τρόφιμο μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία η οποία είναι ικανή να καθυστερήσει ή και να αποτρέψει τον ταγγισμό και την υποβάθμιση της γεύσης τροφίμου εξαιτίας της οξείδωσής του. Τα αντιοξειδωτικά καθυστερούν την ανάπτυξη άσχημων γεύσεων, επεκτείνοντας την περίοδο επώασης του τροφίμου. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών μετά το πέρας αυτής της περιόδου τείνει να είναι αναποτελεσματική σε ότι αφορά την καθυστέρηση ταγγισμού των τροφίμων. Μερικά από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως είναι: η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), η τεταρτοταγής βουτυλιωμένη υδροκινόνη (TBHQ) και εστέρες του γαλλικού οξέος (όπως ο προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος, PG). Ενώ χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια, τίθενται υπό αμφισβήτηση καθώς νέα τοξικολογικά δεδομένα έρχονται στο φως και εφιστούν την προσοχή σε ότι αφορά την χρήση τους ενώ και οι ίδιοι οι καταναλωτές απορρίπτουν προϊόντα στα οποία εμπεριέχονται τα συνθετικά αυτά αντιοξειδωτικά, θεωρώντας τα ως «χημικά». Δεδομένων αυτών, τα φυσικά αντιοξειδωτικά εμφανίζονται ως πιο υγιεινά και πιο ασφαλή από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά. Ορισμένα καρυκεύματα και αρωματικά φυτά περιέχουν ενώσεις που μπορούν να απομονωθούν και να προστεθούν σε τρόφιμα για να καθυστερήσουν την οξείδωση αυτών. Αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να αφαιρεθούν από τα αρωματικά φυτά και να συγκεντρωθούν σε μορφή εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων και ρητινών.

Εκτός από την επιλογή της άμεσης προσθήκης δραστικών ουσιών (π.χ. με ψεκασμό) στα τρόφιμα, έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες όπως είναι τα εδώδιμα επικαλυπτικά και οι μεμβράνες οι οποίες εμπλουτίζονται με αντιοξειδωτικές ουσίες και στη συνέχεια εφαρμόζονται σε τρόφιμα. Το CMC (καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη) είναι ένα παράγωγο της κυτταρίνης και σχηματίζεται από την αντίδρασή της με υδροξείδιο του νατρίου και χλωροοξικό οξύ. Η διαλυτότητά του στο νερό σε συνδυασμό με τη συμβατότητά του με άλλα μόρια, το καθιστά ιδανικό για σχηματισμό επικαλυπτικού. Από όλους τους πολυσακχαρίτες είναι το πιο εύκολα προσβάσιμο και το πιο φθηνό.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη και ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εδώδιμη επικαλυπτική μεμβράνη για την προστασία τροφίμων. Ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο) της οικογένειας *Lamiaceae*, ώστε να κριθεί η αποτελεσματικότητά του τόσο στην τεχνολογία των επικαλυπτικών, όσο και στην αλληλεπίδρασή του με τα τρόφιμα.

1. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ

1.1 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι σημαντικά δομικά και λειτουργικά συστατικά των τροφίμων. Στα τρόφιμα, τα λιπίδια έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα, ακόμα και αν βρίσκονται σε αυτά σε πολύ μικρές ποσότητες. Τα κύρια λιπίδια που συναντώνται στα τρόφιμα είναι τα τριγλυκερίδια τα οποία δε συνεισφέρουν μόνο στη γεύση, την οσμή, το χρώμα και την υφή, αλλά προσδίδουν και ένα αίσθημα κορεσμού και νοστιμιάς στα τρόφιμα (Frankel, 2012).

Τα λιπίδια αποτελούνται από δομικές μονάδες με έντονη υδροφοβικότητα. Αυτό το χαρακτηριστικό διαλυτότητας, και όχι κάποιο κοινό δομικό χαρακτηριστικό γνώρισμα, είναι μοναδικό για αυτή την κατηγορία ενώσεων. Τα λιπίδια είναι διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες όπως σε διαιθυλαιθέρα, πετρελαϊκό αιθέρα, χλωροφόρμιο και τετραχλωράνθρακα αλλά αδιάλυτα στο νερό. Η πλειονότητα των λιπιδίων είναι παράγωγα των λιπαρών οξέων. Σε αυτά τα αποκαλούμενα ακυλο-λιπίδια, τα λιπαρά οξέα είναι παρόντα ως εστέρες και σε μερικές δευτερεύουσες ομάδες λιπιδίων είναι με τη μορφή αμιδίων. Μία προσέγγιση που είναι γενικά αποδεκτή για την ταξινόμηση των λιπιδίων είναι η ακόλουθη:

I. Απλά λιπίδια (μη σαπωνοποιήσιμα): Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα ισοπρενοειδή λιπίδια (στερόλες, καροτενοειδή, μονοτερπένια) και οι τοκοφερόλες
II. Ακυλολιπίδια (σαπωνοποιήσιμα): Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα μονο-, δι- και τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια, τα λιπίδια διολών οι κηροί και οι εστέρες στερόλης (Belitz et al, 2009).

<u>Λιπαρά οξέα</u>

Αυτά τα αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα είναι απαραίτητα τμήματα των περισσότερων λιπιδίων των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων. Τα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Τα λιπαρά οξέα των κύριων φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών διακρίνονται σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα. Στο σχήμα 1.1 παρουσιάζονται τα βασικότερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα απαντώνται κυρίως ως εστέρες της γλυκερόλης (Frankel, 2012).

Στεατικό οξύ (18:0)

Ελαϊκό οξύ (18:1 n - 9)

Λινελαϊκό οξύ (18:2 n-6,9)

Λινολενικό οξύ (18:3 n-3,6,9)

Αραχιδονικό οξύ (20:4 n-6)

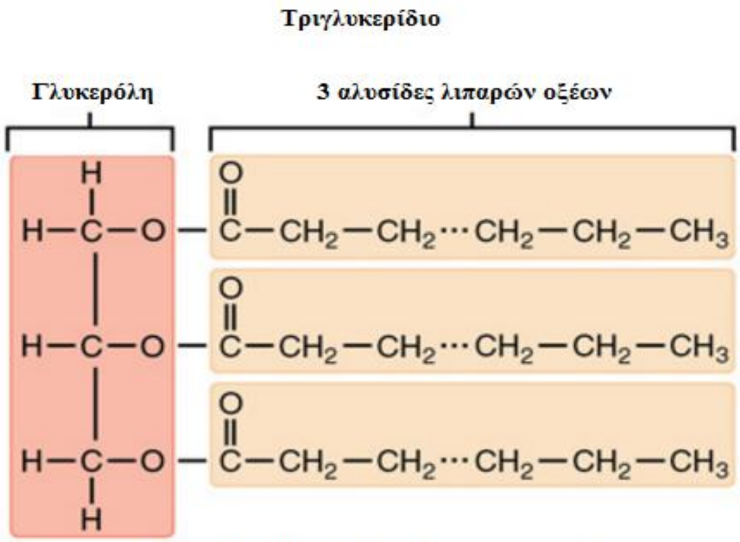
Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (20:5 n-3)

Δοκοσαεξανοϊκό οξύ (22:6 n-3)

Σχήμα 1.1 Δομή βασικών κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Τριγλυκερίδια

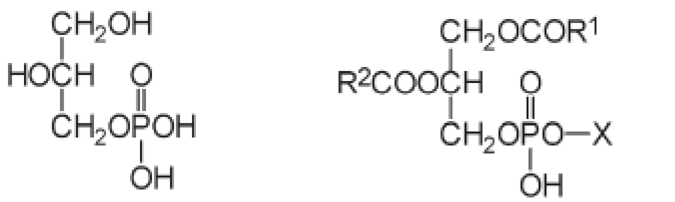
Τα τριγλυκερίδια είναι μία πολύ σημαντική κατηγορία λιπιδίων και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό (~99%) των φυτικών ελαίων και των λιπιδίων των τροφίμων (Frankel, 2012). Ως τριγλυκερίδια χαρακτηρίζονται οι εστέρες που περιέχουν ένα μόριο γλυκερόλης ενωμένο με τρία μόρια λιπαρών οξέων. Διακρίνονται σε απλά και μικτά τριγλυκερίδια. Στην πρώτη περίπτωση οι τρεις υδροξυλομάδες της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένες με το ίδιο λιπαρό οξύ, ενώ στη δεύτερη με διαφορετικά λιπαρά οξέα. Τα τριγλυκερίδια καλύπτουν μεγάλο μέρος των ενεργειακών αναγκών του ανθρώπου, παρέχοντας στον οργανισμό 9 kcal/g. Στην περίπτωση τριγλυκεριδίων με λιπαρά οξέα μέσου μήκους αλυσίδας (6-10 άτομα C), η θερμιδική αξία μειώνεται από 9 έως 7 kcal/g και στην περίπτωση ασύμμετρων τριγλυκεριδίων, μειώνεται σε 5kcal/g. Αυτά τα ειδικά τριγλυκερίδια που είναι διαθέσιμα συνθετικά, χαρακτηρίζονται ως υποκατάστατα λιπών (Belitz et al, 2009).



Σχήμα 1.2 Βασική δομή τριγλυκεριδίου

Φωσφολιπίδια

Είναι σημαντικά δομικά λιπίδια σε τρόφιμα και κυτταρικές μεμβράνες. βασίζονται στο φωσφατιδικό οξύ και είναι εστέρες του 3-γλυκεροφωσφορικού οξέος. Τα φωσφολιπίδια απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις στα ακατέργαστα φυτικά έλαια που προέρχονται είτε από εκχύλιση με διαλύτη, είτε από συμπίεση των ελαιοκαρπών (Frankel, 2012).



3-γλυκεροφωσφορικό οξύ **φωσφατιδικό οξύ (X=H)**

Σχήμα 1.3 Δομή γλυκεροφωσφορικού οξέος και φωσφατιδικού οξέος

Τα φωσφολιπίδια είναι ευαίσθητα στην αυτοξείδωση δεδομένου ότι περιέχουν λινελαϊκό οξύ σε αφθονία. Το άλλο οξύ που συνήθως απαντάται είναι το παλμιτικό οξύ. Τα φωσφολιπίδια είναι διαλυτά σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη και μερικώς διαλυτά σε ακετόνη. Μπορούν επίσης να υδρολυθούν σταδιακά από αλκοολικό KOH. Σε ήπιες συνθήκες διασπώνται μόνο τα λιπαρά οξέα, ενώ με ισχυρά αλκάλια, απελευθερώνεται η βασική μονάδα (Belitz et al, 2009).

1.2 Οξείδωση λιπιδίων

Η αντίδραση του μοριακού οξυγόνου με οργανικά μόρια είναι μία διεργασία η οποία μελετάται εδώ και πολλά χρόνια και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Παρ' ότι ένας μεγάλος όγκος οργανικών μορίων είναι ευάλωτος σε αντιδράσεις με το οξυγόνο, μεγάλο μέρος της προσοχής των επιστημόνων έχει εστιαστεί στα λιπίδια εξαιτίας των συνεπειών της οξειδωτικής αντίδρασης. Στον τομέα των τροφίμων, η οξείδωση των λιπιδίων είναι η κύρια χημική δράση για την οποία το τρόφιμο υποβαθμίζεται, χάνοντας σε γεύση, άρωμα αλλά και σε θρεπτική αξία και ασφάλεια.

Οξείδωση λιπιδίων μπορεί να συμβεί σε τρόφιμα που περιέχουν σημαντικές ποσότητες από λίπη, όπως το γάλα, προϊόντα κρέατος, έλαια αλλά επίσης και σε τρόφιμα που περιέχουν ελάχιστες ποσότητες λιπιδίων, όπως λαχανικά. Αλλαγές στο άρωμα προκύπτουν από το σχηματισμό νέων πτητικών ενώσεων, αλλαγές στη γεύση προκαλούνται από σχηματιζόμενα υδρόξυ-οξέα ενώ το χρώμα των τροφίμων σκουραίνει λόγω αντιδράσεων μεταξύ προϊόντων οξείδωσης και πρωτεϊνών. Είναι φυσικό, λοιπόν, τόσο η θρεπτική αξία όσο και η ασφάλεια του τροφίμου να επιβαρύνονται (Kanner et al, 1992).

Η αυτοξείδωση είναι αρκετά σύνθετη και περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό αλληλένδετων αντιδράσεων ενδιάμεσων προϊόντων. Η ταχύτητα αυτοξείδωσης επηρεάζεται από τη σύσταση του λιπαρού οξέος, το βαθμό ακορεστότητας, την παρουσία και τη δραστικότητα προ- και αντιοξειδωτικών, τη μερική πίεση του οξυγόνου, τη φύση της επιφάνειας που εκτίθεται στο οξυγόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, έκθεση στο φως, περιεκτικότητα σε υγρασία κλπ.) των τροφίμων που περιέχουν λίπη/έλαια. Η θέση του ακόρεστου λιπαρού οξέος στο μόριο του τριγλυκεριδίου επηρεάζει επίσης την ταχύτητα αυτοξείδωσης. Τριγλυκερίδια με ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ στην 1- ή στην 3- θέση οξειδώνονται γρηγορότερα από τριγλυκερίδια με μία ακόρεστη ακυλο ομάδα στην περισσότερο προστατευμένη 2- θέση (Belitz et al, 2009).

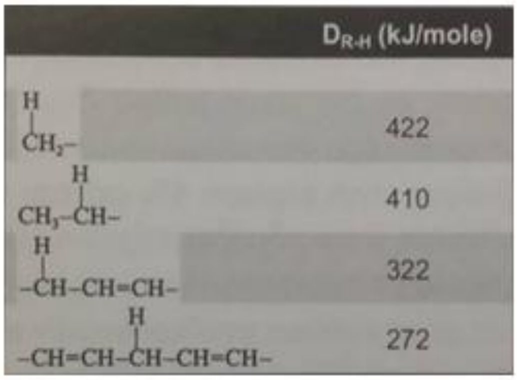
Η διαδικασία οξείδωσης είναι ουσιαστικά μία προκληθείσα από ρίζες αλυσιδωτή αντίδραση που χωρίζεται σε τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό.

Έναρξη

Στο στάδιο της έναρξης, απομακρύνεται ένα άτομο υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπίδιο (RH), υπό την παρουσία εκκινητή, και δημιουργείται μία ελεύθερη ρίζα (R·) σύμφωνα με την αντίδραση:

$$RH + In \rightarrow R^{\cdot} + InH$$

Το στάδιο της έναρξης είναι το πιο ενδιαφέρον αυτής της χημικής διεργασίας. Η ξαφνική απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από μία οργανική ένωση είναι μία ενδόθερμη αντίδραση που απαιτεί μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης και παρ’ ότι μπορεί να συμβαίνει μέχρι κάποιο βαθμό, είναι πολύ αργή. Η δημιουργία των πρώτων ριζών γίνεται από την παρουσία εκκινητών οξείδωσης όπως ίχνη μετάλλων ή ένζυμα (Kanner et al, 1992). Οι πιο ασθενείς δεσμοί στα ακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκονται στις λεγόμενες αλλυλικές θέσεις, δηλαδή στη θέση του άνθρακα που συνδέεται με άνθρακες που συμμετέχουν σε διπλό δεσμό. Σε αυτή τη θέση παρουσιάζεται και η χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης (Angelo, 1996, Belitz, 2009).



Σχήμα 1.4 Ενεργειακές απαιτήσεις για την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου

Αντιδράσεις διάδοσης

Στο στάδιο της διάδοσης οι ελεύθερες ρίζες που έχουν σχηματιστεί αντιδρούν ταχέως με ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς παραγωγή ριζών υπεροξειδίου ($ROO^{\cdot}$), η οποία στη συνέχεια προσλαμβάνει ένα άτομο υδρογόνου από άλλο μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος και σχηματίζει υδροϋπεροξείδιο (ROOH), που είναι και τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης, ενώ προκύπτει και μία νέα ρίζα $R^{\cdot}$ από αυτή την αντίδραση. Το δεύτερο αυτό στάδιο είναι ταχύ (Wąsowicz et al, 2004). Οι μεταβολές που συμβαίνουν παρουσιάζονται στις παρακάτω αντιδράσεις:

$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$$

Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διπλών δεσμών στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο παράγονται πιο σύνθετα μίγματα υδροϋπεροξειδίων τα οποία είναι πιο δύσκολο να αναλυθούν ποσοτικά. Ο σχετικός ρυθμός αυτοξείδωσης ελαϊκού: λινελαϊκού: λινολενικού έχει αναφερθεί ως 1:40-50:100 με βάση την πρόσληψη οξυγόνου και 1:12:25 με βάση την παραγωγή υπεροξειδίων(Wąsowicz et al, 2004).

Αντιδράσεις τερματισμού

Η αντίδραση της οξείδωσης τερματίζεται όταν όλες οι ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων που δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα έχουν ως εξής:

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow RR$$

$$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$$

Αντιδράσεις τερματισμού συμβαίνουν επίσης όταν αντιοξειδωτικά και δεσμευτές ελευθέρων ριζών αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο στάδιο της διάδοσης (Angelo, 2004).

1.3 Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων

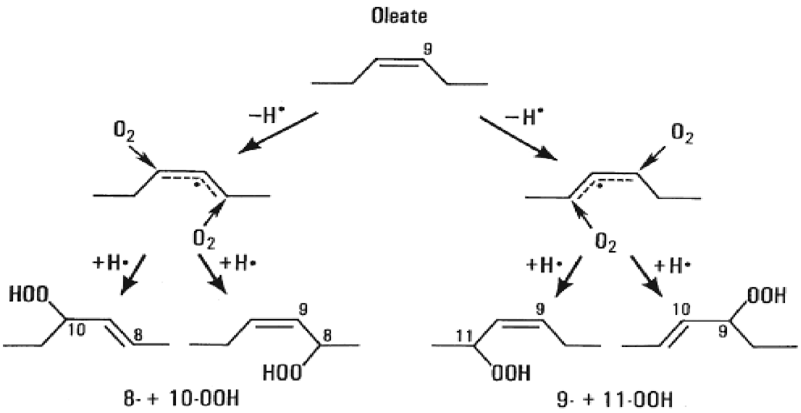
Τα προϊόντα της αυτοξείδωσης των λιπαρών οξέων μπορούν να διακριθούν σε πρωτογενή και δευτερογενή. Τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης (υδροϋπεροξείδια) λιπών και ελαίων είναι μεταβατικά ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία αντιδρούν στη συνέχεια και μετατρέπονται σε δευτερογενή προϊόντα (Akoh & Min, 2008).

Οξείδωση ελαϊκού οξέος

Σύμφωνα με τον κλασικό μηχανισμό της αυτοξείδωσης του ελαϊκού οξέος, παρατηρείται απόσπαση υδρογόνου από τις αλλυλικές θέσεις 8 και 11 προς παραγωγή 4 υδροϋπεροξειδίων σε ίσες ποσότητες:

- 9-υδροϋπεροξυ-10-ένιο
- 11-υδροϋπεροξυ-9-ένιο
- 10-υδροϋπεροξυ-8-ένιο
- 8-υδροϋπεροξυ-9-ένιο

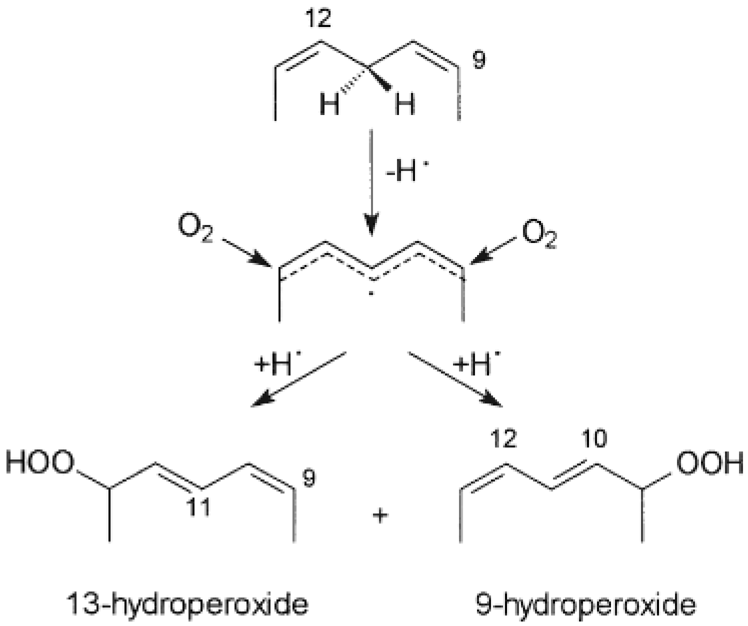
Πιο πρόσφατες έρευνες που βασίζονται σε αναλύσεις GC-MS και HPLC έδειξαν ότι το 11-υδροϋπεροξείδιο και το 8-υδροϋπεροξείδιο παράγονται σε μικρές (25-29%) ποσότητες, οι οποίες όμως είναι μεγαλύτερες από τις ποσότητες των άλλων δυο υδροϋπεροξειδίων (22-25%) (Frankel, 2005). Ο μηχανισμός οξείδωσης του ελαϊκού οξέος απεικονίζεται στο σχήμα 1.5.



Σχήμα 1.5 Μηχανισμός οξείδωσης ελαϊκού οξέος

Οξείδωση λινελαϊκού οξέος

Το λινελαϊκό οξύ είναι 40 φορές πιο δραστικό από το ελαϊκό οξύ, επειδή έχει μία δις-αλλυλική ομάδα στον άνθρακα 11 ανάμεσα σε δύο διπλούς δεσμούς, επομένως μπορεί πολύ εύκολα να χάσει άτομα υδρογόνου. Το οξυγόνο αντιδρά με άνθρακες στις θέσεις 9 και 13 προς δημιουργία 9-υδροϋπεροξυ-10-12-διενίου και 13-υδροϋπεροξυ-9-11-διενίου. Τα δύο αυτά προϊόντα παράγονται σε ίσες συγκεντρώσεις σε διαφορετικά στάδια της αυτοξείδωσης του λινελαϊκού και σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος. Ο μηχανισμός της αυτοξείδωσης του λινελαϊκού οξέος παρουσιάζεται στο σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6. Μηχανισμός οξείδωσης λινελαϊκού οξέος

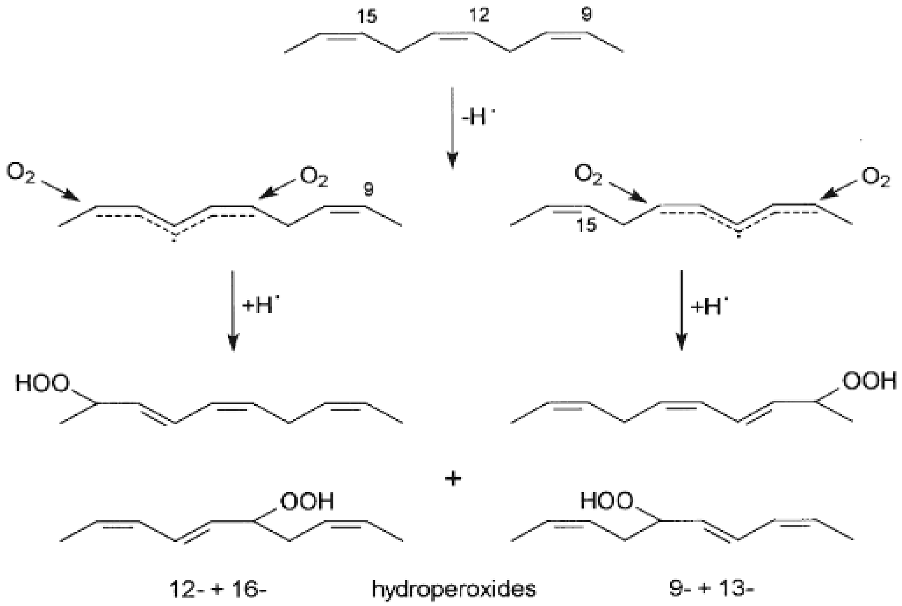
Οξείδωση λινολενικού οξέος

Το λινολενικό αντιδρά 2 φορές πιο γρήγορα από το λινελαϊκό οξύ εξαιτίας του γεγονότος ότι έχει δύο δις-αλλυλικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές βρίσκονται στις θέσεις 11 και 14. Αφότου η ένωση χάσει υδρογόνο από τις θέσεις αυτές, αντιδρά με οξυγόνο και παράγονται τέσσερα προϊόντα:

- 9-υδροϋπεροξυ-10,12,15-τριένιο
- 13-υδροϋπεροξυ-9,11,15-τριένιο
- 12-υδροϋπεροξυ-9,13,15-τριένιο
- 16-υδροϋπεροξυ-9,12,14-τριένιο

Σύμφωνα με αναλύσεις της οξείδωσης του λινολενικού οξέος σε ένα εύρος μετατροπής 2-30% και σε θερμοκρασιακό εύρος 25-80ºC, τα 9- και 16-υδροϋπεροξείδια ήταν περίπου τέσσερις φορές υψηλότερα από τα 12- και 13-

υδροϋπεροξείδια. Η πορεία αυτοξείδωσης του λινολενικού οξέος παρουσιάζεται στο σχήμα 1.7.



Σχήμα 1.7 Πορεία αυτοξείδωσης λινολενικού οξέος

Ο υπολογισμός των δευτερογενών προϊόντων ως ένδειξη για την οξείδωση λιπιδίων είναι πιο κατάλληλος καθώς τα δευτερογενή προϊόντα εκπέμπουν οσμές, ενώ τα πρωτογενή προϊόντα είναι άοσμα και άγευστα. Στα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης συμπεριλαμβάνονται οι αλδεΰδες, οι κετόνες, οι υδρογονάνθρακες και οι αλκοόλες μεταξύ άλλων (Akoh & Min, 2008).

Η ποσότητα και η σύσταση των δευτερογενών προϊόντων εξαρτώνται από το είδος του λιπιδίου, την περιεκτικότητά του σε προοξειδωτικά και αντιοξειδωτικά, καθώς και τις συνθήκες οξείδωσής του. Τα πτητικά προϊόντα αναπτύσσονται από τη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων κυρίως με ομολυτικό μηχανισμό. Με αυτό το μηχανισμό δημιουργούνται κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΰδες, κετόνες και υδρογονάνθρακες. Οι ακόρεστες αλδεΰδες και κετόνες που παράγονται οξειδώνονται περαιτέρω προς σχηματισμό άλλων πτητικών ενώσεων. Ορισμένα από τα δευτερογενή προϊόντα που αναπτύσσονται κατά την αυτοξείδωση των οξέων που αναφέρθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Μπράβου, 2015).

Πίνακας 1.1 Δευτερογενή προϊόντα από την οξείδωση ελαϊκού, λινελαϊκού και λινολενικού οξέος

Τύπος δευτερογενών προϊόντων	Ελαϊκό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Λινολενικό οξύ
Αλδεΰδες	$8^{\alpha}:0^{\beta}$ 9:0 10:0 $10:1\ (2t)^{\gamma}$ 11:1 (2t)	6:0 7:1 (2t) 9:1 (3c) 10:2 (2t4c)	3:0 4:1 (2t) 6:1 (3c) 7:2 (2t4c) 9:2 (3c6c) 10:3(2t4c7c)
Υδρογονάνθρακες	7:0 8:0	5:0 8:1 (2)	2:0 5:1 (2) 8:2 (2,5)
Αλκοόλες	7:0 8:0	5:0 8:1 (2)	2:0 5:1 (2) 8:2 (2,5)

α: αριθμός ατόμων C της αλυσίδας
β: αριθμός διπλών δεσμών στην ανθρακική αλυσίδα
γ: θέση C στην οποία βρίσκεται ο διπλός δεσμός, t-trans μορφή, c-cis δεσμός

1.4 Μέθοδοι μέτρησης και υπολογισμού των προϊόντων οξείδωσης

Έχουν βρεθεί ποικίλες μέθοδοι για την εκτίμηση της οξείδωσης των λιπιδίων στα τρόφιμα. Αλλαγές σε φυσικά, χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λιπών και ελαίων μπορούν να ελεγχθούν για να υπολογιστεί το εύρος της οξείδωσης σε ένα προϊόν. Ωστόσο δεν υπάρχει μία συγκεκριμένη μέθοδος για την ανίχνευση όλων των οξειδωτικών αλλαγών σε όλα τα συστήματα τροφίμων. Οι διαθέσιμες μέθοδοι για τον έλεγχο της οξείδωσης των λιπιδίων σε τρόφιμα και βιολογικά συστήματα μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα μεθόδων μετράει αλλαγές στα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης, ενώ η δεύτερη προσδιορίζει δευτερογενείς αλλαγές που εμφανίζονται σε κάθε σύστημα.

Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης

Αριθμός υπεροξειδίων (Peroxide Value)

Κλασσική μέθοδος για ποσοτικοποίηση των υδροϋπεροξειδίων είναι ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων (PV). Το περιεχόμενο σε υδροϋπεροξείδια προσδιορίζεται με μία ιωδιομετρική μέθοδο. Αυτή βασίζεται στην αναγωγή της υδροϋπεροξειδικής ομάδας (ROOH) με ιόντα ιωδίου (I^-). Η ποσότητα ελεύθερου ιωδίου (I_2) που ελευθερώνεται είναι ανάλογη της ποσότητας υπεροξειδίων. Το ελεύθερο ιώδιο που παράγεται μετράται με τιτλοδότηση με θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$). Οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε μίγμα διαλυτών οξικού οξέος - χλωροφορμίου είναι οι εξής:

$$2KI + 2CH_3COOH \rightarrow 2HI + 2CH_3COOK$$

$$ROOH + 2HI \rightarrow ROH + H_2O + I_2$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow 2Na_2S_2O_3 + 2NaI$$

Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η πιθανή απορρόφηση ιωδίου από ακόρεστους δεσμούς λιπαρών οξέων και απελευθέρωση ιωδίου από το ιωδιούχο κάλιο εξαιτίας της παρουσίας οξυγόνου στο διάλυμα προς τιτλοδότηση. Τα αποτελέσματα μπορεί επίσης να επηρεαστούν από τη δομή και τη δραστικότητα των υπεροξειδίων, καθώς και από τη θερμοκρασία και το χρόνο. Η ιωδιομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα καθαρά λίπη και έλαια, αλλά είναι μία καθαρά εμπειρική μέθοδος και οποιαδήποτε παραλλαγή στη διαδικασία εφαρμογής της μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στα αποτελέσματα. Επίσης, εμφανίζει δυσκολίες στη μέτρηση χαμηλών τιμών υπεροξειδίων, λόγω δυσκολίας εντοπισμού του τελικού σημείου τιτλοδότησης. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος προτείνεται μία τροποποίηση στην ιωδιομετρική μέθοδο, κατά την οποία το στάδιο της τιτλοδότησης μπορεί να αντικατασταθεί από μία ηλεκτροχημική τεχνική, όπου το ιώδιο που παράγεται ανάγεται σε ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου (Akoh & Min, 2008).

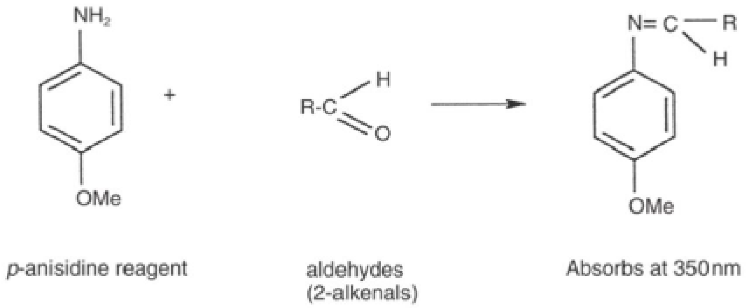
Συζυγή διένια (Conjugated Dienes)

Η οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συνοδεύεται από αύξηση στην απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα του προϊόντος. Λιπίδια τα οποία περιέχουν διένια ή πολυένια που διακόπτονται από μεθυλένια παρουσιάζουν μία αλλαγή στη θέση του διπλού δεσμού κατά την οξείδωση εξαιτίας ισομερίωσης και σχηματισμού συζυγών ενώσεων. Τα σχηματιζόμενα συζυγή διένια απορροφούν στα 234 nm και ομοίως τα συζυγή τριένια απορροφούν στα 268 nm. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σταθερότητας των λιπιδίων αντί για ή μαζί με τον αριθμό υπεροξειδίων. Η μέθοδος των συζυγών διενίων είναι γρηγορότερη και πιο απλή από τον αριθμό υπεροξειδίων, δεν εξαρτάται από χημικές αντιδράσεις ή εμφάνιση χρώματος και απαιτεί πολύ μικρότερη ποσότητα δείγματος. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία ενώσεων που απορροφούν στην ίδια περιοχή μπορεί να παρεμποδίζει τους υπολογισμούς (Akoh & Min, 2008).

Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης

Αριθμός π-Ανισιδίνης (p-Anisidine Value)

Ο αριθμός π-ανισιδίνης χρησιμοποιείται για τη μέτρηση αλδεϋδών σε ένα λίπος ή έλαιο, και συγκεκριμένα προσδιορίζονται εκείνες οι οποίες είναι ακόρεστες (κυρίως 2-αλκενάλες και 2,4-αλκαδιενάλες). Οι αλδεΰδες αντιδρούν με την π-ανισιδίνη κάτω από όξινες συνθήκες (Akoh & Min, 2008). Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν αντίδραση διαλυμένης λιπαρής ύλης σε ισοοκτάνιο και προσθήκη π-ανισιδίνης, η οποία είχε διαλυθεί σε οξικό οξύ. Η απορρόφηση μετράται στα 350 nm.



Σχήμα 1.8 Αντίδραση π-ανισιδίνης με αλδεΰδες

Ο αριθμός π-ανισιδίνης χρησιμοποιείται αντί ή και συμπληρωματικά με τον αριθμό υπεροξειδίων ώστε να αξιολογηθούν τα έλαια τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία ή γενικά πιο εκτεταμένη οξείδωση. Για παράδειγμα εφαρμόζεται σε μελέτες που διεξάγονται για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής ελαίων που χρησιμοποιούνται για τηγάνισμα (Μπράβου, 2015).

2. Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτικό σε τρόφιμο μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία η οποία είναι ικανή να καθυστερήσει ή και να αποτρέψει τον ταγγισμό και την υποβάθμιση της γεύσης τροφίμου εξαιτίας της οξείδωσής του. Τα αντιοξειδωτικά καθυστερούν την ανάπτυξη άσχημων γεύσεων, επεκτείνοντας την περίοδο επώασης του τροφίμου. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών μετά το πέρας αυτής της περιόδου τείνει να είναι αναποτελεσματική σε ότι αφορά την καθυστέρηση ταγγισμού των τροφίμων.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καθυστερήσουν την οξείδωση με δύο τρόπους: είτε δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, όπου σε αυτή την περίπτωση οι ουσίες αναφέρονται ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά, είτε με μηχανισμό που δεν περιλαμβάνει δέσμευση ελευθέρων ριζών και σε αυτή την περίπτωση η ουσία ονομάζεται δευτερογενές αντιοξειδωτικό. Στα πρωτογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται φαινολικές ενώσεις όπως βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη). Αυτές οι ουσίες καταναλώνονται κατά την περίοδο επώασης. Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά λειτουργούν με διάφορους μηχανισμούς όπως δεσμεύοντας μεταλλικά ιόντα ή οξυγόνο, απορροφώντας υπεριώδη ακτινοβολία ή απενεργοποιώντας μονήρη οξυγόνα. Συνήθως, τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση παρουσία κάποιας άλλης ουσίας, όπως στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος το οποίο είναι αποτελεσματικό μόνο παρουσία τοκοφερολών ή άλλων πρωτογενών αντιοξειδωτικών (Pokorny et al, 2001).

Σύμφωνα με τους Madhavi et al. (1995), όλες οι ουσίες που μπορούν να προστατεύσουν τα τρόφιμα από την αυτοξείδωση θα πρέπει να ονομάζονται παρεμποδιστές της οξείδωσης και μόνο οι ουσίες οι οποίες αποτρέπουν την οξείδωση, αντιδρώντας με ελεύθερες ρίζες πρέπει να λέγονται αντιοξειδωτικά. Οι παρεμποδιστές περιορίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και ενεργού οξυγόνου, ενώ τα αντιοξειδωτικά αποτρέπουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων ή την διάδοσή τους.

2.1 Κατηγορίες αντιοξειδωτικών

2.1.1 Πρωτογενή αντιοξειδωτικά (chain-breakingantioxidants)

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά (AH) είναι ενώσεις ικανές να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων δίνοντας υδρογόνα ή ηλεκτρόνια σε αυτά και μετατρέποντάς τα σε πιο σταθερά προϊόντα. Μπορεί επίσης να λειτουργούν προσθετικά σε αντιδράσεις με ρίζες λιπιδίων, σχηματίζοντας αντιοξειδωτικά σύμπλοκα. Τόσο οι φαινολικές ενώσεις (όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη BHA, το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο BHT, η τριτοταγής βουτυλιωμένη υδροκινόνη TBHQ και τοκοφερόλες) όσο και οι πολυ-υδροξυ-φαινολικές ενώσεις ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αντιοξειδωτικών. Πολλές φυσικές φαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, η ευγενόλη, η βανιλίνη και διάφορα φαινολικά συστατικά των φυτών παρουσιάζουν και ιδιότητες πρωτογενών αντιοξειδωτικών. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, καθώς σε υψηλότερα ποσοστά μπορεί να αποκτήσουν προοξειδωτική δράση.

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά μπορούν είτε να καθυστερήσουν, είτε να αναστείλουν το στάδιο της έναρξης της οξείδωσης αντιδρώντας με μία ελεύθερη ρίζα είτε να αναστείλουν το στάδιο της διάδοσης αντιδρώντας με υπεροξειδικές ($LOO^{\cdot}$) ή αλκοξειδικές ρίζες ($LO^{\cdot}$).

$$AH + L^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + LH$$

$$AH + LOO^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + LOOH$$

$$AH + LO^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + LOH$$

Η ελεύθερη ρίζα του αντιοξειδωτικού μπορεί να επέμβει περαιτέρω στις αλυσιδωτές αντιδράσεις διάδοσης δημιουργώντας υπεροξειδικές αντιοξειδωτικές ενώσεις.

$$A^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow LOOA$$

$$A^{\cdot} + LO^{\cdot} \rightarrow LOA$$

(Madhavi et al, 1995)

2.1.2 Δευτερογενή αντιοξειδωτικά (preventive antioxidants)

Αντίθετα από τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά, τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά δεν απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες. Όπως αναφέρθηκε, ο όρος δευτερογενές αντιοξειδωτικό αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών, όπου όλα λειτουργούν, ουσιαστικά, επιβραδύνοντας το ρυθμό των αντιδράσεων οξείδωσης των λιπιδίων, αλλά το κάνουν με μία ποικιλία μηχανισμών. (Decker et al, 2010). Παραδείγματα τέτοιων μηχανισμών είναι η δέσμευση ιόντων μετάλλων, η δέσμευση οξυγόνου καθώς και η καθυστέρηση του ρυθμού έναρξης των αλυσιδωτών αντιδράσεων μετατρέποντας τα υδροϋπεροξείδια σε σταθερά προϊόντα που δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Παραδείγματα δευτερογενών αντιοξειδωτικών συνιστούν το θειοδιπροπιονικό οξύ (thiodipropionate acid) και το διαυρυλικό θειοδιπροπιονικό οξύ (dilauryl thiodipropionate acid).

Δευτερογενή αντιοξειδωτικά αποτελούν και τα συνεργιστικά αντιοξειδωτικά τα οποία μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: σε δεσμευτές οξυγόνου και σε χηλικές ενώσεις. Τα συνεργιστικά δρουν με ποικίλους τρόπους. Μπορεί να δίνουν υδρογόνα σε φαινοξυ-ρίζες, αναγεννώντας ουσιαστικά το αρχικό αντιοξειδωτικό. Γι' αυτό και τα φαινολικά αντιοξειδωτικά μπορούν να χρησιμοποιούνται σε αρκετά μικρές συγκεντρώσεις εάν προστεθεί ταυτόχρονα στο τρόφιμο και ένα συνεργιστικό αντιοξειδωτικό. Επίσης τα συνεργιστικά αντιοξειδωτικά παρέχουν ένα όξινο μέσο το οποίο βελτιώνει τη σταθερότητα των πρωτογενών αντιοξειδωτικών.

Οι δεσμευτές οξυγόνου όπως το ασκορβικό οξύ, το παλμιτικό ασκορβύλιο, θειώδη ερυθορβικά άλατα αντιδρούν με το ελεύθερο οξυγόνο και το απομακρύνουν σε ένα κλειστό σύστημα. Το ασκορβικό οξύ και το παλμιτικό ασκορβύλιο δρουν επίσης συνεργιστικά με πρωτογενή αντιοξειδωτικά, κυρίως τις τοκοφερόλες. Χηλικές ενώσεις, όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), το κιτρικό οξύ και τα φωσφορικά δεν είναι αντιοξειδωτικά, αλλά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως συνεργιστικές ουσίες τόσο με πρωτογενή αντιοξειδωτικά όσο και με δεσμευτές οξυγόνου. Σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με προοξειδωτικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, που αυξάνουν αισθητά την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων έναρξης (Madhavi et al, 1995).

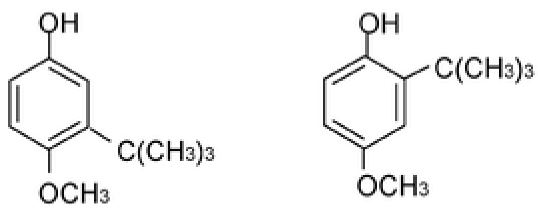
2.1.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό, μία συνθετική ένωση πρέπει να καλύπτει τις ακόλουθες απαιτήσεις:

- δεν πρέπει να είναι τοξική
- πρέπει να είναι ιδιαίτερα δραστική σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.01 - 0.02%)
- πρέπει να είναι σταθερή υπό τις συνηθισμένες συνθήκες επεξεργασίας των τροφίμων

Μερικά από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως είναι: η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA - butylated hydroxyanisole), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT - butylated hydroxytoluene), η tetr-βουτυλοϋδροξυκινόνη (TBHQ- tetr-butylhydroquinone) και εστέρες του γαλλικού οξέος (όπως ο προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος, PG-propyl gallate). Τα αντιοξειδωτικά αυτά, ανήκουν στην κατηγορία των πρωτογενών αντιοξειδωτικών. (Belitz et al, 2009).

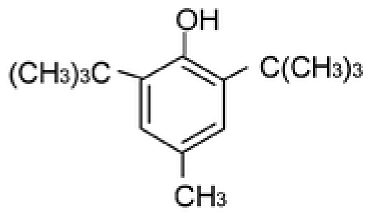
Τα BHA και BHT είναι διαλυτά σε λίπη και αδιάλυτα στο νερό. Παρουσιάζουν σταθερότητα στη θερμότητα και συχνά χρησιμοποιούνται για σταθεροποίηση των λιπών σε ψημένα και τηγανισμένα προϊόντα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανεξάρτητα η σε συνδυασμό, οπότε πιθανώς δρουν συνεργιστικά (Pokorny et al, 2001). Τα BHA και BHT μαζί, σε μία δεδομένη συνολική συγκέντρωση έχουν αναφερθεί ως πιο αποτελεσματικά στην επέκταση του χρόνου διατήρησης ενός λίπους ή ενός ελαίου από το καθένα αντιοξειδωτικό μεμονωμένα στο ίδιο επίπεδο χρήσης. (Belitz et al, 2009). Το BHA χρησιμοποιείται ευρέως για τη διατήρηση σογιέλαιου και φοινικέλαιου σε δημητριακά και προϊόντα ζαχαροπλαστικής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ψήσιμο



Σχήμα 2.1 Η εμπορική BHA είναι μίγμα δύο ισομερών 2- και 3-tetr-βουτυλο-4-υδροξυανισόλη

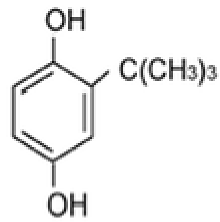
εξαιτίας της σταθερότητάς του στη θερμότητα, αλλά οι εφαρμογή του σε τηγάνισμα είναι περιορισμένη εξαιτίας της πτητικότητάς του. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το BHA έχει αντιμικροβιακή δράση.

Το BHT είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά σε τρόφιμα που περιέχουν λίπη. Χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα με χαμηλά λιπαρά, σε ιχθυρά, καθώς και σε υλικά συσκευασίας. Το BHT εκτός από το συνδυασμό του με BHA, συνδυάζεται επίσης με κιτρικό οξύ και προπυλεστέρα του γαλλικού οξέος (PG) για τη σταθεροποίηση ελαίων σε τρόφιμα μεγάλης περιεκτικότητας σε λίπη. (Yehye et al, 2015).



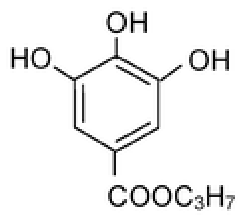
Σχήμα 2.2 BHT

Το TBHQ είναι ένα ιδιαίτερα ισχυρό αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση φυτικών ελαίων (Pokorny, 2001). Είναι διαλυτό σε λίπη και έλαια αλλά αδιάλυτο στο νερό. Η αντοχή σε υψηλή θερμοκρασία είναι σημαντική για τη χρήση του TBHQ στην επεξεργασία τροφίμων (Belitz et al, 2009). Εξαιτίας της χαμηλής τιμής του, της αποτελεσματικότητας και διαθεσιμότητάς του το TBHQ χρησιμοποιείτο ευρέως σε εδώδιμα έλαια και στη βιομηχανία τροφίμων σε πολλές χώρες όπως Αμερική, Μαλαισία, Αυστραλία, Κίνα κλπ. Το μέγιστο επιτρεπτό όριο που έχει καθιερωθεί για τη χρήση TBHQ σε έλαια και τρόφιμα είναι 0.02% του περιεχόμενου ελαίου στο τρόφιμο. Πολλές είναι οι χώρες στις οποίες έχει απαγορευτεί η χρήση του TBHQ (Ιαπωνία, Καναδάς και πολλές Ευρωπαϊκές χώρες) (Liu et al, 2016).



Σχήμα 2.3 TBHQ

Ο προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος (PG) είναι ένα μη τοξικό συνθετικό αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα λόγω των αντοχών που παρουσιάζει σε υψηλές θερμοκρασίες (Gálico et al, 2015). Είναι διαλυτό σε έλαια, αλλά ελάχιστα διαλυτό στο νερό (Bal et al, 2014). Εάν χρησιμοποιηθεί συνεργιστικά, το PG αυξάνει την αποτελεσματικότητα του BHA, αλλά όχι αυτή του BHT. (Belitz et al, 2009). Χρησιμοποιείται για να παρεμποδίσει την οξείδωση φυτικών ελαίων, ζωικών λιπών, καθώς και προϊόντων κρέατος (Bal et al, 2014).



Σχήμα 2.4 PG

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την τοξικολογική τους συμπεριφορά, αλλά ορισμένα από αυτά, ενώ χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια, τίθενται υπό αμφισβήτηση καθώς νέα τοξικολογικά δεδομένα έρχονται στο φως και εφιστούν την προσοχή σε ότι αφορά την χρήση τους. Δεδομένου αυτού, τα φυσικά αντιοξειδωτικά εμφανίζονται ως πιο υγιεινά και πιο ασφαλή από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

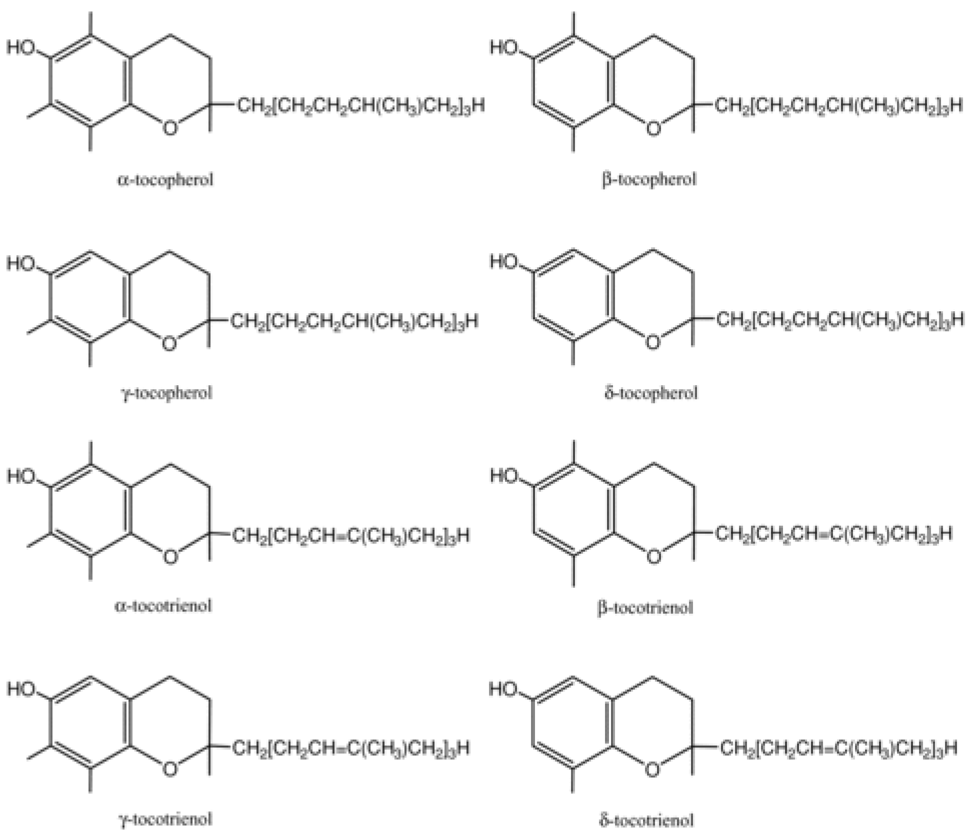
2.1.4 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Εκτενής έρευνα έχει γίνει για την απομόνωση, τον καθαρισμό και την αναγνώριση των διαφόρων αντιοξειδωτικών. Οι φαινολικές ενώσεις είναι τα πιο σημαντικά φυσικά αντιοξειδωτικά. Καροτενοειδή, ενώσεις σχετικές με πρωτεΐνες, προϊόντα της αντίδρασης Maillard, φωσφολιπίδια και στερόλες παρουσιάζουν επίσης αντιοξειδωτική δραστικότητα σε τρόφιμα.

2.1.4.1 Φαινολικές ενώσεις

Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι μονοφαινολικές ενώσεις, είναι διαλυτές σε έλαια και γι' αυτό θεωρούνται τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά σε εδώδιμα λίπη και έλαια. Διακρίνονται στις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες (Choe & Min, 2009). Οι τοκοφερόλες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά προσφέροντας ένα υδρογόνο από την υδροξυλική ομάδα τους στις ελεύθερες ρίζες λιπιδίων (Pokorny et al, 2001). Και οι δύο αυτές ομάδες απαντώνται σε τέσσερα ισομερή (α, β, γ, δ), ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των μεθυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα τέσσερα αυτά ισομερή.



Σχήμα 2.5 Δομές τοκοφερολών και τοκοτριενολών

Όπως παρατηρείται στο σχήμα, στις τοκοφερόλες, η πλευρική ανθρακική αλυσίδα είναι κορεσμένη, ενώ στις τοκοτριενόλες ακόρεστη (Choe & Min, 2009). Η γ-τοκοφερόλη αποτελεί το 55% των τοκοφερολών ενώ η α και η δ αποτελούν το 40 και το 5% αντίστοιχα (Pokorny et al, 2001).

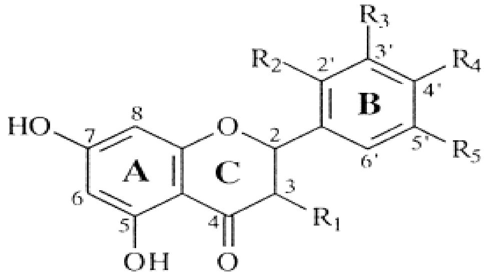
Οι τοκοφερόλες συναντώνται πιο συχνά σε φυτικά έλαια απ' ότι σε ζωικά λίπη, κυρίως σε σογιέλαια, ηλιέλαια, φοινικέλαια, κραμβέλαια και καλαμποκέλαια. Τα περισσότερα φυτικά έλαια περιέχουν τοκοφερόλες σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 500 ppm, ενώ για παράδειγμα το βοδινό λίπος και το λαρδί περιέχουν τοκοφερόλες συγκέντρωση λιγότερη από 40 ppm. Το φοινικέλαιο περιέχει 100 – 150 ppm τοκοφερόλες και 620 – 650 ppm τοκοτριενόλες.

Κατά τη διεργασία εξευγενισμού, ειδικά κατά την απόσμηση, το περιεχόμενο σε τοκοφερόλες των ελαίων μειώνεται (Choe & Min, 2009). Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παρατηρηθεί προοξειδωτική συμπεριφορά. Για παράδειγμα η α-τοκοφερόλη έχει δείξει προοξειδωτική συμπεριφορά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.01% κατά τα πρώτα στάδια αυτοξείδωσης σε λαρδί, καλαμποκέλαιο και ελαιόλαδο. Οι τοκοφερόλες είναι πολύ σταθερές στη θερμοκρασία. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η α-τοκοφερόλη είναι η πιο αποτελεσματική στο να αυξάνει την οξειδωτική σταθερότητα και να μειώνει το σχετικό ρυθμό οξείδωσης, κατά την αύξηση της θερμοκρασίας (Pokorny et al, 2001).

<u>Φλαβονοειδή</u>

Τα φλαβονοειδή απαντώνται σε πολλά είδη φυτών και συγκαταλέγονται στην κατηγορία των πολυφαινολών. Αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία φυσικά απαντώμενων πολυφαινολών. Η χημική δομή τους χαρακτηρίζεται από έναν ανθρακικό σκελετό C_6-C_3-C_6. Η βασική δομή των ενώσεων αυτών είναι δύο αρωματικοί δακτύλιοι οι οποίοι είναι ενωμένοι με μία αλειφατική αλυσίδα τριών ανθράκων. Φλαβονοειδή όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες, φλαβονόνες και χαλκόνες βρίσκονται σε όλους τους τύπους ιστών των ανώτερων φυτών. Ιδιαίτερα οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες απαντώνται σχεδόν σε όλα τα φυτά, ιδιαίτερα στα φύλλα και στα πέταλα με τις δεύτερες να συναντώνται πιο συχνά. Η δομή των κυριότερων ομάδων απεικονίζεται στο σχήμα 2.7.

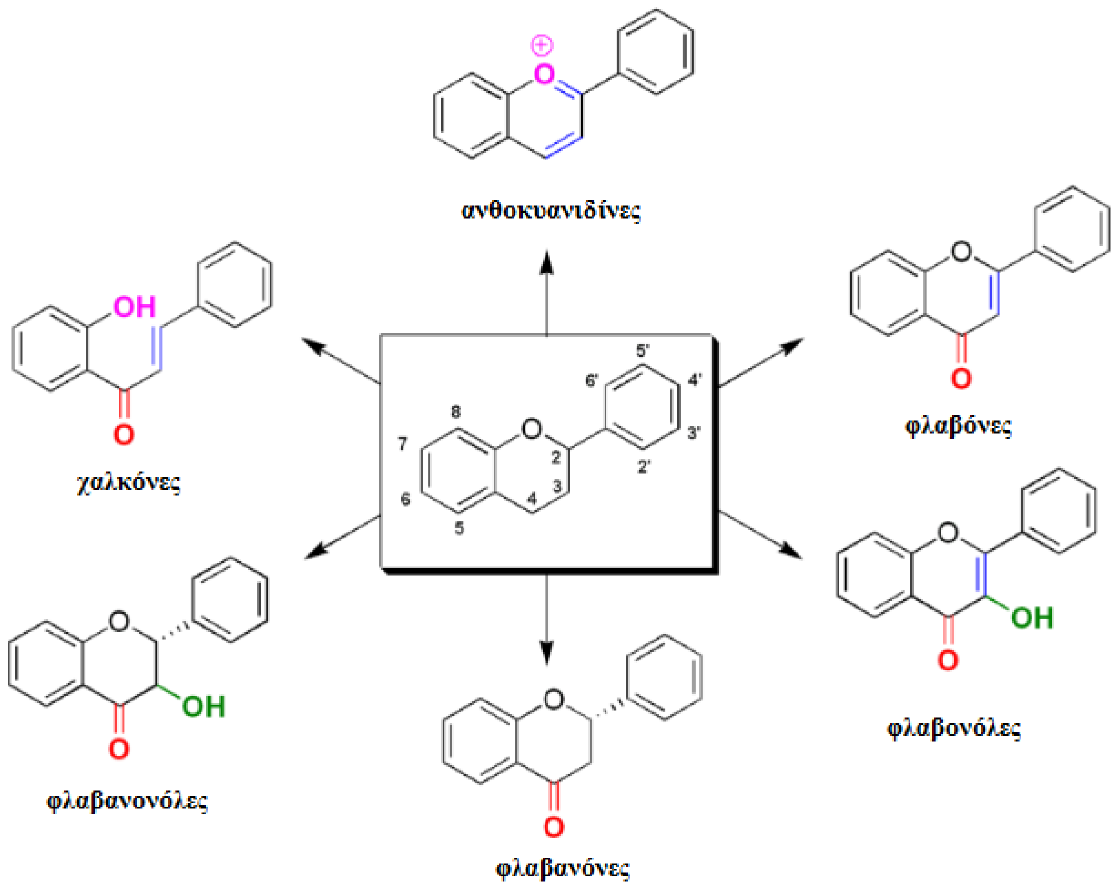
Τα φλαβονοειδή δρουν ως αντιοξειδωτικά, κυρίως δεσμεύοντας ρίζες όπως ανιόντα υπεροξειδίου, υπεροξειδικές ρίζες των λιπιδίων και ρίζες υδροξυλίων. Άλλοι μηχανισμοί δράσης επιλεγμένων φλαβονοειδών περιλαμβάνουν αποδιέγερση μονήρους οξυγόνου και χηλίωση μετάλλων. Μέγιστη αντιοξειδωτική δράση παρέχουν τα φλαβονοειδή με τα εξής χαρακτηριστικά στη δομή τους:



Σχήμα 2.6 Βασική δομή φλαβονοειδών

- 3',4'-διυδροξυλιωμένη δομή στο Β δακτύλιο

- διπλό δεσμό στη θέση 2-3 σε συνδυασμό με μία κετονομάδα (=O) στη θέση 4 του C δακτυλίου
- μία υδροξυλική ομάδα στη θέση 3 του C δακτυλίου και άλλη μία στη θέση 5 του A δακτυλίου

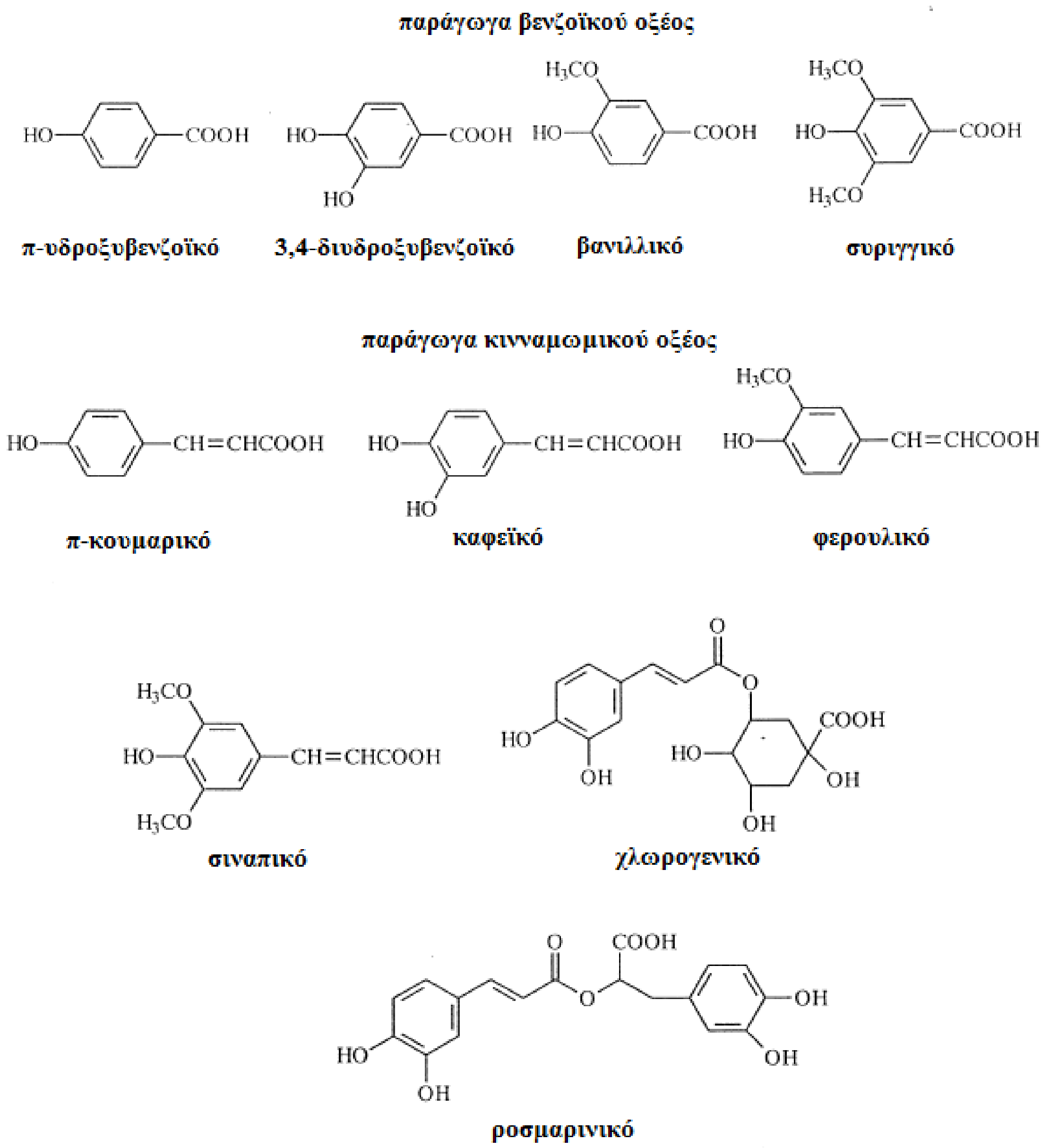


Σχήμα 2.7 Κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών

Όπως αναφέρεται, τα φλαβονοειδή με ελεύθερες ομάδες υδροξυλίων λειτουργούν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών, ενώ πολλές ομάδες υδροξυλίων, ιδιαίτερα στον B δακτύλιο, ενισχύουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Τα υδροξύλια στον B δακτύλιο είναι τα πιο δραστικά σε ότι αφορά τη διακοπή αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης (Pokorny et al, 2001).

Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα απαντώνται ευρέως σχεδόν σε όλα τα φυτά και συνήθως υπάρχουν με τη μορφή εστέρων οργανικών οξέων ή γλυκοζιτών. Μερικά από τα πιο σημαντικά φαινολικά οξέα είναι: το π-υδροξυβενζοϊκό, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό, βανιλλικό, συριγγικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό, σιναπικό, χλωρογενικό και ροσμαρινικό. Τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος αποτελούν πιο ενεργά αντιοξειδωτικά από τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος. Στο σχήμα 2.8 παρατίθενται τα πιο γνωστά φαινολικά οξέα.

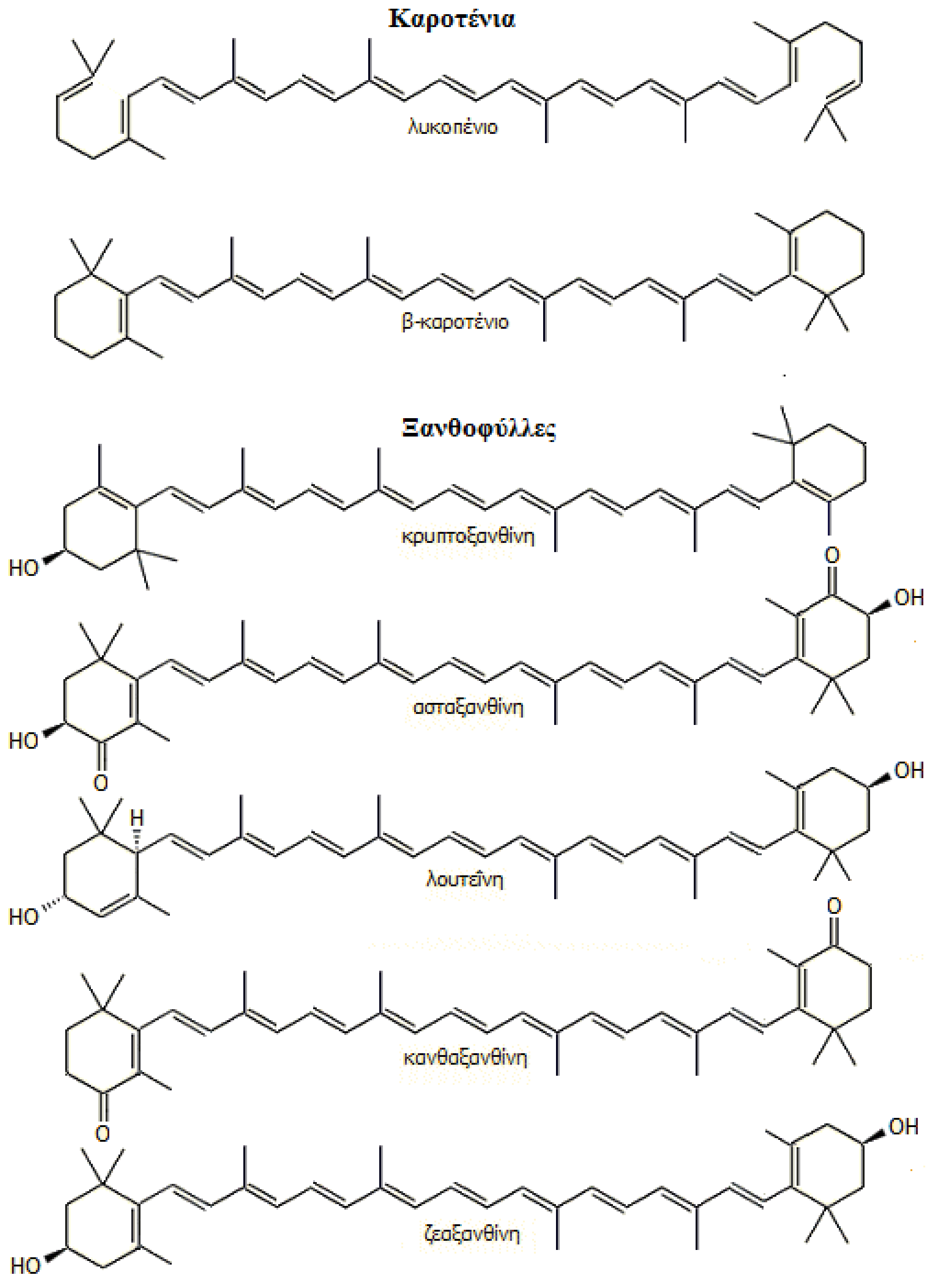


Σχήμα 2.8 Δομές βασικών φαινολικών οξέων

Έχει βρεθεί μία σχέση μεταξύ της δομής φαινολικών οξέων και της αντιοξειδωτικής δράσης. Οι μονοφαινόλες είναι λιγότερο αποτελεσματικές από τις πολυφαινόλες. Η εισαγωγή μίας δεύτερης υδροξυλομάδας στην ορθο ή στην παρα θέση, αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, με την προσθήκη ενός ή δύο μεθοξυ-υποκαταστατών φάνηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των μονοφαινολών (Pokorny et al, 2001).

2.1.4.2 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι οι πιο διαδεδομένες χρωστικές στη φύση και σχηματίζονται από την ένωση τερπενοειδών με διπλούς trans δεσμούς. Είναι γνωστά περισσότερα από 600 καροτενοειδή τα οποία διακρίνονται σε καροτένια (β-καροτένιο και λυκοπένιο), που είναι πολυένια και σε ξανθοφύλλες (λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, καψανθίνη, ασταξανθίνη και κανθαξανθίνη) οι οποίες περιέχουν και άτομα οξυγόνου σε μορφή υδρόξυ-, επόξυ-, αλδεϋδο- και κέτο-ομάδων (Choe et al, 2009). Τα καροτενοειδή χαρακτηρίζονται από μία κεντρική αλυσίδα με την αλληλουχία των συζυγιακών διπλών δεσμών. Στα δύο άκρα της αλυσίδας υπάρχουν οι πλευρικές ομάδες που ξεχωρίζουν τα διάφορα καροτενοειδή μεταξύ τους. Οι πλευρικές ομάδες μπορεί να είναι ίδιες ή διαφορετικές μεταξύ τους, κυκλικές ή όχι (όπως στο λυκοπένιο). Στις ξανθοφύλλες οι πλευρικές ομάδες περιλαμβάνουν απλές οξυγονούχες ομάδες. Στον μεγάλο αριθμό των καροτενοειδών συνεισφέρει το πλήθος των διαφόρων ισομερών, όπως και τα μερικώς υδρογονωμένα παράγωγα. Στο σχήμα 2.9 παρατίθενται ορισμένα από τα τυπικά καροτενοειδή.



Σχήμα 2.9 Τυπικά καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι διαλυτά σε λίπη και έχουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση λιπών και ελαίων. Τα καροτένια είναι τα κύρια καροτενοειδή των ελαίων, με το β-καροτένιο να είναι το πιο μελετημένο. Το φοινικέλαιο είναι μία από τις πιο πλούσιες πηγές καροτενοειδών. Περιέχει από 500 μέχρι 700 ppm καροτενοειδή, αλλά το εξευγενισμένο φοινικέλαιο δεν είναι καλή πηγή καροτενοειδών. Το παρθένο ελαιόλαδο από την άλλη περιέχει 1.0 με 2.7 ppm β-καροτένιο και 0.9 με 2.3 ppm λουτεΐνη. Το καλαμποκέλαιο και το σογιέλαιο περιέχουν ακόμα μικρότερες ποσότητες β-καροτενίου, 1.2 και 0.28 ppm αντίστοιχα (Choe et al, 2009).

2.2 Αρωματικά φυτά ως πηγές αντιοξειδωτικών

Τα αρωματικά φυτά και τα καρυκεύματα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους στην έρευνα για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, σε ότι αφορά την ασφάλεια. Ο άνθρωπος τα χρησιμοποιεί όχι μόνο για να δώσει γεύση στα τρόφιμα, αλλά και για τις αντισηπτικές τους και φαρμακευτικές τους ιδιότητες από τα προϊστορικά χρόνια (Pokorny et al, 2001).

Ορισμένα καρυκεύματα και αρωματικά φυτά περιέχουν ενώσεις που μπορούν να απομονωθούν και να προστεθούν σε τρόφιμα για να καθυστερήσουν την οξείδωση αυτών. Αυτές οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να αφαιρεθούν από τα αρωματικά φυτά και να συγκεντρωθούν σε μορφή εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων και ρητινών. Τα εκχυλίσματα είναι διαλυτά κλάσματα που μπορούν να αφαιρεθούν από φυτικά υλικά, διαλυτοποιώντας την ένωση ή τις ενώσεις που χρειάζεται να απομονωθούν, σε μία υδατική ή αλκοολική φάση ή σε έναν άλλο διαλύτη.

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές αρωματικές ουσίες οι οποίες αποτελούνται κυρίως από τερπένια μεν, αλλά είναι εξαιρετικά σύνθετα μίγματα που περιέχουν πολλές ενώσεις. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να απομονωθούν με ατμοαπόσταξη ή υδροατμοαπόσταξη, με εκχύλιση (με διαλύτη ή με CO_2) ή με μηχανική εκπίεση. Τα φυτά επίσης περιέχουν ρητίνες που είναι μη πτητικά, μεγάλου μοριακού βάρους, άμορφα στερεά ή ημιστερεά συστατικά. Έχουν απαλό κίτρινο ή καφέ χρώμα, είναι άγευστες,, άοσμες, χωρίς άρωμα, ημιδιαφανείς ή διαφανείς. Οι περισσότερες ρητίνες αποτελούνται από τερπένια και είναι διαλυτές στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες αλλά όχι στο νερό. Μπορεί να περιέχουν μικρή ποσότητα πτητικών φαινολικών συστατικών.

Εκχυλίσματα από πολλά φυτά της οικογένειας των χειλανθών (*Lamiaceae*) (ρίγανη, μαντζουράνα, δενδρολίβανο, βασιλικός, θυμάρι, θρούμπι και φασκόμηλο) που είναι αντιοξειδωτικά, έχουν ολικά φαινολικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι έχουν μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, αλλά φαίνεται να περιέχουν συστατικά που λειτουργούν με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έχει παρατηρηθεί ότι ενώ αυτά τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά δεν είναι συνυφασμένα με το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά, φαίνεται να σχετίζονται κατά βάση με το ροσμαρινικό οξύ που είναι το κύριο φαινολικό συστατικό παρών σε αυτά τα φυτά (Brewer, 2011).

2.2.1 Ρίγανη (*Origanum vulgare*)

Η ρίγανη χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως μπαχαρικό και η γεύση της είναι πολύ δημοφιλής σε καταναλωτές σε όλο τον κόσμο. Επίσης έχει αξία λόγω των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της. Ξηρή ρίγανη αλλά και εκχυλίσματα ρίγανης, τα οποία παραλαμβάνονται με χρήση διαλυτών διαφορετικής πολικότητας (εξάνιο, μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο), έχουν μελετηθεί ως παρεμποδιστές της οξείδωσης λιπιδίων (Pokorny et al, 2001). Τα εκχυλίσματα της ρίγανης περιέχουν φαινόλες, κυρίως ροσμαρινικό οξύ σε μεγάλες συγκεντρώσεις, καθώς και άλλα φαινολικά οξέα αλλά και γλυκοζίτες που έχουν αντιοξειδωτική δράση και λειτουργούν ως δεσμευτές ριζών. Η ρίγανη έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (15.8 mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος [GAE]/g) (Brewer, 2011).

Σε έρευνα των Camo et al (2010) επικαλύφθηκαν μπριζόλες από βοδινό κρέας με ενεργό φιλμ συσκευασίας που περιείχε εκχύλισμα ρίγανης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ άλλες μπριζόλες ψεκάστηκαν με εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα της TBARs ήταν πολύ ικανοποιητικά καθώς όλα τα δείγματα έδειξαν συγκεντρώσεις κάτω από 2mg μαλοναλδεΰδης/ kg κρέατος. Επισημαίνεται επίσης ότι η κατάλληλη συγκέντρωση ρίγανης για επικάλυψη τροφίμων είναι 1-2% καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γίνεται αντιληπτό το άρωμα της ρίγανης.

Οι Vekiari et al (1993) παρασκεύασαν εκχυλίσματα του αρωματικού φυτού *Origanum vulgare* και διαπίστωσαν ότι από τα εκχυλίσματα, αυτό του διαιθυλαιθέρα ήταν το πιο αποτελεσματικό στη σταθεροποίηση ζωικού λίπους έναντι της οξείδωσης. Φάνηκε, επίσης, να έχει αντιοξειδωτική δράση σε φυτικά έλαια σε συνθήκες αποθήκευσης ή τηγανίσματος.

2.2.2 Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)

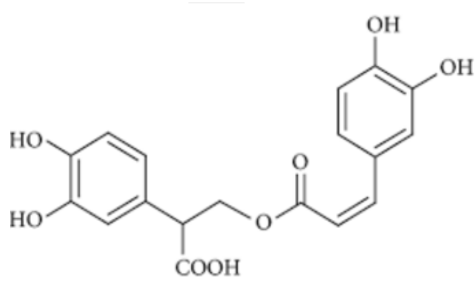
Το θυμάρι προέρχεται από περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο και χρησιμοποιείται στην ιατρική αλλά και στη μαγειρική ως καρύκευμα. Τα φαινολικά μονοτερπένια στο θυμάρι, η θυμόλη και η καρβακρόλη, είναι τα κύρια συστατικά που δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα στο αιθέριο έλαιό του (Pokorny et al, 2001). Το θυμάρι παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση συγκρίσιμη με αυτή της α-τοκοφερόλης και του συνθετικού αντιοξειδωτικού BHT. Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού επίσης έχει μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και παρουσιάζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τη θυμόλη και την καρβακρόλη. Δεδομένου ότι η θυμόλη είναι το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό συστατικό και επίσης το πρωτεύον συστατικό που δίνει άρωμα στο θυμάρι, η χρήση εκχυλισμάτων θυμαριού είναι πολύ πιθανό να προσδώσει ανεπιθύμητη γεύση έπειτα από προσθήκη σε τρόφιμο (Brewer, 2011). Σε έρευνα των Riveros et al (2015) έγινε επικάλυψη ψημένων καρπών με μεμβράνες CMC που περιείχαν αιθέριο έλαιο θυμαριού και βασιλικού σε συγκεντρώσεις 0.1g Ε.Ο./100g προϊόντος. Το άρωμα τόσο του βασιλικού όσο και του θυμαριού ήταν αντιληπτό μετά την επικάλυψη και αυτό θα επηρέαζε την άποψη του καταναλωτή.

2.2.3 Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)

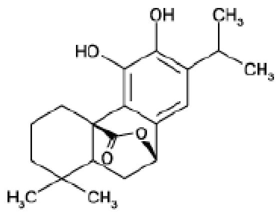
Παρ' ότι ολόκληρο το φυτό του δενδρολίβανου, εκτός από τα κλαδιά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, συνήθως μόνο τα φύλλα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ως μυρωδικό στη μαγειρική, ως βότανο και ως φυσικό αντιοξειδωτικό. Σήμερα, εκχυλίσματα από δενδρολίβανο χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο όχι μόνο για να προσδώσουν γεύση, αλλά και ως φυσικά εναλλακτικά των συνθετικών αντιοξειδωτικών, για τη σταθεροποίηση τροφίμων ευαίσθητων στο οξυγόνο.

Όπως αναφέρθηκε, τα εκχυλίσματα του φυτού μπορούν να έχουν και αρωματικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε πολλές περιπτώσεις και οι δύο αυτές λειτουργίες του κρίνονται απαραίτητες σε ένα τρόφιμο, όμως σε άλλες περιπτώσεις εκχυλίσματα πωλούνται κυρίως για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Έτσι, λοιπόν, οι διεργασίες στις οποίες υπόκειται το εκχύλισμα δενδρολίβανου μπορούν να βελτιστοποιηθούν έτσι ώστε να ενισχύεται η αντιοξειδωτική του δράση και να μειώνονται οι αρωματικές του ιδιότητες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αυτά τα προϊόντα θα πρέπει να θεωρούνται πρόσθετα τροφίμων (Aguilar et al, 2008).

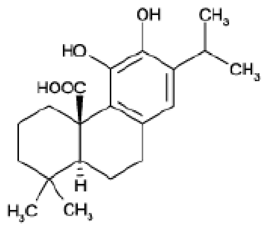
Τα εκχυλίσματα δενδρολίβανου μπορεί να περιέχουν αρκετά συστατικά που έχουν καλή αντιοξειδωτική δράση. Αυτές οι ενώσεις ανήκουν κυρίως στις τάξεις των φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών, διτερπενίων και τριτερπενίων. Οι κύριες αντιοξειδωτικές ενώσεις που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα δενδρολίβανου είναι τα φαινολικά διτερπένια καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ, καθώς και το ροσμαρινικό οξύ των οποίων η δομή φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



ροσμαριvικό οξύ



καρvοσόλη



καρvοσικό οξύ

Σχήμα 2.10 Χημική δομή των κύριων αντιοξειδωτικών ενώσεων των εκχυλισμάτων δενδρολίβανου

Η εκχύλιση αποξηραμένων φύλλων δενδρολίβανου δίνει ένα σχεδόν άχρωμο, πτητικό έλαιο. Η χημική σύσταση του ελαίου εξαρτάται από την περιοχή ανάπτυξης του φυτού. Η κατανομή των διτερπενίων, των φλαβονών και του ροσμαρινικού οξέος μπορεί επίσης να ποικίλει κατά την ανάπτυξη φύλλων, ανθών, μίσχων και ριζών του *Rosmarinus officinalis*(Aguilar et al, 2008).

Σύμφωνα με τους Navarrete et al (2011) είναι δυνατή η παραλαβή αντιοξειδωτικών με εκχύλιση με διαλύτη, από δενδρολίβανο από το οποίο έχει παραληφθεί νωρίτερα το αιθέριο έλαιο. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι οι ρυθμοί μεταφοράς μάζας αντιοξειδωτικών από τα φύλλα του δενδρολίβανου αυξήθηκαν ως αποτέλεσμα της προηγούμενης συλλογής του αιθέριου ελαίου. Αυτό σημαίνει ότι η τροποποιήσεις που υπέστη η δομή του φυτού κατά τη διάρκεια της κατεργασίας του για απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου ευνοεί την μεταφορά μάζας των αντιοξειδωτικών.

Οι Gómez-Estaca et al (2007) πραγματοποίησαν πείραμα στο οποίο έγινε επικάλυψη καπνιστής σαρδέλας με ζελατίνη στην οποία προστέθηκαν υδατικά εκχυλίσματα ρίγανης και δενδρολίβανου. Παρ’ ότι το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά της ρίγανη ήταν πολύ υψηλότερο από αυτό του δενδρολίβανου (2-5 φορές μεγαλύτερο), εντούτοις η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ισχύος στα επικαλυμμένα με ρίγανη και δενδρολίβανο δείγματα έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Αυτό είναι ενδεικτικό των ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών στη φύση των φαινολικών συστατικών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα των δύο αυτών φυτών. Οι Camo et al (2008) επικάλυψαν αρνίσιες μπριζόλες με ενεργά φιλμ στα οποία έγινε προσθήκη εκχυλισμάτων ρίγανης και δενδρολίβανου, ενώ σε μία τρίτη σειρά δειγμάτων ψεκάστηκε απευθείας το εκχύλισμα δενδρολίβανου. Οι μετρήσεις TBARs έδειξαν ότι οι μπριζόλες που ψεκάστηκαν και αυτές που ήταν επικαλυμμένες με ενεργό φιλμ με εκχύλισμα ρίγανης είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δεν έφτασαν τα 2mg/kg κρέατος, παρέχοντας έτσι αντιοξειδωτική δράση περίπου στο 60%.

Εκχύλιση δενδρολίβανου

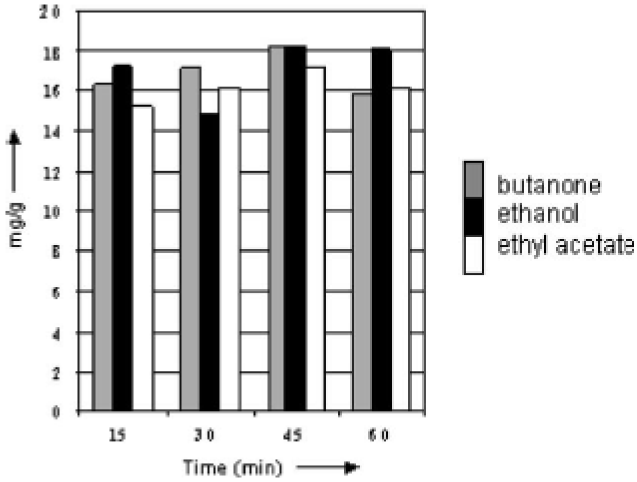
Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης, όπως εκχύλιση με διαβροχή (maceration extraction), εκχύλιση Soxhlet και εκχύλιση με ανάδευση (stirring extraction) αποτελούσαν τις κατεξοχήν μεθόδους εκχύλισης για απομόνωση καρνοσικού και ροσμαρινικού οξέος. Υπάρχουν όμως αρκετά μειονεκτήματα σε αυτές τις μεθόδους, όπως το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται πτητικοί και επικίνδυνοι διαλύτες , οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης και οι μεγάλες ενέργειες ανάκτησης (Zu et al, 2012).

Από την άλλη, τα πλεονεκτήματα της χρήσης υπερήχων για την εκχύλιση φυτών έχουν αποδειχθεί τόσο στην φαρμακολογία όσο και στη βιομηχανία τροφίμων. Η επιλογή διαλύτη για την εκχύλιση ενός αρωματικού φυτού, εξαρτάται από τις ενώσεις που χρειάζεται να παραληφθούν. Ο αριθμός οργανικών διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκχύλιση αρωματικών φυτών είναι αρκετά περιορισμένος, ενώ συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύτες με σημείο βρασμού που δεν υπερβαίνει τους 80ºC. Για την επιλογή διαλύτη εξετάζονται διάφοροι παράγοντες, πάντα ανάλογα με τις ανάγκες και το επιθυμητό αποτέλεσμα που αναμένεται από μία εκχύλιση:

- πολικότητα
- σημείο βρασμού, το οποίο πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό έτσι ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί ο διαλύτης από το προϊόν
- δραστικότητα: ο διαλύτης δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με το εκχύλισμα, ούτε και να διασπάται εύκολα
- ιξώδες, το οποίο πρέπει να είναι χαμηλό
- ασφάλεια κατά τη χρήση, δηλαδή ο διαλύτης θα πρέπει, εάν είναι δυνατόν, να μην είναι εύφλεκτος, να μην είναι τοξικός και η απόρριψή του να μην επιβαρύνει το περιβάλλον
- καταλληλότητα για επαναχρησιμοποίηση
- κόστος και διαθεσιμότητα

Η αποτελεσματικότητα των υπερήχων στην εκχύλιση, μπορεί να αποδοθεί στην ενίσχυση της μεταφοράς μάζας που προκύπτει από την κατάρρευση των φυσαλίδων σπηλαίωσης κοντά στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι υπέρηχοι μπορούν να σπάσουν το κυτταρικό τοίχωμα και σαν αποτέλεσμα ο διαλύτης έρχεται ευκολότερα σε επαφή με το φυτικό υλικό. Επίσης, το γεγονός της κατάρρευσης των φυσαλίδων σπηλαίωσης βοηθάει στο να εισχωρήσει ο διαλύτης μέσα στο κύτταρο και να διαλυτοποιήσει τις ενώσεις που χρειάζονται (Albu et al, 2004).

Οι Albu et al (2004), δοκίμασαν εκχύλιση αποξηραμένου δενδρολίβανου σε λουτρό υπερήχων με διάφορους διαλύτες και σύγκριναν αποδόσεις. Τα αποτελέσματα από εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων στους 50ºC με διαλύτες βουτανόνη, αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα για συλλογή καρνοσικού οξέος παρουσιάζονται στο σχήμα 2.11. Όπως φαίνεται στο σχήμα, η αιθανόλη είχε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.



Σχήμα 2.12 Συγκέντρωση καρνοσικού οξέος από αποξηραμένο δενδρολίβανο με χρήση λουτρού υπερήχων

3. ΕΔΩΔΙΜΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΚΑΛΥΤΠΙΚΑ

3.1 Εισαγωγή

Κάθε είδος υλικού που χρησιμοποιείται για την επικάλυψη τροφίμου ώστε να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να καταναλωθεί μαζί με το τρόφιμο ονομάζεται εδώδιμη μεμβράνη ή επικαλυπτικό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι όροι φιλμ και επικαλυπτικό χρησιμοποιούνται για να δηλώσουν ότι η επιφάνεια ενός τροφίμου είναι καλυμμένη από ένα σχετικά λεπτό στρώμα υλικού συγκεκριμένης σύνθεσης (Bourtoom, 2008). Συνήθως, βέβαια, το φιλμ διαφοροποιείται σαν έννοια από το επικαλυπτικό, καθώς το ένα σχηματίζεται ανεξάρτητα και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως υλικό περιτυλίγματος, ενώ το άλλο απλώνεται και σχηματίζεται απευθείας στην επιφάνεια του τροφίμου (Varzakas & Tzia, 2016).

Με την αύξηση των συστημάτων μεταφοράς και διανομής καθώς και τις ανάγκες αποθήκευσης, τα τρόφιμα χρειάζονται αρκετό χρόνο για να φτάσουν το τραπέζι του καταναλωτή. Σε αυτό το χρονικό διάστημα τα προϊόντα αρχίζουν να αφυδατώνονται και να χάνουν την εμφάνιση, τη γεύση αλλά και τη θρεπτική τους αξία. Τα εδώδιμα φιλμ παρέχουν αντικατάσταση ή εμπλουτισμό των φυσικών στρωμάτων, για να αποφευχθεί η απώλεια υγρασίας , ενώ επιλεκτικά επιτρέπουν μία ελεγχόμενη ανταλλαγή σημαντικών αερίων, όπως το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το αιθυλένιο που εμπλέκονται στις διεργασίες αναπνοής. Ένα φιλμ ή μία επικάλυψη μπορούν να παρέχουν επίσης στειρότητα στην επιφάνεια του τροφίμου και να εμποδίσουν την απώλεια άλλων σημαντικών συστατικών. Συνήθως το πάχος τους είναι μικρότερο από 0.3 mm.

Εδώδιμα φιλμ και επικαλυπτικά, όπως κερί στην επιφάνεια διάφορων φρούτων, χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες για να εμποδίσουν την απώλεια υγρασίας, αλλά και για να δημιουργήσουν μία πιο λαμπερή επιφάνεια στο φρούτο για αισθητικούς σκοπούς. Αυτές οι πρακτικές ήταν αποδεκτές πολύ πριν γίνει κατανοητή η χημεία πίσω από αυτές και συνεχίζουν να πραγματοποιούνται ακόμα και σήμερα. Ο όρος «εδώδιμο φιλμ» έχει συσχετιστεί με εφαρμογές σε τρόφιμα μόλις τα τελευταία 50 χρόνια. Άλλες πρώιμες μέθοδοι διατήρησης τροφίμων ήταν το κάπνισμα και η διατήρηση τροφίμων σε κιβώτια με πάγο ή σε υπόγεια κελάρια. Σήμερα, για την ασφαλή διατήρηση των τροφίμων χρησιμοποιούνται διάφορες μοντέρνες μέθοδοι όπως ψύξη, αποθήκευση σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα και αποστείρωση με υπεριώδη και γάμμα ακτινοβολία. Ωστόσο, για πολλά είδη τροφίμων, η επικάλυψη και χρήση εδώδιμων φιλμ συνεχίζει να είναι μία από τις λιγότερο κοστοβόρες μεθόδους διατήρησης της ποιότητας και της ασφάλειας (Bourtoom, 2008).

Κύρια πλεονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών από άλλες παραδοσιακές μη εδώδιμες συσκευασίες είναι τα εξής (Varzakas & Tzia, 2016):

- Οι μεμβράνες καταναλώνονται μαζί με το τρόφιμο, κάτι το οποίο τις καθιστά την ιδανική για το περιβάλλον συσκευασία
- Ακόμη και αν οι μεμβράνες δεν μπορούν να καταναλωθούν, και πάλι συμβάλλουν στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Οι μεμβράνες παρασκευάζονται αποκλειστικά από ανανεώσιμα, εδώδιμα υλικά και γι' αυτό αναμένεται να διασπαστούν νωρίτερα από πολυμερή υλικά
- Οι μεμβράνες με ενσωματωμένα συστατικά μπορούν να ενισχύσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων που επικαλύπτουν
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επικάλυψη μεμονωμένων μερίδων τροφίμων, για τα οποία είναι αδύνατη η συσκευασία για πρακτικούς λόγους.

3.2 Χρήση εδώδιμων μεμβρανών

Τα εδώδιμα φιλμ που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα έχουν πολλές χρησιμότητες, ακόμα κι αν αυτό ο καταναλωτής δεν μπορεί να το συνειδητοποιήσει. Τη γυαλιστερή επιφάνεια ενός μήλου στο σούπερ μάρκετ δεν του την παρείχε η φύση. Πολλά γλυκά (όπως οι καραμέλες M&Ms) έχουν κάποιο επικαλυπτικό που τους αυξάνει τη διάρκεια ζωής και τους προσφέρει το χαρακτηριστικό γυάλισμα της επιφάνειας. Πολλά φαρμακευτικά χάπια είναι καλυμμένα με επικαλυπτικό για να αποφευχθεί ο θρυμματισμός τους, για να μην αντιληφθεί ο καταναλωτής την πικρή τους γεύση πριν την κατάποση αλλά και για να ελεγχθεί ο χρόνος κατά τον οποίο θα ελευθερωθεί η φαρμακευτική ουσία. Ακόμα και οι τηγανιτές πατάτες συχνά έχουν μία επικάλυψη για να είναι προστατευμένες κατά την αποθήκευσή τους, πριν το τηγάνισμα.

Τα επικαλυπτικά και τα φιλμ μπορούν να ενισχύσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των επικαλυμμένων τροφίμων στην περίπτωση που είναι ενισχυμένα με ορισμένα συστατικά (γλυκαντικά, άρωμα, χρωστικές κ.α.). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για επικάλυψη μικρών ποσοτήτων τροφίμων, ιδιαίτερα για τρόφιμα τα οποία δεν συσκευάζονται μεμονωμένα για πρακτικούς λόγους, όπως είναι τα αχλάδια, τα φασόλια, τα καρύδια και οι φράουλες. (Bourtoom, 2008).

Τα εδώδιμα φιλμ μπορεί να προσδώσουν διάφανη ή αδιαφανή επικάλυψη, όμως οι καταναλωτές προτιμούν τις διαφανείς επικαλύψεις. Τα επικαλυπτικά μπορούν να εφαρμοστούν στα τρόφιμα με διάφορους τρόπους:

- βυθίζοντας το προϊόν, απλώνοντας ή ψεκάζοντας πάνω σε αυτό το διάλυμα που περιέχει συστατικά φιλμ, έτσι ώστε το φιλμ να εφαρμόζεται απευθείας πάνω στην επιφάνεια του προϊόντος
- δημιουργώντας ανεξάρτητη μεμβράνη από διάλυμα είτε μέσω θερμοδιαμόρφωσης για επικάλυψη του τροφίμου

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα χαρακτηριστικά των φιλμ μπορεί να διαφέρουν από τα επικαλυπτικά διαλύματα, τα οποία απλώνονται ή ψεκάζονται πάνω στο τρόφιμο. Για παράδειγμα τα φιλμ που παράγονται από διάλυμα με εξάτμιση έχουν χαμηλότερη διαπερατότητα σε νερό από τα επικαλυπτικά που παρασκευάζονται με ψεκασμό.

Η πιο απλή μέθοδος εφαρμογής ενός φιλμ είναι σε μορφή επικαλυπτικού. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του επικαλυπτικού διαλύματος, το προϊόν θα απορροφήσει μία κατάλληλη ποσότητα επικαλυπτικού απαραίτητη για να δημιουργήσει το επιθυμητό στρώμα, το οποίο όταν στεγνώσει, θα δημιουργήσει ένα προστατευτικό στρώμα στην επιφάνεια του τροφίμου.

Γενικά μία εδώδιμη μεμβράνη πρέπει να παρουσιάζει ιδανικά τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Απουσία τοξικών, αλλεργιογόνων και μη εύπεπτων συστατικών
- Να παρέχει δομική σταθερότητα και να προστατεύει από φθορές κατά τη μεταφορά, το χειρισμό και την έκθεση του τροφίμου
- Να έχει καλή πρόσφυση στην επιφάνεια του τροφίμου και να παρέχει ομοιόμορφη κάλυψη
- Να ελέγχει τη μεταφορά νερού τόσο εντός όσο και εκτός του προστατευμένου τροφίμου για διατήρηση της επιθυμητής περιεχόμενης υγρασίας
- Να παρέχει ημι-διαπερατότητα για διατήρηση της εσωτερικής ισορροπίας των αερίων που εμπλέκονται στην αερόβια και αναερόβια αναπνοή
- Να μην επιτρέπει απώλεια συστατικών που σταθεροποιούν το άρωμα, τη γεύση, τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά απαραίτητα για να είναι το τρόφιμο αποδεκτό από τον καταναλωτή
- Να παρέχει βιοχημική και μικροβιακή σταθερότητα στην επιφάνεια και να προστατεύει από ρύπανση, μόλυνση και άλλα είδη φθοράς
- Να διατηρεί ή και να ενισχύει τα αισθητικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (π.χ. εμφάνιση, γεύση)
- Να μπορούν να ενσωματωθούν σε αυτό επιθυμητά πρόσθετα όπως γεύση, άρωμα, χρώμα, θρεπτικά συστατικά και βιταμίνες. Επίσης η ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων μπορεί να περιοριστεί στην επιφάνεια του τροφίμου, μειώνοντας έτσι το κόστος αλλά και τυχόν παρέμβαση στη γεύση του επικαλυμμένου τροφίμου
- Να μπορεί να παρασκευαστεί εύκολα και οικονομικά

3.3 Συστατικά εδώδιμων μεμβρανών

Τα κύρια συστατικά των καθημερινών τροφίμων που καταναλώνει ο άνθρωπος (π.χ. πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και λιπίδια) πληρούν τις απαιτήσεις για την προετοιμασία εδώδιμων μεμβρανών. Σαν γενικός κανόνας, τα λίπη χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό της μεταφοράς νερού, οι πολυσακχαρίτες για έλεγχο μεταφοράς οξυγόνου και άλλων αερίων, ενώ οι μεμβράνες από πρωτεΐνες παρέχουν μηχανική σταθερότητα. Αυτά τα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ή συνδυαστικά, αρκεί να μην αλλάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου στο οποίο εφαρμόζονται. Κάτι στο οποίο πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή όταν μιλάει κανείς για επικάλυψη τροφίμου, είναι τα παραγόμενα επικαλυπτικά να έχουν φυσικές και χημικές ιδιότητες τέτοιες ώστε να εξασφαλίζεται η μεταφορά αερίων και υγρών όπως συμβαίνει και στο φυσικό περιβάλλον των τροφίμων αυτών.

Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η παρουσία πλαστικοποιητή έτσι ώστε το φιλμ να μην είναι εύθραυστο. Πλαστικοποιητές κατάλληλοι για τρόφιμα είναι η γλυκερόλη, η μαννιτόλη, η σορβιτόλη και η σουκρόζη.

Τα εδώδιμα φιλμ μπορούν να παραχθούν από υλικά τα οποία έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής, τα υλικά των μεμβρανών πρέπει να διαλυθούν σε ένα διαλύτη όπως νερό, αλκοόλη ή μίγμα αυτών. Σε αυτή τη διεργασία γίνεται και η προσθήκη πλαστικοποιητών, αντιμικροβιακών παραγόντων, χρωστικών και αρωμάτων. Προσαρμογή του pH και θέρμανση των διαλυμάτων αυτών οδηγούν σε καλύτερη και πιο ομοιόμορφη διασπορά των συστατικών. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό είτε απλώνεται σε κατάλληλα δισκία και αποθηκεύεται σε κατάλληλη θερμοκρασία και σχετική υγρασία για να σχηματίσει μεμβράνες, είτε χρησιμοποιείται ως επικαλυπτικό διάλυμα (Bourtoom, 2008). Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την ετοιμασία εδώδιμων μεμβρανών μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: υδροκολλοειδή (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, αλγινικά, πηκτίνες, άμυλο), λίπη (όπως λιπαρά οξέα, ακυλογλυκερόλη και κηροί) και σύνθετα (Varzakas & Tzia, 2016).

3.3.1 Επικαλυπτικά από Πολυσακχαρίτες

Στους πολυσακχαρίτες που χρησιμοποιούνται για εδώδιμα φιλμ και επικαλυπτικά περιλαμβάνονται η κυτταρίνη, παράγωγα αμύλου, παράγωγα πηκτίνης, εκχυλίσματα φυκιών, κόμμεα μικροβιακής ζύμωσης και η χιτοζάνη. Οι πολυσακχαρίτες είναι ιδιαίτερα υδρόφιλοι με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εμποδίσουν τη μεταφορά υδρατμών και άλλων αερίων. Παρ' όλα αυτά μπορούν να λειτουργήσουν ως επιβραδυντικοί παράγοντες, καθυστερώντας την απώλεια υγρασίας από τρόφιμα.

3.3.1.1 Κυτταρίνη και παράγωγά της

Η κυτταρίνη αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Έχει μερικώς κρυσταλλική δομή και είναι αδιάλυτη στο νερό. Οι αιθέρες της κυτταρίνης, όπως η μεθυλοκυτταρίνη (MC), η υδροξυπροπυλοκυτταρίνη (HPC), η υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) και η καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) από την άλλη, παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα στο νερό. Μεμβράνες από MC, HPMC, HPC και CMC παρουσιάζουν αρκετά ικανοποιητικά χαρακτηριστικά. Είναι άοσμες, άγευστες, εύκαμπτες, διαφανείς, μέτριας αντοχής, υδατοδιαλυτές, ανθεκτικές σε έλαια και λίπη και μέτριες στη μεταφορά υγρασίας και οξυγόνου.

Το MC είναι το πιο ανθεκτικό στο νερό και το λιγότερο υδρόφιλο παράγωγο της κυτταρίνης. Παρ' όλα αυτά η διαπερατότητά του σε υδρατμούς είναι αρκετά υψηλή. Τα MC και HPMC έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού ζελατινοειδούς επικαλυπτικού και έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθυστερήσουν την απορρόφηση ελαίου σε τηγανισμένα τρόφιμα. Το MC θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως επικαλυπτικό σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής με σκοπό να παρεμποδίσει τη μετανάστευση λιπιδίων (Bourtoom, 2008).

3.3.1.1.1 Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC)

Το CMC είναι ένα πολυμερές σημαντικό για τη βιομηχανία με ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως σε κροκιδώσεις, στην παραγωγή απορρυπαντικών, υφασμάτων, χαρτιού, τροφίμων ακόμη και φαρμάκων. Το CMC είναι ένα παράγωγο της κυτταρίνης και σχηματίζεται από την αντίδρασή της με υδροξείδιο του νατρίου και χλωροοξικό οξύ. Οι ομάδες CH_2COONa που αποκτά η κυτταρίνη προσδίδουν διαλυτότητα στο νερό (Biswal & Singh, 2004). Η διαλυτότητά του στο νερό σε συνδυασμό με τη συμβατότητά του με άλλα μόρια, το καθιστά ιδανικό για σχηματισμό επικαλυπτικού (Tharanathan, 2003). Οι διάφορες ιδιότητες του CMC εξαρτώνται από τρεις παράγοντες: το μοριακό βάρος του πολυμερούς, τον μέσο αριθμό καρβοξυλίων ανά μονάδα γλυκόζης και την κατανομή των καρβοξυλίων στο μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς. Οι κυριότερες ιδιότητες του CMC είναι η αύξηση του ιξώδους και η κροκίδωση. Από όλους τους πολυσακχαρίτες είναι το πιο εύκολα προσβάσιμο και το πιο φθηνό (Biswal & Singh, 2004). Έχει βρεθεί ότι CMC μεμβράνες έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την ποσότητα ελαίου που απορροφάται κατά το τηγάνισμα τροφίμων (Tharanathan, 2003).

3.3.1.2 Χιτίνη και Χιτοζάνη

Η χιτίνη είναι το δεύτερο, μετά την κυτταρίνη, πιο άφθονο, φυσικά απαντώμενο βιοπολυμερές και συναντάται στον εξωσκελετό των Μαλακόστρακων, στο κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων και σε άλλα βιολογικά υλικά. Η χιτοζάνη προκύπτει με αποακετυλίωση της χιτίνης σε αλκαλικό περιβάλλον. Γι' αυτό η χιτοζάνη χαρακτηρίζεται ως συμπολυμερές. Οι διάφορες χιτοζάνες χαρακτηρίζονται από το βαθμό της αποακετυλίωσης καθώς και το μέσο μοριακό βάρος, ενώ η σημασία τους έγκειται στις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους σε συνδυασμό με την κατιονικότητα και τις ιδιότητες σχηματισμού μεμβρανών.

Η χιτοζάνη μπορεί να σχηματίσει ημι-διαπερατά επικαλυπτικά, τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν την εσωτερική επικρατούσα ατμόσφαιρα, καθυστερώντας, έτσι, την ωρίμανση και μειώνοντας τους ρυθμούς διαπνοής σε φρούτα και λαχανικά. Τα επικαλυπτικά από υδατικό διάλυμα χιτοζάνης είναι διαφανή, εύκαμπτα, με μεγάλη αντοχή και καλοί παρεμποδιστές του οξυγόνου. Η διαπερατότητα του διοξειδίου του άνθρακα σε αυτά τα επικαλυπτικά θα μπορούσε να βελτιωθεί με μεθυλίωση του πολυμερούς. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά την αποθήκευσή τους, οι μεμβράνες από χιτοζάνη είναι σχετικά σταθερές, ενώ οι μηχανικές ιδιότητες και οι ιδιότητες φραγής άλλαζαν σε μικρό βαθμό κατά την αποθήκευση (Bourtoom, 2008). Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ευρέως σε μεμβράνες και επικαλυπτικά, εξαιτίας της ικανότητάς της να αναστέλλει την ανάπτυξη ποικίλων βακτηρίων και παθογόνων μυκήτων. (Falguera et al, 2011). Επικαλυπτικά από χιτοζάνη συνήθως χρησιμοποιούνται σε φρούτα και λαχανικά, όπως φράουλες, αγγούρια και πιπεριές ως αντιμικροβιακή επικάλυψη και σε μήλα, αχλάδια, ροδάκινα και δαμάσκηνα ως φράγμα αερίων (Bourtoom, 2008). Παρ' όλα αυτά η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη λόγω του μεγάλου κόστους για την παρασκευή τους (Bonilla et al, 2013).

3.3.1.3 Καραγεννάνη

Οι καραγεννάνες είναι φυσικά, υδατοδιαλυτά πολυμερή με μία γραμμική αλυσίδα θειωμένων γαλακτανών. Αυτοί οι θειωμένοι πολυσακχαρίτες εξάγονται από τα κυτταρικά τοιχώματα ορισμένων ειδών κόκκινων φυκιών (Shit & Shah, 2014). Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι καραγεννάνης: η κ, ι και λ-καραγεννάνη. Η λ-καραγεννάνη δεν σχηματίζει τζελ και χρησιμοποιείται μόνο για την αύξηση του ιξώδους σε διαλύματα (Tavassoli-Kafrani et al, 2016). Η δημιουργία μεμβράνης από καραγεννάνη περιλαμβάνει μηχανισμό ζελατινοποίησης κατά τη διάρκεια ξήρανσης, οδηγώντας έτσι σε σταθερά φιλμ μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Μεμβράνες από καραγεννάνη βρέθηκε ότι είναι λιγότερο αδιαφανείς σε σύγκριση με αυτές που φτιάχνονται από άμυλο (Shit & Shah, 2014). Η καραγεννάνη όμως χρησιμοποιείται κυρίως ως επικαλυπτικό και όχι για σχηματισμό εδώδιμων μεμβρανών. Εφαρμόζεται κυρίως σε φρούτα και κρέας (Tavassoli-Kafrani et al, 2016).

3.3.1.4 Πηκτίνη

Η πηκτίνη είναι ένα από τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων των φυτών, συμβάλλοντας στην ακεραιότητα και την ακαμψία του ιστού και θεωρείται ένα από τα πιο σύνθετα μακρομόρια στη φύση. Οι κύριες βιομηχανικές πηγές για εκχύλιση πηκτίνης είναι φλούδες μήλου και κίτρου. Χημικά, η πηκτίνη αποτελείται από γαλακτουρονικά οξέα με ποικίλους βαθμούς μεθυλίωσης υπολειμμάτων καρβοξυλικών οξέων. Η μεθυλίωση επιτυγχάνεται με εστεροποίηση με μεθανόλη και καρβοξυλομάδες του γαλακτουρονικού οξέος. Ανάλογα με το βαθμό εστεροποίησης με μεθανόλη η πηκτίνη κατατάσσεται ως πηκτίνη υψηλής περιεκτικότητας σε μεθοξύλια (HMP) και πηκτίνη χαμηλής περιεκτικότητας σε μεθοξύλια (LMP). Η HMP έχει εστεροποιημένες πάνω από 50% των καρβοξυλομάδων ενώ η LMP λιγότερες από 50%. Ο βαθμός εστεροποίησης επηρεάζει την ικανότητα δημιουργίας τζελ. Έχει δοκιμαστεί η παραγωγή εδώδιμων μεμβρανών από πηκτίνη. Για την παρασκευή τους είναι απαραίτητη η παρουσία πλαστικοποιητή. Τα επικαλυπτικά από πηκτίνη είναι βιοαποδομήσιμα, φθηνά στην παρασκευή τους και σε συνδυασμό με βιοδραστικές ουσίες, οι μεμβράνες παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Pérez Espitia et al, 2014).

3.3.1.5 Άμυλο

Το άμυλο είναι μία άλλη πρώτη ύλη σε αφθονία, ιδιαίτερα από το καλαμπόκι και παρουσιάζει θερμοπλαστικές ιδιότητες (Tharanathan, 2003). Το άμυλο είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από πολλές μονάδες γλυκόζης. Δεν είναι ομοιόμορφο υλικό. Τα περισσότερα άμυλα περιλαμβάνουν δύο τύπους πολυμερών γλυκόζης: μία γραμμική αλυσίδα που ονομάζεται αμυλάση και ένα διακλαδισμένο πολυμερές της γλυκόζης που ονομάζεται αμυλοπηκτίνη. Το άμυλο χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία τροφίμων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοδιασπώμενων μεμβρανών για να αντικατασταθούν μερικώς ή και εξ ολοκλήρου τα πλαστικά πολυμερή. Έχει επίσης χαμηλό κόστος και τα επικαλυπτικά που σχηματίζει παρουσιάζουν καλές μηχανικές ιδιότητες. Άμυλο με μεγάλη περιεκτικότητα σε αμυλάση, όπως το άμυλο καλαμποκιού, είναι μία καλή πηγή για σχηματισμό επικαλυπτικών, όπου μεμβράνες μπορούν να παραχθούν από υδατικά διαλύματα ζελατινοποιημένης αμυλάσης (Bourtoom, 2008). Οι μεμβράνες με μεγάλη περιεκτικότητα σε αμυλάση έχουν μεγάλη αντοχή και είναι εύκαμπτες. Από την άλλη η αμυλοπηκτίνη περιορίζει αρκετά τις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης (Tharanathan, 2003). Να αναφερθεί ότι ένα τυπικό άμυλο καλαμποκιού αποτελείται από 25% αμυλάση και 75% αμυλοπηκτίνη (Bourtoom, 2008).

3.3.1.6 Άλατα αλγινικού οξέως

Το άλας αλγινικού οξέως είναι ένας υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης που μπορεί να σχηματίσει επικαλυπτικό και έχει μεγάλο ενδιαφέρον επειδή είναι μη τοξική, βιοαποδομήσιμη, βιοσυμβατή και με χαμηλό κόστος. Εξάγεται από φύκια και λόγω της γραμμικής του δομής, μπορεί να σχηματίσει μεμβράνες με μεγάλη αντοχή γι’ αυτό και θεωρείται καλό υλικό για σχηματισμό εδώδιμων μεμβρανών. Σημαντική ιδιότητα του άλατος είναι ότι μπορεί να αντιδράσει με ιόντα ασβεστίου και να σχηματίσει έτσι τζελ. Έτσι, λοιπόν, οι ιδιότητες του φιλμ όπως μηχανικές αντοχές και παρεμποδιστική ικανότητα εξαρτώνται από αυτή την ιδιότητα του άλατος. (Tavassoli-Kafrani et al, 2016).

3.3.2 Επικαλυπτικά από Λιπίδια

Τα λιπίδια που χρησιμοποιούνται ως προστατευτικά επικαλυπτικά είναι ακετυλιωμένα μονογλυκερίδια, φυσικοί κηροί και επιφανειοδραστικές ουσίες. Κύρια λειτουργία των μεμβρανών από λιπίδια είναι η παρεμπόδιση της μεταφοράς υγρασίας εξαιτίας της σχετικά χαμηλής πολικότητάς τους. Από την άλλη, τα υδρόφοβα χαρακτηριστικά τους καθιστούν τις μεμβράνες παχύτερες και πιο εύθραυστες. Συνεπώς, τα επικαλυπτικά από λιπίδια πρέπει να συνδυάζονται με εκείνα από πρωτεΐνες ή παράγωγα κυτταρίνης. Συνήθως συνδυάζονται με μία δομή πολυμερούς, έναν πολυσακχαρίτη, ο οποίος τους παρέχει μηχανικές αντοχές.

3.3.2.1 Κηροί

Η παραφίνη παραλαμβάνεται από ένα κλάσμα απόσταξης ακατέργαστου πετρελαίου και αποτελείται από ένα μίγμα στερεών υδρογονανθράκων που προέρχονται από πολυμερισμό αιθυλενίου. Η χρήση του κηρού παραφίνης επιτρέπεται σε φρούτα, λαχανικά και τυριά. Γενικά οι κηροί χρησιμοποιούνται ως μεμβράνες για να αποτρέπουν τη μεταφορά αερίων και υγρασίας αλλά και για να βελτιώνουν την εμφάνιση της επιφάνειας σε διάφορα τρόφιμα. Εάν εφαρμοστεί παχύ στρώμα κηρού σε τρόφιμο, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί πριν την κατανάλωση του τροφίμου (όπως συμβαίνει σε ορισμένα τυριά). Εάν, όμως, ένα τρόφιμο είναι επικαλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα κηρού, τότε θεωρείται εδώδιμη η μεμβράνη αυτή. Οι κηροί αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές ενώσεις σε ότι αφορά την παρεμπόδιση μεταφοράς υγρασίας (Bourtoom, 2008). Άλλοι κηροί που χρησιμοποιούνται ως επικαλυπτικά είναι οι κηροί πολυαιθυλενίου οι οποίοι χρησιμοποιούνται για παρασκευή επικαλυπτικών γαλακτωμάτων, ο καρναουβικός κηρός ο οποίος προσδίδει αντοχές και αύξηση σημείου τήξεως μετά από ανάμειξη με άλλου κηρούς κλπ (Varzakas & Tzia, 2016).

3.3.2.2 Ακετογλυκερίδια

Αλκοόλες με πολλά άτομα άνθρακα, όπως η στεατυλική αλκοόλη (stearyl alcohol, $C_{18}H_{38}O$), χρησιμοποιούνται συχνά ως πρόσθετα σε εδώδιμα επικαλυπτικά εξαιτίας του υψηλού σημείου τήξης και των υδροφοβικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν. Τα περισσότερα λιπίδια στη στερεή τους κατάσταση μπορούν να επιμηκυνθούν σε ένα ποσοστό 102% του αρχικού τους μήκους. Η ακετυλιωμένη μονοστεατική γλυκερόλη όμως μπορεί να επιμηκυνθεί σε 800% του αρχικού της μήκους. Οι ικανότητες συγκράτησης της ακετυλιωμένης μονοστεατικής γλυκερόλης αυξάνονται όσο αυξάνεται ο βαθμός ακετυλίωσης (Varzakas & Tzia, 2016).

3.3.3 Επικαλυπτικά από Πρωτεΐνες

Στη φυσική τους κατάσταση οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στις ινώδεις πρωτεΐνες, οι οποίες είναι αδιάλυτες στο νερό και αποτελούν το κύριο δομικό υλικό των ζωικών ιστών και στις σφαιρικές πρωτεΐνες που είναι διαλυτές στο νερό και σε υδατικά διαλύματα οξέων, βάσεων και αλάτων. Διάφορες σφαιρικές πρωτεΐνες, όπως γλουτένη σιταριού, ζεΐνη καλαμποκιού, πρωτεΐνη σόγιας και πρωτεΐνη ορού γάλακτος, έχουν εξεταστεί για τις ιδιότητές τους ως μεμβράνες. Γενικά οι πρωτεϊνικές μεμβράνες σχηματίζονται από διαλύματα ή διασπορές των πρωτεϊνών, αφότου ο διαλύτης/φορέας εξατμιστεί. Οι διαλύτες/φορείς που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι νερό, αιθανόλη ή μίγμα νερού-αιθανόλης.

Γενικά οι πρωτεΐνες πρέπει να μετουσιωθούν με χρήση θερμότητας ή διαλυτών και με αλλαγή του pH προκειμένου να σχηματίσει πιο επιμηκυμένες δομές, απαραίτητες για σχηματισμό μεμβρανών. Μετά τον σχηματισμό τους, οι αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και ιοντικούς δεσμούς. Πολυμερή τα οποία περιέχουν ομάδες που ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου και ιοντικούς δεσμούς, σχηματίζουν μεμβράνες που είναι πολύ καλοί παρεμποδιστές του οξυγόνου αλλά και ευπαθείς στην υγρασία. Έτσι, τα πρωτεϊνικά επικαλυπτικά αναμένεται να είναι καλού παρεμποδιστές του οξυγόνου σε χαμηλή σχετική υγρασία. Πολλοί τύποι πρωτεϊνών έχουν δοκιμαστεί και χρησιμοποιηθεί για σχηματισμό εδώδιμων μεμβρανών. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ζελατίνη, η καζεΐνη, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος, η ζεΐνη καλαμποκιού και η πρωτεΐνη σόγιας (Bourtoom, 2008).

3.3.3.1 Ζελατίνη

Η ζελατίνη παραλαμβάνεται από ελεγχόμενη υδρόλυση του κολλαγόνου, το οποίο αποτελεί κύριο συστατικό του δέρματος, των οστών και του συνδετικού ιστού. Η ζελατίνη σχηματίζεται από μία μοναδική ακολουθία αμινοξέων. Κύριο χαρακτηριστικό της ζελατίνης είναι η υψηλή περιεκτικότητά της στα αμινοξέα γλυκίνη, προλίνη και υδροξυπρολίνη. Περίπου στους 40ºC τα υδατικά διαλύματα ζελατίνης είναι σε κολλοειδή κατάσταση και σχηματίζουν πήγμα κατά την ψύξη. Η ζελατίνη χρησιμοποιείται για τον εγκλεισμό συστατικών τροφίμων με χαμηλή υγρασία ή ελαιώδους φάσης, καθώς και φαρμακευτικές ουσίες. Έτσι εξασφαλίζεται προστασία έναντι του οξυγόνου και του φωτός. Μεμβράνες από ζελατίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την επικάλυψη κρεάτων για μείωση μεταφοράς οξυγόνου, υγρασίας και ελαίου (Bourtoom, 2008).

3.3.3.2 Ζεΐνη καλαμποκιού

Η ζεΐνη αποτελεί την πιο σημαντική πρωτεΐνη στο καλαμπόκι και είναι σχετικά υδρόφοβη και θερμοπλαστική ουσία. Η υδρόφοβη φύση της σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητά της σε μη πολικά αμινοξέα. Η ζεΐνη παρουσιάζει πολύ καλές ιδιότητες ως επικαλυπτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή βιοαποδομήσιμων επικαλυπτικών. Μεμβράνες από ζεΐνη σχηματίζονται με σχηματισμό υδροφοβικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου και δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων της πρωτεΐνης. Εδώδιμες μεμβράνες ζεΐνης μπορούν να σχηματιστούν με ξήρανση υδατικών διαλυμάτων αιθανόλης της πρωτεΐνης. Η ζεΐνη διαλύεται σε 70-80% αιθανόλη. Οι σχηματιζόμενες μεμβράνες είναι σχετικά εύθραυστες, γι΄ αυτό και είναι απαραίτητη η παρουσία πλαστικοποιητή, ώστε το φιλμ να είναι πιο εύκαμπτο. Τα επικαλυπτικά από ζεΐνη είναι καλού παρεμποδιστές υδρατμών, σε σύγκριση με άλλα εδώδιμα επικαλυπτικά. Για να βελτιωθούν οι δυνατότητες των μεμβρανών αυτών ως παρεμποδιστές, γίνεται να προστεθούν λιπαρά οξέα. Επικαλυπτικά ζεΐνης έχουν δείξει μία ικανότητα στη μείωση της απώλειας υγρασίας αλλά και στην καθυστέρηση της αλλαγής του χρώματος σε φρέσκες τομάτες (Bourtoom, 2008).

3.3.3.3 Γλουτένη σιταριού

Η γλουτένη σιταριού είναι ένας γενικός όρος για τις αδιάλυτες στο νερό πρωτεΐνες του αλεύρου σιταριού το οποίο αποτελείται από ένα μίγμα πολυπεπτιδικών μορίων και θεωρούνται ως σφαιρικές πρωτεΐνες. Η συνεκτικότητα και η ελαστικότητα της γλουτένης διευκολύνουν το σχηματισμό μεμβράνης. Αν και αδιάλυτη στο νερό, διαλύεται σε υδατικά διαλύματα υψηλού ή χαμηλού pH και χαμηλής ιοντικής ισχύος. Εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να σχηματιστούν με ξήρανση υδατικών διαλυμάτων αιθανόλης της γλουτένης σίτου. Σημαντικά βήματα για το σχηματισμό δομής κατάλληλης για διαμόρφωση μεμβρανών είναι η διάσπαση των φυσικών δισουλφιδικών δεσμών κατά τη θέρμανση των επικαλυπτικών διαλυμάτων και στη συνέχεια ο σχηματισμός νέων δισουλφιδικών δεσμών αλλά και δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών δεσμών κατά την ξήρανση τους διαλύματος. Επίσης κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη πλαστικοποιητή όπως η γλυκερίνη για να αποκτήσουν τα φιλμ ευκαμψία. Παρ’ όλα αυτά, αύξηση της ευκαμψίας των φιλμ με χρήση σορβιτόλης οδηγεί σε μείωση της αντοχής, της ελαστικότητας και της ικανότητας παρεμπόδισης υδρατμών των φιλμ (Bourtoom, 2008).

3.3.3.4 Πρωτεΐνη σόγιας

Ο καρπός της σόγιας έχει μεγάλο περιεχόμενο σε πρωτεΐνες (38-44%) (Varzakas & Tzia, 2016). Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών της σόγιας είναι αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλύονται σε ουδέτερα διαλύματα αλάτων. Η πρωτεΐνη της σόγιας έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υπολείμματα ασπαραγίνης και γλουταμίνης. Εδώδιμες μεμβράνες βασισμένες σε πρωτεΐνη σόγιας μπορούν να παραχθούν με δύο τρόπους: επιφανειακός σχηματισμός φιλμ σε θερμαινόμενο γάλα σόγιας ή από διαλύματα υπερσυμπηκνωμάτων πρωτεΐνης σόγιας (Soy Protein Isolate, SPI). Για τον σχηματισμό μεμβρανών τόσο από γάλα σόγια όσο και από SPI ακολουθείται ο ίδιος μηχανισμός που περιγράφηκε παραπάνω για τις μεμβράνες από γλουτένη σίτου (Bourtoom, 2008). Μεμβράνες βασισμένες σε πρωτεΐνες αποτελούν καλό παρεμποδιστή στη μεταφορά οξυγόνου αλλά η ικανότητά τους να κατακρατούν νερό είναι περιορισμένη εξαιτίας της υδρόφιλης φύσης των πρωτεϊνών (Varzakas & Tzia, 2016).

3.3.3.5 Πρωτεΐνη γάλακτος

Το περιεχόμενο του γάλακτος σε πρωτεΐνες είναι περίπου 33 g/L. Ο ορός γάλακτος και η καζεΐνη αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες γάλακτος, με την καζεΐνη να αποτελεί το 80% όλων των πρωτεϊνών του γάλακτος. Η καζεΐνη αποτελείται κυρίως από φωσφοπρωτεΐνες οι οποίες καταβυθίζονται σε pH 4.6. Αποτελείται από τέσσερις κύριες ενώσεις: τις as1-, as2, β- και κ-καζεΐνες. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος διαλύονται σε pH 4.6. Υγρός ορός γάλακτος αποτελεί παραπροϊόν της παραγωγής τυριού και η ετήσια παραγωγή του συνεχώς αυξάνεται. Παρ’ όλα αυτά το μεγαλύτερο μέρος δε χρησιμοποιείται. Η υψηλή θρεπτική του αξία, η διαλυτότητα στο νερό καθώς και η ικανότητα δημιουργίας γαλακτωμάτων καθιστούν τις πρωτεΐνες γάλακτος ενδιαφέρον συστατικό για σχηματισμό εδώδιμων μεμβρανών (Varzakas & Tzia, 2016).

3.3.4 Σύνθετα επικαλυπτικά

Εδώδιμες μεμβράνες και επικαλυπτικά μπορεί να είναι ετερογενούς φύσης και να αποτελούνται από μίγματα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη χρήση των ξεχωριστών χαρακτηριστικών και πλεονεκτημάτων του κάθε υλικού που συμμετέχει στο σχηματισμό των επικαλυπτικών αυτών (Bourtoom, 2008). Για να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή, γίνονται προσπάθειες βελτιστοποίησης των σύνθετων φιλμ, ώστε να συνδυάζουν διαφάνεια με βέλτιστες μηχανικές ιδιότητες, έτσι ώστε να αντέχουν σε καταπονήσεις κατά τη μεταφορά των προϊόντων. Για παράδειγμα, για να ξεπεραστεί το πρόβλημα που παρουσιάζουν τα λιπίδια σε ότι αφορά τις μηχανικές τους ιδιότητες μπορούν να συνδυαστούν με υδρόφιλα υλικά, σχηματίζοντας γαλακτώματα. (Falguera et al, 2011). Συνδυασμοί μεταξύ πολυμερών προς παραγωγή μεμβρανών μπορούν να γίνουν από πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιπίδια, υδατάνθρακες και λιπίδια ή συνθετικά πολυμερή και φυσικά πολυμερή (Bourtoom, 2008).

Κύριος στόχος της προσπάθειας σχηματισμού σύνθετων επικαλυπτικών είναι η βελτίωση της διαπερατότητας και των μηχανικών ιδιοτήτων όπως προκύπτουν από τις ανάγκες ορισμένων εφαρμογών. Αυτά τα ετερογενή φιλμ εφαρμόζονται είτε με τη μορφή γαλακτωμάτων, εναιωρημάτων και διασποράς των μη αναμίξιμων συστατικών, είτε σε ανεξάρτητα στρώματα (δηλαδή δημιουργία πολυστρωματικής επικάλυψης), είτε, τέλος, με τη μορφή διαλύματος σε έναν κοινό διαλύτη. Ο τύπος εφαρμογής που χρησιμοποιείται επηρεάζει προφανώς τις ιδιότητες και την αποτελεσματικότητα του φιλμ (Bourtoom, 2008). Τα επικαλυπτικά από γαλακτώματα είναι λιγότερο αποτελεσματικά στο να ελέγχουν τη μεταφορά νερού καθώς είναι δύσκολο να επιτευχθεί ομοιογενής κατανομή λιπιδίων. Παρουσιάζουν όμως καλές μηχανικές ιδιότητες και παρασκευάζονται με απλό τρόπο, ενώ από την άλλη η παρασκευή πολυστρωματικών επικαλυπτικών είναι μία πολύπλοκη και ακριβή διαδικασία. (Falguera et al, 2011).

3.4 Ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε επικαλυπτικά και μεμβράνες

3.4.1 Εκχυλίσματα

Οι εδώδιμες μεμβράνες και τα επικαλυπτικά μπορούν να αυξήσουν την διάρκεια ζωής των τροφίμων. Η προσθήκη αντιοξειδωτικού στις μεμβράνες και τα επικαλυπτικά μπορεί να βελτιώσει την διατηρησιμότητα, να καθυστερήσει την αμαύρωση και να περιορίσει ανεπιθύμητες συνέπειες της οξείδωσης των θρεπτικών συστατικών τροφίμων.

Πριν γίνει η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε μεμβράνες και επικαλυπτικά, είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί όχι μόνο η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, αλλά επίσης το πώς αυτά επηρεάζουν α) τις ιδιότητες των υλικών στα οποία ενσωματώνονται, όπως η δύναμη συγκράτησής τους και β) τα χαρακτηριστικά του τροφίμου όπως γεύση, χρώμα και χημικές τροποποιήσεις του.

Επειδή υπάρχουν αμφιβολίες για την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών και διάφοροι ρυθμιστικοί οργανισμοί έχουν περιορίσει τη χρήση τους ως πρόσθετα τροφίμων, οι ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους σε αντιοξειδωτικά που προέρχονται από φυσικές πηγές, όπως είναι τα φυσικά εκχυλίσματα. Αυτά τα εκχυλίσματα μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην βελτίωση της θρεπτικής αξίας και ποιότητας των τροφίμων χωρίς να επηρεάζουν την ακεραιότητά του. Γενικά, οι φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών, όπως η περιεχόμενη υγρασία και η διαλυτότητα στο νερό παραμένουν ανεπηρέαστες από την προσθήκη αντιοξειδωτικών, επειδή η μεμβράνη και το εκχύλισμα αλληλεπιδρούν καλά.

Εκχυλίσματα τσαγιού, φρούτων και λαχανικών και εκχυλίσματα φυτών παρουσιάζουν άριστη αντιοξειδωτική , μπορούν να καθυστερήσουν την οξείδωση των λιπιδίων καθώς και να βελτιώσουν την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής διαφόρων τροφίμων. Η αντιοξειδωτική αυτών των εκχυλισμάτων προέρχεται κυρίως από τα φαινολικά συστατικά και την συνεργιστική ή ανταγωνιστική τους επίδραση. Παρά τις δυνατότητες αυτές που παρουσιάζουν τα φυσικά εκχυλίσματα, και πάλι υστερούν μπροστά στα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

Συμπερασματικά, τα επικαλυπτικά και οι μεμβράνες που περιέχουν αντιοξειδωτικά αποτελούν μία φυσική και βιοαποδομήσιμη εναλλακτική για τα χημικά συντηρητικά, αφού δρουν προστατευτικά και αυξάνουν τη διάρκεια ζωής τροφίμων. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα επικαλυπτικά αυξάνει την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων καθυστερώντας αντιδράσεις υποβάθμισής τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή επικαλυπτικών και μεμβρανών με ενσωματωμένα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν ωφελήσει τα τρόφιμα στα οποία εφαρμόστηκαν.

3.4.2 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να μειώσουν την οξείδωση των λιπιδίων, γι’ αυτό και η παρουσία τους σε τρόφιμα μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους. Έχουν μεγάλες δυνατότητες ως αντιοξειδωτικά και έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή (GRAS). Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά τους ωστόσο, όπως το πολύ έντονο άρωμα, θέματα τοξικότητας και πιθανές αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, έχουν περιορίσει σημαντικά τη χρήση τους στη διατήρηση των τροφίμων. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, έχουν γίνει προσπάθειες ενσωμάτωσης αιθέριων ελαίων σε εδώδιμες μεμβράνες και επικαλυπτικά. Υπάρχει η δυνατότητα να ελαχιστοποιηθεί η απαραίτητη δόση αιθέριου ελαίου με εγκλεισμό του στο πολυμερές, μειώνοντας έτσι την εξάτμισή τους και ταυτόχρονα ελέγχοντας την απελευθέρωσή τους. Έτσι, εξασφαλίζεται η ασφάλεια και η ποιότητα του τροφίμου.

Πέρα από τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, τα αιθέρια έλαια μπορούν να βελτιώσουν την παρεμποδιστική ικανότητα των μεμβρανών στο νερό, καθώς τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υδροφοβικής φύσης, όπως και τα λιπίδια. Από έρευνες έχει διαπιστωθεί επίσης ότι η αντιοξειδωτική δράση ενός βιοαποδομήσιμου επικαλυπτικού ή μεμβράνης που περιέχει αιθέριο έλαιο είναι ανάλογη της ποσότητας του προστιθέμενου ελαίου. Δηλαδή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου στο επικαλυπτικό, τόσο μεγαλώνει και η αντιοξειδωτική του δράση.

3.5 Έρευνες και πειράματα με ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε επικαλυπτικά και μεμβράνες

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται εφαρμογές που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια με ενσωματωμένα εκχυλίσματα φυτών και φρούτων σε εδώδιμες μεμβράνες και επικαλυπτικά. Η έρευνα επικεντρώθηκε σε εκχυλίσματα αρωματικών φυτών κυρίως, μιας και στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μελέτη και χρήση εκχυλισμάτων και αιθέριου ελαίου από δενδρολίβανο.

Φυτό	Κλάσμα	Εφαρμογή	Τρόφιμο	Ανάλυση	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
ρίγανη, πιπεριά	αιθέριο έλαιο	φιλμ συσκευασίας από CMC με πρωτεΐνες γάλακτος και γλυκερόλη	βοδινό κρέας	TBARs, Folin-Ciocalteu, φωτομετρική μέθοδος DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine)	Παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική προστασία από τα φιλμ με τα αιθέρια έλαια. Η πιπεριά προσέφερε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία	Oussalah et al. (2004)
Φύλλα μυρτιάς	υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από CMC, με γλυκερόλη και ηλιέλαιο	-	Ανάλυση των εκχυλισμάτων με HPLC-MS	Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από δύο οικότυπους φύλλων μυρτιάς. Τα φιλμ με το ένα εκχύλισμα μείωσαν τη διαπερατότητα, τα άλλα όμως δεν έδειξαν κάποια μείωση	Bifani et al. (2007)
Ρίγανη, Δενδρολίβανο	υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από ζελατίνη, σορβιτόλη και γλυκερόλη	καπνιστή σαρδέλα	TBARs, αριθμός υπεροξειδίων (PV), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA),ολικό πτητικό βασικό άζωτο(TVBN), αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής σιδήρου (FRAP)	Τα φιλμ παρείχαν αντιοξειδωτική προστασία	Gómez-Estaca et al. (2007)
Ρίγανη, Δενδρολίβανο	υδατικό εκχύλισμα	Φιλμ συσκευασίας από ζελατίνη από δέρμα τόνου και ζελατίνη από δέρμα βοοειδών, σορβιτόλη και	-	Ελαφρώς τροποποιημένη μέθοδος της Folin-Ciocalteau, FRAP, δοκιμή δέσμευσης	Η αντιοξειδωτική δράση των φιλμ δε φάνηκε να επηρεάζεται από τον τύπο ζελατίνης που χρησιμοποιήθηκε αν και τα φιλμ με ζελατίνη από δέρμα	Gómez-Estaca et al. (2008)

		γλυκερόλη		ελευθέρων ριζών ABTS	βοοειδών ελευθέρωσαν περισσότερες φαινόλες	
Ρίγανη, Δενδρολίβανο	εκχυλίσματα παρασκευασμένα με πατέντα	Ενεργό φιλμ με εκχύλισμα δενδρολίβανου και ενεργό φιλμ με εκχύλισμα ρίγανης. Μία ακόμα σειρά δειγμάτων ετοιμάστηκε με μπριζόλες που ψεκάστηκαν με εκχύλισμα δενδρολίβανου	αρνίσιες μπριζόλες	TBARs, μυογλοβίνη που μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά	Τα ενεργά φιλμ με εκχύλισμα ρίγανης ήταν αρκετά πιο αποτελεσματικά από αυτά με το εκχύλισμα δενδρολίβανου, και προσέδωσαν στις μπριζόλες οξειδωτική σταθερότητα	Camo et al. (2008)
Άσπρο, κόκκινο ginseng και άσπρο ginseng ως προϊόν εξώθησης (extrusion)	αιθανολικά εκχυλίσματα	Αλγινικό βιοδιασπώμενο φιλμ	-	DPPH	Τα αλγινικά φιλμ που περιείχαν εκχύλισμα άσπρου ginseng που είχε υποστεί εξώθηση εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά το DPPH, ακολουθούμενα από τα φιλμ με τα εκχυλίσματα με άσπρο και κόκκινο ginseng	Norajit et al. (2010)
φλοιός κριθαριού	εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα	φιλμ συσκευασίας χαμηλής πυκνότητας από πολυαιθυλένιο	Σολωμός του Ατλαντικού	Αριθμός υπεροξειδίων (PV), συζυγή διένια και τριένια (CD, TH), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), αριθμός ανισιδίνης (p-Av), τιμή	Η μέθοδος ενσωμάτωσης του αντιοξειδωτικού στο φιλμ συσκευασίας αποδείχθηκε αποτελεσματική στην προστασία του σολωμού κατά τη διάρκεια της	Pereira de Abreu et al. (2010)

				ολικής οξείδωσης (TOTOX value)	κατάψυξής του	
φλοιός κριθαριού	εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα	φιλμ συσκευασίας χαμηλής πυκνότητας από πολυαιθυλένιο	Ιππόγλωσ-σα	Αριθμός υπεροξειδίων (PV), συζυγή διένια και τριένια (CD, TH), αριθμός ανισιδίνης (AV), TBARs	Η μέθοδος ενσωμάτωσης του αντιοξειδωτικού στο φιλμ συσκευασίας αποδείχθηκε αποτελεσματική στην προστασία της ιππόγλωσσας κατά τη διάρκεια της κατάψυξής της	Pereira de Abreu et al. (2010)
φλοιός κριθαριού	εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα	φιλμ συσκευασίας χαμηλής πυκνότητας από πολυαιθυλένιο	Γλαυκοκαρ-χαρίας	PV, CD, TH, TBARS, AV, TOTOX value	Η μέθοδος ενσωμάτωσης του αντιοξειδωτικού στο φιλμ συσκευασίας αποδείχθηκε αποτελεσματική στην προστασία του γλαυκοκαρχαρία κατά τη διάρκεια της κατάψυξής του. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού, τόσο μεγαλύτερη η προστασία που παρείχε το φιλμ	Pereira de Abreu et al. (2010)
ρίγανη	εκχύλισμα	ενεργό φιλμ συσκευασίας (European Patent 1477519-A1) και άλλα δείγματα ψεκάστηκαν με εκχύλισμα	μπριζόλες από βοδινό κρέας	TBARs	Όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στο ενεργό φιλμ, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αναστολή της οξείδωσης των λιπών του κρέατος. Τα δείγματα με ψεκασμένο εκχύλισμα παρουσίασαν	Camo et al. (2010)

					αποτελέσματα παρόμοια με τα δείγματα με ενεργό φιλμ που περιείχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος	
πράσινο τσάι	υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη με γλυκερόλη	-	DPPH, Folin-Ciocalteau	Η ενσωμάτωση εκχυλίσματος από πράσινο τσάι βελτίωσε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του φιλμ χιτοζάνης	Siripatrawan et al. (2010)
πράσινο τσάι	εκχύλισμα αγορασμένο από την Plantextrakt	φιλμ συσκευασίας από το συμπολυμερές EVOH στα οποία ενσωματώθηκαν εκτός από εκχύλισμα τσαγιού, ασκορβικό και φερουλικό οξύ μεταξύ άλλων	σαρδέλες σε άλμη	PV, TBARs	Όλα τα φιλμ παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση, με αυτά με το ενσωματωμένο εκχύλισμα τσαγιού να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση	López-de-Dicastillo et al. (2011)
πράσινο τσάι	υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη με γλυκερόλη	χοιρινά λουκάνικα	TBARs	Η ενσωμάτωση εκχυλίσματος από πράσινο τσάι ενίσχυσε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φιλμ με παράλληλη διατήρηση των φυσικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων των λουκάνικων	Siripatrawan et al. (2011)
δενδρολίβανο	αιθανολικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας χαμηλής πυκνότητας από πολυαιθυλένιο	κοτόπουλο	TBARs	Η ενσωμάτωση εκχυλίσματος από δενδρολίβανο ενίσχυσε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φιλμ	Bolumar et al. (2011)

κίτρο	εκχύλισμα	1)ενεργός συσκευασία PET με εκχύλισμα, 2) ενεργός συσκευασία PET με α-τοκοφερόλη	γαλοπούλα	TBARs	Το εκχύλισμα περιόρισε σημαντικά το φαινόμενο της οξείδωσης, σε αντίθεση με την α-τοκοφερόλη η οποία δεν παρουσίασε καμία αντιοξειδωτική ικανότητα	Contini et al. (2011)
μελισσόχορτο	υδατικό εκχύλισμα	1)σύμπλοκα εκχυλίσματος με β-κυκλοδεξτρίνη 2)εκχύλισμα εγκλεισμένο σε τροποποιημένο άμυλο.	-	Έλεγχος θερμο-οξειδωτικής σταθερότητας με διαφορικό θερμιδόμετρο σάρωσης DSC, DPPH	Τα εγκλεισμένα μόρια προστατεύθηκαν από την οξείδωση. Επίσης ο τρόπος παρασκευής του εκχυλίσματος ενίσχυσε την αντιοξειδωτική του	Mourtzinos et al. (2011)
φλοιός κριθαριού	εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα	φιλμ συσκευασίας χαμηλής πυκνότητας από πολυαιθυλένιο	προσομοιωτής τροφίμου	Ανάλυση εκχυλίσματος με HPLC-UV, DPPH	Τα φυσικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από αυτή τη διαδικασία είναι μία υποσχόμενη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα σε τρόφιμα	Pereira de Abreu et al. (2011)
δενδρολίβανο	αιθέριο έλαιο	ενεργό φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη και προσθήκη Tween	-	Folin–Ciocalteu	Το συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικά αυξήθηκε με την προσθήκη αιθέριου ελαίου	Abdollahi et al. (2012)
μύρτιλο	εκχύλισμα (BE, 600761 Bilberry Extract 25%)	μικροκάψουλες από απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος με ενσωματωμένο εκχύλισμα	Οι μικροκάψουλες εισήχθησαν σε ηλιέλαιο	Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης με ισοδύναμα Trolox (TEAC), δοκιμή ABTS	Η παρουσία πρωτεϊνών καθώς και η προσθήκη γαλακτω-ματοποιητών επηρέασαν αρνητικά την αντιοξειδωτική δράση του εγκλεισμένου εκχυλίσματος	Betz et al. (2012)
Φύλλα μυρτιάς	υδατικό εκχύλισμα	νανοσύνθετα φιλμ	-	ABTS	Τα φιλμ με εκχύλισμα είχαν	Quilaqueo

		CMC με μοντμοριλλονίτη (MMT) και γλυκερόλη			αρκετά ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση	Gutiérrez et al. (2012)
πράσινο και μαύρο τσάι	εκχυλίσματααπότην Corona Science & Technology Development Co.	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη με γλυκερόλη	προσομοιωτής τροφίμου (0%, 20%, 75% και 95% αιθανόλη)	DPPH	Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση εκχυλίσματος στο φιλμ, τόσο γρηγορότερη ήταν και η ελευθέρωση των αντιοξειδωτικών από τα εκχυλίσματα. Το πράσινο τσάι είχε καλύτερα αποτελέσματα από το μαύρο τσάι	Peng et al. (2013)
Lycium Barbarum	εκχύλισμα αγορασμένο από την Shaanxi Zhongxin Biotechnology Co. Ltd.	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη	-	DPPH	Το εκχύλισμα ενίσχυσε σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση του φιλμ χιτοζάνης	Wang et al. (2014)
φύλλα ελιάς	εκχύλισμα	βιοδιασπώμενο φιλμ από Ecoflex και Ecoflex-πολυγαλακτικό οξύ	-	DPPH	Τα φιλμ με εκχύλισμα συγκρίθηκαν με φιλμ τα οποία περιείχαν α-τοκοφερόλη. Τα φιλμ με α-τοκοφερόλη παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτά με εκχύλισμα	Marcos et al. (2014)
μάτε (yerba mate)	υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από άμυλο μανιόκας, γλυκερόλη και πούλπα μάνγκο	φοινικέλαιο	PV, ολικές πολυφαινόλες (TP), ολικά φλαβονοειδή (TF) και ολικά	Τα φιλμ συσκευασίας με εκχύλισμα προστάτευσαν το φοινικέλαιο από την οξείδωση. Όσο μεγαλύτερες	Batista Reis et al. (2015)

				καροτενοειδή (TC)	οι συγκντρώσεις εκχυλίσματος στο φιλμ, τόσο χαμηλότεροι ρυθμοί οξείδωσης	
πράσινο τσάι	υδατικό εκχύλισμα	διαλύματα επικάλυψης από χιτοζάνη με γλυκερόλη	καρυδό-ψυχα	Folin–Ciocalteu, PV, TBARs	Η επικάλυψη με διάλυμα που περιείχε εκχύλισμα, μείωσε το ρυθμό οξείδωσης της καρυδόψυχας	Sabaghi et al. (2015)
maqui berry	λυοφιλοποιημένα εκχυλίσματα	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη με γλυκερόλη	-	DPPH, Folin-Ciocalteu, Ferrous ion-chelating capacity (FIC), FRAP (ferric reducing activity power)	Τα φιλμ με εκχύλισμα παρουσίασαν αντιοξειδωτικές ιδιότητες	Genskowsky et al. (2015)
φλούδες ροδιού	αιθανολικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας από χιτοζάνη και μοντμοριλλονίτη (MMT) με γλυκερόλη	-	Folin-Ciocalteu, DPPH	Τα φιλμ με ενσωματωμένο εκχύλισμα παρουσίασαν άριστη αντιοξειδωτική δράση	Qin et al. (2015)
maqui berry	αιθανολικό και υδατικό εκχύλισμα	φιλμ συσκευασίας MC με γλουταραλδεΰδη GA	-	DPPH, FRAP, Folin–Ciocalteu,ABTS	Στα φιλμ συσκευασίας με εκχύλισμα, παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα αντέδρασε με τη γλουταραλδεΰδη επηρεάζοντας έτσι τα αποτελέσματα	López de Dicastillo et al. (2016)
ρίγανη, λεβάντα	αιθέριο έλαιο	φιλμ συσκευασίας από ζελατίνη	-	FRAP, DPPH	Το αιθέριο έλαιο ρίγανης προσέφερε αντιοξειδωτική προστασία	Martucci et al. (2015)
θυμάρι, βασιλικός	αιθέριο έλαιο	εδώδιμη επικάλυψη CMC με γλυκερόλη	ηλιόσποροι	PV, AV, CD, DPPH	Η χρήση του επικαλυπτικού εξασφάλισε τη χημική	Riveros et al. (2015)

					σταθερότητα του τροφίμου και καθυστέρησε την οξείδωση των λιπιδίων. Μόνο το αιθέριο έλαιο θυμαριού βοήθησε στη διατήρηση του τροφίμου	
δενδρολίβανο	αιθανολικό εκχύλισμα	ενεργό φιλμ συσκευασίας	χοιρινά μπιφτέκια	TBARs	Η ενεργός συσκευασία με εκχύλισμα συγκρινόμενη με άλλου τύπου συσκευασίες χωρίς εκχύλισμα έδειξε τα καλύτερα αποτελέσματα	Bolumar et al. (2016)

Οι Oussalah et al (2004) χρησιμοποίησαν αιθέριο έλαιο από ρίγανη και πιπεριά, τα οποία ενσωμάτωσαν σε εδώδιμα επικαλυπτικά για να μελετήσουν την αντιοξειδωτική τους δράση, έπειτα από επικάλυψη βοδινού κρέατος. Αν και η μέθοδος TBARs έδειξε αδυναμία προστασίας του κρέατος από την οξείδωση, εκτιμάται ότι ορισμένα φαινολικά συστατικά σχημάτισαν αλδεΰδες οι οποίες κατά το πείραμα TBARs αντέδρασαν και απέκρυψαν την πραγματική αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων. Συνολικά, το αιθέριο έλαιο ρίγανης αλλά και το αιθέριο έλαιο πιπεριάς σταθεροποίησαν την οξείδωση των λιπιδίων του κρέατος, έπειτα από αποθήκευση στους 4ºC. Με την ενσωμάτωση αιθέριου ελαίου σε επικαλυπτικές μεμβράνες οι Oussalah et al (2004) παρατήρησαν ότι η υδροφοβικότητα επηρεάζει την μεταφορά φαινολικών συστατικών από τη μεμβράνη στην επιφάνεια του τροφίμου.

Σε άλλη έρευνα, οι Martucci et al (2015), εμπλούτισαν εδώδιμες μεμβράνες ζελατίνης με αιθέρια έλαια από ρίγανη και λεβάντα σε τελικές συγκεντρώσεις από 2000 έως 6000 ppm και μελέτησαν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH. Η προσθήκη αιθέριου ελαίου αύξησε σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης να παρουσιάζουν οι μεμβράνες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης (6000 ppm). Συγκριτικά με τη ρίγανη, η λεβάντα εμφάνισε πολύ μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ρίγανη έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις.

Οι Riveros et al (2015), εμπλούτισαν εδώδιμα επικαλυπτικά CMC με αιθέρια έλαια από θυμάρι και βασιλικό για να επικαλύψουν ηλιόσπορους. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήσεις σε αριθμό υπεροξειδίων, συζυγή διένια και αριθμό π-ανισιδίνης έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο από θυμάρι προστάτευσε τους καρπούς από το σχηματισμό τόσο πρωτογενών όσο και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης το ίδιο καλά με το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT ενώ ο βασιλικός δεν έδειξε τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Οι Gómez-Estaca et al (2007), οι οποίοι ενσωμάτωσαν υδατικά εκχυλίσματα ρίγανης και δενδρολίβανου σε φιλμ συσκευασίας από ζελατίνη για την προστασία καπνιστής σαρδέλας, παρατήρησαν ότι φαινόλες απελευθερώθηκαν από την αρχή της αποθήκευσης των δειγμάτων και στην περίπτωση της ρίγανης και στην περίπτωση του δενδρολίβανου. Οι τιμές παρέμειναν σχετικά σταθερές για τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με ζελατίνη εμπλουτισμένη με εκχύλισμα ρίγανης, όμως στα δείγματα με εκχύλισμα δενδρολίβανου παρατηρήθηκε αύξηση στα φαινολικά στη διάρκεια του χρόνου. Αυτό αποδεικνύει ότι οι αντιοξειδωτική δράση του δενδρολίβανου απελευθερώνεται σταδιακά. Η μέθοδος TBARs έδειξε την ικανότητα του δενδρολίβανου να μειώσει σημαντικά το ρυθμό οξείδωσης.

Σε επόμενο πείραμά τους, οι Gómez-Estaca et al (2008), χρησιμοποίησαν υδατικά εκχυλίσματα ρίγανης και δενδρολίβανου για να εξετάσουν πως επηρεάζεται η απελευθέρωση φαινολικών από την επιλογή της μεμβράνης συσκευασίας. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ζελατίνη τόνου και ζελατίνη από βοοειδή. Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο ABTS έδειξε ότι ήταν χαμηλότερη για τη ζελατίνη από τόνο, ειδικά στα δείγματα όπου είχε προστεθεί εκχύλισμα ρίγανης. Αυτό δείχνει ότι ο υψηλότερος βαθμός αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με πολυφαινόλες μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αντιοξειδωτική ισχύ ενός εμπλουτισμένου επικαλυπτικού. Έτσι, επειδή η ρίγανη είχε πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά φάνηκε ότι επηρέασε αρνητικά την αντιοξειδωτική δράση της ζελατίνης.

Οι Camo et al (2008), παρήγαγαν ενεργά φιλμ με εκχυλίσματα από δενδρολίβανο και ρίγανη για να επικαλύψουν αρνίσιες μπριζόλες. Με μέτρηση του ποσοστού μετμυογλοβίνης, αν και τα δύο είδη ενεργού φιλμ προστάτευσαν το κρέας, το εκχύλισμα ρίγανης ήταν πιο αποτελεσματικό με μικρές διαφορές. Η μέτρηση TBARs έδειξε ότι το ενεργό φιλμ με εκχύλισμα ρίγανης προσέφερε αντιοξειδωτική ικανότητα 60% σε σύγκριση με δείγματα Control, ενώ το ποσοστό ήταν αρκετά χαμηλότερο (περίπου 35%) για το ενεργό φιλμ με εκχύλισμα δενδρολίβανου. Η ρίγανη, βέβαια, θεωρείται ένα από τα πιο ενεργά αντιοξειδωτικά στην ενεργό συσκευασία. Οι ίδιοι σε πείραμα το 2010, έδειξαν για πρώτη φορά ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση εκχυλίσματος ρίγανης σε ενεργό συσκευασία, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική προστασία που παρέχει στο τρόφιμο. Βέβαια, όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση εκχυλίσματος ρίγανης, τόσο πιο αισθητό γίνεται και το άρωμα ρίγανης στον καταναλωτή, κάτι το οποίο δεν μπορεί να γίνει αποδεκτό από τον καταναλωτή. Οι Camo et al συμπέραναν ότι η ιδανική συγκέντρωση εκχυλίσματος ρίγανης σε ενεργό συσκευασία θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1-2%.

Οι Bolumar et al (2011) ενσωμάτωσαν αιθανολικό εκχύλισμα από δενδρολίβανο σε ενεργά φιλμ πολυαιθυλενίου σε συγκέντρωση 0.45 mg εκχυλίσματος/ cm^2 μεμβράνης και επικάλυψαν κοτόπουλο το οποίο αποθηκεύτηκε σε πλαστική συσκευασία υπό κενό και υπέστη διεργασία υψηλής πίεσης (HP treatment) πριν την αποθήκευσης στους 5ºC. Με τη μέθοδο TBARs μελέτησαν πώς η μεμβράνη επηρέασε την οξείδωση στην επιφάνεια του κοτόπουλου και πως στο εσωτερικό μέρος του κοτόπουλου. Η εμπλουτισμένη με εκχύλισμα δενδρολίβανου μεμβράνες καθυστέρησαν την οξείδωση τόσο την επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό των φιλέτων. Σε επόμενη μελέτη, (Bolumar et al, 2016) ενσωμάτωσαν αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου (1000 ppm) σε ενεργό φιλμ για την επικάλυψη χοιρινών μπιφτεκιών, τα οποία υπέστησαν κατεργασία υψηλής πίεσης, και μετρήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη μέθοδο TBARs έπειτα από αποθήκευση στους 5ºC. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με το πείραμα του 2011. Στη συνέχεια, σύγκριση μεταξύ ενεργού συσκευασίας με εκχύλισμα δενδρολίβανου και συσκευασία δέσμευσης οξυγόνου, έδειξε ότι μεγαλύτερη προστασία στην οξείδωση προσφέρει η ενεργός συσκευασία με φυσικό εκχύλισμα.

Οι έρευνες των Pereira de Abreu et al (2010) επικεντρώθηκαν στην επικάλυψη ιχθύων με φιλμ πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας εμπλουτισμένο με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από φλοιό κριθαριού σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις και αποθήκευση στους -20^oC.

Στο πρώτο πείραμα της επικάλυψης σολωμού ο αριθμός υπεροξειδίου έδειξε ικανότητα των μεμβρανών να επιβραδύνουν την πρωτογενή οξείδωση. Ο αριθμός π-ανισιδίνης φάνηκε επίσης να είναι σημαντικά χαμηλότερος στα επικαλυμμένα δείγματα, όπως και η παραγωγή συζυγών διενίων και τριενίων. Τόσο με τη μέθοδο TBARs όσο και με τον αριθμό π-ανισιδίνης φάνηκε η συγκέντρωση του εκχυλίσματος να επηρεάζει τις τιμές και η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού να προστατεύει πιο αποτελεσματικά τους ιχθύες. Από την άλλη, η κατάψυξη δεν φάνηκε να καθυστερεί την οξείδωση των λιπιδίων.

Σε επόμενο πείραμα επικάλυψαν ιππόγλωσσα με τις ίδιες μεμβράνες και ίδια συγκέντρωση αντιοξειδωτικού. Με τον αριθμό υπεροξειδίου φάνηκε να προστατεύονται τα επικαλυμμένα δείγματα, ενώ ο αριθμός π-ανισιδίνης φάνηκε να προσφέρει προστασία στα δείγματα προς το τέλος των πειραμάτων, όμως συνολικά η περιεκτικότητα σε δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης ήταν μικρότερη από αυτή που παρουσίασαν τα δείγματα σολωμού. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με τη μέθοδο TBARs. Τα συζυγή διένια και τριένια βρέθηκαν σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα επικαλυμμένα δείγματα. Γενικά οι τιμές κυμαίνονταν αρκετά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα τριένια αντιδρούν με πρωτεΐνες ή άλλες ενώσεις, ενώ τα διένια σπάζουν σε μικρότερες ενώσεις. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται καθ’ όλη τη διάρκεια αποθήκευσης των τροφίμων και γι’ αυτό το λόγο δεν επηρεάστηκαν ιδιαίτερα από αλλαγές στην ποιότητα της ιππόγλωσσας.

Οι ίδιοι ερευνητές (Pereira de Abreu et al, 2011), χρησιμοποίησαν τις ίδιες επικαλύψεις με το ίδιο αντιοξειδωτικό για μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης στην επικάλυψη ενός άλλου ιχθύος, του γλαυκοκαρχαρία. Τα συζυγή διένια και τριένια, όπως και ο αριθμός π-ανισιδίνης δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων χωρίς επικάλυψη και αυτών που είχαν επικαλυφθεί. Ο αριθμός υπεροξειδίων έδειξε ότι οι μεμβράνες με αντιοξειδωτικό παρείχαν προστασία στα δείγματα των ιχθύων, σε ότι αφορά την παραγωγή πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης. Επί πλέον, ανέλυσαν το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από φλοιό κριθαριού με τη μέθοδο HPLC και βρήκαν περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις όπως φερουλικό και κουμαρινικό οξύ, ενώ η μέθοδος DPPH έδειξε ότι το εκχύλισμα αυτό έχει πάνω από διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από το αντιοξειδωτικό BHT (Pereira de Abreu, 2011).

Οι Siripatrawan και Harte (2010) παρήγαγαν υδατικό εκχύλισμα από πράσινο τσάι και το ενσωμάτωσαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ενεργές μεμβράνες συσκευασίας από χιτοζάνη και μελέτησαν το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού στις μεμβράνες συσκευασίας η αντιοξειδωτική δράση αυξανόταν ανάλογα. Σε επόμενο πείραμά τους (Siripatrawan & Harte, 2011), ενσωμάτωσαν υδατικό εκχύλισμα από πράσινο τσάι σε περιεκτικότητα 20% w/v σε ενεργό φιλμ από χιτοζάνη και το χρησιμοποίησαν για επικάλυψη χοιρινών λουκάνικων. Την οξείδωση των λιπιδίων την μέτρησαν με TBARs σε τρεις σειρές δειγμάτων, η μία χωρίς επικάλυψη, η δεύτερη με επικάλυψη μη εμπλουτισμένη και η τρίτη εμπλουτισμένη με εκχύλισμα πράσινου τσαγιού, έπειτα από αποθήκευση στους 4ºC. Στα αποτελέσματα οι τιμές των μη επικαλυμμένων δειγμάτων είναι υψηλότερες από των επικαλυμμένων με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη, οι οποίες με τη σειρά τους είναι υψηλότερες από των επικαλυμμένων δειγμάτων με εμπλουτισμένη μεμβράνη. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το εκχύλισμα τσαγιού είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό.

Οι Sabaghi et al (2015) ενσωμάτωσαν υδατικό εκχύλισμα από πράσινο τσάι σε εδώδιμα επικαλυπτικά από χιτοζάνη τα οποία χρησιμοποίησαν για επικάλυψη καρυδόψυχας και αποθήκευση των δειγμάτων σε συσκευασίες πολαιθυλενίου σε θερμοκρασία δωματίου. Σε ότι αφορά στον αριθμό υπεροξειδίων, η χιτοζάνη φάνηκε να επηρεάζει τις τιμές, ενώ το εκχύλισμα τσαγιού μείωσε τον αριθμό υπεροξειδίων, χωρίς όμως τα δείγματα επικαλυμμένα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές υπεροξειδίων. Δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος δεν φάνηκε να επηρεάζει τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με τη μέθοδο TBARs.

Οι López de Dicastillo et al (2011), έφτιαξαν μεμβράνες συσκευασίας από ένα συμπολυμερές στο οποίο ενσωμάτωσαν μεταξύ άλλων (ασκορβικό οξύ, φερουλικό οξύ, κερκετίνη) εκχύλισμα από πράσινο τσάι σε περιεκτικότητα 5% w/w για να επικαλύψουν σαρδέλες σε άλμη και να τις αποθηκεύσουν στους 4ºC. Πριν την επικάλυψη της σαρδέλας έγιναν δοκιμές σε προσομοιωτές τροφίμων (νερό για υδατικά τρόφιμα, 10% αιθανόλη για αλκοολούχα ποτά και 95% αιθανόλη για λιπαρά φαγητά), από όπου συμπέραναν ότι το ασκορβικό οξύ απελευθερώνεται περισσότερο στο νερό. Το φερουλικό οξύ έδειξε μη ικανοποιητικά αποτελέσματα και στους τρεις προσομοιωτές κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται σε αντίδραση του οξέος με το πολυμερές. Από την άλλη η κερκετίνη και το εκχύλισμα τσαγιού απελευθερώθηκαν σε μεγάλο βαθμό στο διάλυμα αιθανόλης 95%. Έπειτα από μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εμπλουτισμένων μεμβρανών σε σαρδέλες με μέτρηση TBARs και αριθμού υπεροξειδίων, φάνηκε ότι το εκχύλισμα από πράσινο τσάι ήταν το πιο αποτελεσματικό, με την κερκετίνη και το φερουλικό οξύ να ακολουθούν, ενώ το ασκορβικό οξύ δεν προστάτευσε τις σαρδέλες και μάλιστα εμφάνισε και προοξειδωτική δράση.

Σε προσομοιωτή τροφίμου (αιθανολικά διαλύματα) έκαναν δοκιμές οι Peng et al (2013) οι οποίοι ενσωμάτωσαν εκχυλίσματα από πράσινο και μαύρο τσάι σε μεμβράνες από χιτοζάνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στα διαλύματα που λειτούργησαν ως προσομοιωτές έγιναν δοκιμές DPPH για να βρεθεί η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών την παρουσίασε το εκχύλισμα πράσινου τσαγιού και επίσης παρατηρήθηκε και πάλι ότι όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στη μεμβράνη, τόσο μεγαλύτερη και η αντιοξειδωτική του δράση. Επίσης παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερο το περιεχόμενο του προσομοιωτή σε αιθανόλη, τόσο χαμηλότερη ήταν η πολικότητα και συνεπώς τόσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος στον οποίο έφτανε στο μέγιστό της η ικανότητα δέσμευσης ριζών.

Οι Contini et al (2011), συσκεύασαν δείγματα γαλοπούλας με ενεργό συσκευασία PET η οποία είχε ψεκαστεί με εκχύλισμα κίτρου και άλλα δείγματα με PET το οποίο είχε ψεκαστεί με α-τοκοφερόλη και σύγκριναν την αντιοξειδωτική τους δράση, κατά την αποθήκευση των δειγμάτων στους 4^{o}C. Το εκχύλισμα κίτρου έδειξε να είναι ικανό να περιορίζει την οξείδωση στα δείγματα γαλοπούλας, ενώ από την άλλη η α-τοκοφερόλη δεν έδειξε καθόλου αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Φάνηκε ότι, αντίθετα από τα φλαβονοειδή του κίτρου, τα μόρια της α-τοκοφερόλης δεν ήρθαν σε επαφή με την επιφάνεια του κρέατος και γι' αυτό η συσκευασία με α-τοκοφερόλη δεν έδειξε καθόλου αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Οι Batista Reis et al (2015), παρασκεύασαν βιοσύνθετα φιλμ από άμυλο μανιόκας, με πούλπα μάνγκο και εκχύλισμα μάτε (yerba mate), τα οποία περιέχουν αντιοξειδωτικές ενώσεις, και με αυτές τις μεμβράνες συσκεύασαν φοινικέλαιο. Το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά, όπως είναι λογικό, αυξανόταν, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της πούλπας και του εκχυλίσματος. Μεγαλύτερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά έδειξαν οι μεμβράνες με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε εκχύλισμα yerba mate. Επίσης, ο αριθμός υπεροξειδίων έδειξε ότι δείγματα επικαλυμμένα με μεμβράνη εμπλουτισμένη με yerba mate παρουσίασαν μικρότερη συγκέντρωση πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης από δείγματα επικαλυμμένα με μεμβράνη εμπλουτισμένη με πούλπα μάνγκο.

Αρκετές έρευνες έχουν εστιασθεί στη μελέτη των ίδιων των εμπλουτισμένων μεμβρανών, χωρίς να χρησιμοποιούνται για συσκευασία ορισμένου τροφίμου.

Οι Abdollahi et al (2012) έφτιαξαν ενεργά φιλμ χιτοζάνης στα οποία ενσωμάτωσαν αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκεντρώσεις 0.5, 1.0 και 1.5% v/v και μελέτησαν το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όπως ήταν αναμενόμενο το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά στις μεμβράνες με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο, ήταν αυξημένο.

Οι Quilaqueo Gutiérrez et al (2012) ενσωμάτωσαν υδατικό εκχύλισμα από φύλλα μυρτιάς σε νανοσύνθετα φιλμ CMC και μοντμοριλλονίτη (MMT), ένα αργιλικό ορυκτό που συνήθως χρησιμοποιείται λόγω της ικανότητάς του να συγκρατεί νερό. Στις μεμβράνες αυτές πραγματοποιήθηκαν δοκιμές δέσμευσης ελευθέρων ριζών για εκτίμηση ης αντιοξειδωτικής τους ικανότητας με τη μέθοδο ABTS. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μεμβρανών που εμπλουτίστηκαν με εκχύλισμα βρέθηκε να είναι πάνω από 18 φορές μεγαλύτερη από αυτή των μη εμπλουτισμένων μεμβρανών. Επίσης η προσθήκη μοντμοριλλονίτη ενίσχυσε την αντιοξειδωτική τους δράση.

Άλλη μία έρευνα στην οποία έγινε ενίσχυση εμπλουτισμένης με εκχύλισμα εδώδιμης μεμβράνης με μοντμοριλλονίτη ήταν αυτή των Qin et al (2015) οι οποίοι έφτιαξαν ενεργό φιλμ χιτοζάνης στο οποίο πρόσθεσαν μοντμοριλλονίτη και αιθανολικό εκχύλισμα από φλούδες ροδιού σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι μεμβράνες μελετήθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και ως προς την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στις μεμβράνες, αυξανόταν το περιεχόμενο σε φαινολικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα της μεμβράνης. Από την άλλη η προσθήκη μοντμοριλλονίτη δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα των μεμβρανών ούτε αύξησε το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά.

Τα εδώδιμα επικαλυπτικά από χιτοζάνη φαίνεται γενικά να έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Οι Wang et al (2014) και οι Genkowsky et al (2015) ενσωμάτωσαν εκχυλίσματα από *Lycium Barbarum* και maqui berry αντίστοιχα, σε μεμβράνες συσκευασίας από χιτοζάνη και μελέτησαν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH. Στο πρώτο πείραμα φάνηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, αυξανόταν και η ικανότητα δέσμευσης ριζών, κάτι το οποίο έχει διαπιστωθεί σε πολλές έρευνες. Μη εμπλουτισμένη μεμβράνη έδειξε ικανότητα δέσμευσης ριζών 3.7%, ενώ μεμβράνη που περιείχε εκχύλισμα σε αναλογία βάρους 1:1 με τη χιτοζάνη παρουσίαζε δεκαπλάσια ικανότητα δέσμευσης (35.8%). Στο δεύτερο πείραμα επίσης, οι μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με εκχύλισμα έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

Εκχύλισμα από maqui berry δοκιμάστηκε και από τους López de Dicastillo et al (2016) αλλά αυτή τη φορά ενσωματώθηκε σε μεμβράνες μεθυλοκυτταρίνης (MC) με γλουταραλδεΰδη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έπειτα από μελέτες με τη μέθοδο DPPH παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα αντέδρασε με τη γλουταραλδεΰδη επηρεάζοντας, έτσι, τα αποτελέσματα.

Οι Marcos et al (2014) παρασκεύασαν βιοδιασπώμενα φιλμ από Ecoflex, έναν συμπολυεστέρα στον οποίο ενσωμάτωσαν εκχύλισμα από φύλλα ελιάς και α-τοκοφερόλη. Με τη μέθοδο DPPH παρατηρήθηκε ότι οι μεμβράνες με α-τοκοφερόλη παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από αυτά με εκχύλισμα από φύλλα ελιάς.

Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης έγινε σε μικροκάψουλες από πρωτεΐνη ορού γάλακτος στις οποίες ενσωματώθηκε εκχύλισμα από μύρτιλο σε πείραμα των Betz et al (2012). Η αντιοξειδωτική δράση μετρήθηκε σε όλα τα στάδια παρασκευής μικροκάψουλας από όπου φάνηκε ότι όσο προχωράει η διεργασία η αντιοξειδωτική ικανότητα σε ισοδύναμα trolox μειώθηκε σε λιγότερο από 40% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του σκέτου εκχυλίσματος.

Ένα άλλο είδος ενσωμάτωσης εκχυλίσματος χρησιμοποίησαν οι Mourtzinos et al (2011), οι οποίοι δημιούργησαν σύμπλοκα υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου με β-κυκλοδεξτρίνη και ακολούθησε εγκλεισμός σε τροποποιημένο άμυλο. Το γαλάκτωμα μετά από ομογενοποίηση μετατράπηκε σε σκόνη η οποία αποθηκεύτηκε σε δοχείο ερμητικά κλειστό στους -40ºC. Η αντιοξειδωτική μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι με τη διάλυση β-κυκλοδεξτρίνης στον διαλύτη εκχύλισης, αυξανόταν η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος που παραλαμβανόταν.

4. Πειραματική διαδικασία

4.1 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ενσωμάτωση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εδώδιμη επικαλυπτική μεμβράνη για την προστασία τροφίμων. Ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο), ώστε να κριθεί η αποτελεσματικότητά του τόσο στην τεχνολογία των επικαλυπτικών, όσο και στην αλληλεπίδρασή του με τα τρόφιμα. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις σειρές πειραμάτων.

Αρχικά, έγινε συλλογή δενδρολίβανου από την Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, ξήρανσή του και παραλαβή του αιθέριου ελαίου του με υδροατμοαπόσταξη. Το αιθέριο έλαιο ήταν απαραίτητο να απομακρυνθεί διότι θα προσέδιδε έντονο άρωμα στο τρόφιμο. Παράλληλα, όμως το αιθέριο έλαιο είναι ένα ακριβό προϊόν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακό ή για διάφορες φαρμακευτικές χρήσεις. Στη συνέχεια, το απελαιωμένο δενδρολίβανο κονιοποιήθηκε και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις, και σε συσκευή υπερήχων. Στόχος ήταν η παραλαβή εκχυλίσματος πλούσιου σε αντιοξειδωτική δράση. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη και λαμβάνονταν δείγματα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ώστε να προσδιορισθεί ο βέλτιστος χρόνος. Στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των ολικών φαινολικών με Folin-Ciocalteu και μέτρηση της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών με DPPH. Μετά τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου εκχύλισης, ακολούθησαν εκχυλίσεις για παραλαβή ικανής ποσότητας εκχυλίσματος, το οποίο αποχρωματίστηκε για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως φυσικό αντιοξειδωτικό στις επικαλυπτικές μεμβράνες. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εξαντλητικές εκχυλίσεις σε συσκευή Soxhlet για προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών συστατικών της φυτόμαζας και σύγκριση της δράσης των εκχυλισμάτων με αυτά από τη συσκευή υπερήχων.

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων, η μελέτη της εργασίας στράφηκε στη δράση των εκχυλισμάτων κατά την προσθήκη τους σε εδώδιμες μεμβράνες για την επικάλυψη ιχθυρών.. Επίσης, διερευνήθηκε η καταλληλότητα του αιθέριου ελαίου του *Rosmarinus officinalis* καθώς τα κλάσματα αυτά των αρωματικών φυτών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης. Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής ωστόσο διερευνήθηκε η πιθανή παρεμπόδιση της οξείδωσης σε δείγματα στα οποία είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο στο επικαλυπτικό. Οι δραστικές ουσίες ενσωματώθηκαν σε επικαλυπτικά διαλύματα CMC. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν τρεις σειρές δειγμάτων στις οποίες η επικαλυπτική μεμβράνη περιείχε αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επιπρόσθετα, παρασκευάστηκαν άλλες δύο σειρές δειγμάτων εκ των οποίων η μία περιείχε συνδυασμό του αιθέριου ελαίου με το αιθανολικό εκχύλισμα και η άλλη περιείχε μόνο αιθέριο έλαιο σε ορισμένη συγκέντρωση. Τέλος, άλλες δύο σειρές δειγμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν τα δείγματα Control CMC, στα οποία έγινε επικάλυψη με επικαλυπτικό στο οποίο δεν είχε ενσωματωθεί αντιοξειδωτικό ή αιθέριο έλαιο, και τα δείγματα Control στα οποία δεν έγινε καμία επικάλυψη. Από τις εφτά σειρές δειγμάτων, διπλά δείγματα αποθηκεύτηκαν σε δυο θερμοκρασίες, στους 4ºC και στους 10ºC. Δείγματα λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έπειτα από παραλαβή του ιχθυελαίου γινόταν μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων, των συζυγών διενίων και του αριθμού π-ανισιδίνης.

Παράλληλα, σε μία τρίτη σειρά πειραμάτων έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός προσομοιωτή τροφίμου πάνω στον οποίο να μπορούν να πραγματοποιηθούν μελέτες για την πορεία οξείδωσής του με ή χωρίς επικαλυπτικό. Παρασκευάστηκε ζυμάρι από αλεύρι, φοινικέλαιο και νερό, το οποίο χωρίστηκε σε δείγματα των 35±5 g. Τα μισά δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 10ºC και τα υπόλοιπα στους 40ºC. Στη συνέχεια μελετήθηκε η πορεία οξείδωσης της ζύμης, μετά από παραλαβή του ελαίου από τα αποθηκευμένα δείγματα. Λήφθηκαν, δηλαδή δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έγινε προσδιορισμός των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης μέσω του αριθμού υπεροξειδίων και των συζυγών διενίων, ενώ ο προσδιορισμός των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης έγινε με τον αριθμό π-ανισιδίνης.

4.2 Πρώτες ύλες – Αντιδραστήρια

Για την έρευνα των επικαλυπτικών CMC χρησιμοποιήθηκε χέλι καπνιστό που παραλήφθηκε από τις ιχθυοκαλλιέργειες Β. Γείτονας & ΣΙΑ Ε.Ε.

Το αρωματικό φυτό που μελετήθηκε ήταν το δενδρολίβανο το οποίο συλλέχθηκε από την Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου.

Οι εκχυλίσεις του αρωματικού φυτού πραγματοποιήθηκαν με χρήση των διαλυτών αιθανόλης (95º) και οξικού αιθυλεστέρα (analytical reagent grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των δειγμάτων ήταν τα εξής: χλωροφόρμιο (analytical reagent grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK), ιωδιούχο κάλιο (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), διαλυτό άμυλο (Panreac, Barcelona, Spain), θειοθειικό νάτριο (0.1N for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), οξικό οξύ (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), ισοοκτάνιο (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), π-ανισιδίνη (Panreac, Barcelona, Spain), εξάνιο (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France).

Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για τους προσομοιωτές τροφίμου στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν φοινικέλαιο. Η προμηθευτική εταιρεία του ελαίου ήταν η «ΑΓΡΟΤΙΚΗ Α.Ε.».

4.3 Συσκευές

Για την ξήρανση του δενδρολίβανου που συλλέχθηκε, χρησιμοποιήθηκε φούρνος κυκλοφορίας αέρα (Binder, Germany). Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των διαλυτών των εκχυλισμάτων κατά τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματός τους.

Για την απόσταξη και παραλαβή αιθέριου ελαίου από το δενδρολίβανο, χρησιμοποιήθηκε διάταξη υδροατμοαπόσταξης.

Για τις εκχυλίσεις του δενδρολίβανου χρησιμοποιήθηκε συστοιχία συσκευών Soxhlet καθώς και λουτρό υπερήχων (Elma Singen, type S30H, Germany).

Για την απομάκρυνση πιθανών ιχνών διαλύτη που παρέμειναν στα εμπλουτισμένα με εκχύλισμα επικαλυπτικά, χρησιμοποιήθηκε φούρνος κενού Heraeus vacutherm VT6025 (Hanau, Germany).

Οι αποστάξεις των ελαιοδιαλυμάτων έγιναν με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστή κενού Büchi RE 111 με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi 461 (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland).

Τα δείγματα ζύμης που παρασκευάστηκαν παρέμειναν σε φούρνο Thermawatt σε σταθερή θερμοκρασία 40ºC.

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων όλων των δειγμάτων για τον υπολογισμό των συζυγών διενίων, τριενίων αλλά και για τον αριθμό π-ανισιδίνης έγιναν σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U29000.

Η παρασκευή των επικαλυπτικών διαλυμάτων στα οποία έγινε ενσωμάτωση αιθέριου ελαίου έγινε με χρήση του ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας CAT Unidrive 1000.

Κατά την ανάκτηση ελαίου από τα ιχθυρά χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Thermo Scientifc, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge.

4.4 Πειραματικές τεχνικές

4.4.1 Υδροατμοαπόσταξη

Για την απομάκρυνση και συλλογή του αιθέριου ελαίου από το δενδρολίβανο που συλλέχθηκε και ξηράνθηκε, επιλέχθηκε η διεργασία της υδροατμοαπόσταξης. Στην υδροατμοαπόσταξη το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό, αλλά τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται πιο ψηλά από την επιφάνεια του νερού. Ο ατμός που σχηματίζεται από την θέρμανση του νερού, έρχεται σε επαφή με τη μάζα του φυτικού υλικού και παρασύρει το αιθέριο έλαιο. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.

Εικόνα 4.1 Διάταξη υδροατμοαπόσταξης

Να αναφερθεί ότι το δενδρολίβανο που χρησιμοποιήθηκε για την υδροατμοαπόσταξη είχε πρώτα υποστεί ξήρανση σε φούρνο στους 40ºC.

Το καζάνι γέμισε με αρκετή ποσότητα απιονισμένου νερού, τόση ώστε να μην έρχεται σε επαφή με τα φύλλα δενδρολίβανου τα οποία απλώθηκαν πάνω σε μία επιφάνεια μέσα στο καζάνι πάνω από το νερό. Για να αυξηθεί η απόδοση της διεργασίας, έγινε προσπάθεια αύξησης της επιφάνειας επαφής των φύλλων με τον ατμό. Χρησιμοποιήθηκαν γυμνά κλαδιά που έμειναν από τη συλλογή του δενδρολίβανου, τα οποία τοποθετήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ένα πλέγμα, πάνω στο οποίο τοποθετήθηκαν τα φύλλα δενδρολίβανου.

Στο τέλος της συσκευής απόσταξης προσαρμόζεται κατάλληλη διάταξη η οποία αποτελείται από ένα γυάλινο μικρό χωνί, μία εσμυρισμένη προχοΐδα, μία εσμυρισμένη φιάλη που προσαρμόζεται στην προχοΐδα και τέλος έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 250 mL. Η φιάλη και το μεγαλύτερο μέρος της προχοΐδας γεμίζουν με απιονισμένο νερό του οποίου ο όγκος σημειώνεται. Αυτό έγινε για να μη χάνεται μέρος του αιθέριου ελαίου στα τοιχώματα της προχοΐδας. Ο όγκος νερού που προστέθηκε σε αυτή τη διάταξη, σημειώθηκε για να αφαιρεθεί τελικά από τον τελικό όγκο ανθόνερου που λαμβάνεται μέχρι το τέλος της απόσταξης.

4.4.2 Παραλαβή αντιοξειδωτικών συστατικών με διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet

Εκχυλίσεις του δενδρολίβανου πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Soxhlet. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν τριών ειδών εκχυλίσεις. Η πρώτη έγινε σε δύο διαδοχικά στάδια με αιθανόλη, η δεύτερη πρώτα με διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα κι έπειτα με αιθανόλη και τέλος η τρίτη σε δύο διαδοχικά στάδια με διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα. Για το σκοπό αυτό, ποσότητα του ξηραμένου και κονιοποιημένου δενδρολίβανου, από το οποίο είχε απομακρυνθεί το αιθέριο έλαιο με υδροατμοαπόσταξη, ζυγίστηκε σε προζυγισμένη φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού και τοποθετήθηκε στον εκχυλιστήρα της συσκευής. Κατάλληλη ποσότητα διαλύτη προστέθηκε στη σφαιρική φιάλη της διάταξης, καθώς και στον εκχυλιστήρα. Η κάθε εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε ήταν εξαντλητική, δηλαδή έως ότου παρατηρηθεί απουσία χρώματος του διαλύματος εντός του εκχυλιστήρα. Μετά το πέρας της εκχύλισης, η ποσότητα του κάθε εκχυλίσματος που παραλήφθηκε, μεταφέρθηκε σε ογκομετρικές φιάλες των 500 mL υπό διήθηση. Ακολούθησαν πλύσεις των ιζημάτων που είχαν σχηματιστεί στη σφαιρική φιάλη με τον αντίστοιχο διαλύτη κάθε φορά, ώστε να παραληφθούν και οι εναπομείνασες στο στερεό διαλυτές ουσίες. Η διαδικασία πλύσεων επαναλήφθηκε μέχρι να συμπληρωθεί η ογκομετρική φιάλη μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη σφαιρική φιάλη και στον εκχυλιστήρα της συσκευής ο δεύτερος διαλύτης και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία.

4.4.3 Παραλαβή αντιοξειδωτικών συστατικών με εκχύλιση με υπερήχους

Ποσότητα 20 g ξηραμένου και κονιοποιημένου δενδρολίβανου ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 250 mL. Σε αυτή τη φιάλη προστέθηκε ποσότητα 200 mL αιθανόλης. Αφότου ετοιμάστηκαν δύο κωνικές φιάλες, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια μαζί με το περιεχόμενό τους σε λουτρό υπερήχων, η μία για 30 min και η άλλη για 60 min. Ανά δέκα λεπτά γινόταν δειγματοληψία και οι ποσότητες που παραλαμβάνονταν οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μετρήσεις DPPH και Folin-Ciocalteu. Μετά το πέρας του χρόνου της πρώτης εκχύλισης της μάζας δενδρολίβανου ακολούθησε δεύτερη εκχύλιση για ακόμα 40 min και για τις δύο κωνικές φιάλες με 200 mL φρέσκιας αιθανόλης. Ανά 10 min γινόταν και πάλι δειγματοληψία και μετά από φυγοκέντρηση ακολουθούσαν μετρήσεις DPPH και Folin-Ciocalteu. (Albu et al, 2004).

4.4.4 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος

5 mL εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης. Για το κάθε εκχύλισμα η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 70ºC, μέχρι να εξατμιστεί ο εκάστοτε διαλύτης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα ώστε να ψυχθούν και ακολούθησε ζύγισή τους. Από τη διαφορά των ζυγίσεων του κάθε φιαλιδίου υπολογίστηκε η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε στερεά συστατικά (g/L) και η επί τοις εκατό κατά βάρος σύσταση κάθε φυτού σε εκχυλισθέντα κλάσματα.

4.4.5 Αποχρωματισμός αιθανολικού εκχυλίσματος από υπερήχους

Ποσότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος το οποίο θα χρησιμοποιούταν ως φυσικό αντιοξειδωτικό στα επικαλυπτικά διαλύματα της παρούσας εργασίας, ήταν απαραίτητο να αποχρωματιστεί. Το αρχικό χρώμα του εκχυλίσματος ήταν σκούρο πράσινο, επομένως υπήρχε η περίπτωση, κατά την παρασκευή των επικαλυπτικών, η απόχρωσή τους να γινόταν πράσινη με αποτέλεσμα να είναι εμφανής κατά την επικάλυψη του τροφίμου. Ο αποχρωματισμός έγινε με σύριγγες (Bond Elut Carbon 250 mg, Agilent Technologies, US).

4.4.6 Παρασκευή προσομοιωτών

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας έγινε προσπάθεια παρασκευής ενός προσομοιωτή τροφίμου. Παρασκευάστηκε ζυμάρι με αλεύρι, φοινικέλαιο και νερό, το οποίο χωρίστηκε σε δείγματα των 35±5 g τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri χωρίς κάποια επικάλυψη και τα μισά δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 10ºC ενώ τα υπόλοιπα μπήκαν σε φούρνο στους 40ºC. Δειγματοληψίες γίνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έγινε παρακολούθηση της οξείδωσης της ζύμης με μέτρηση αριθμού υπεροξειδίων, συζυγών διενίων και τριενίων και αριθμού π-ανισιδίνης.

4.4.7 Παρασκευή διαλυμάτων επικάλυψης

Κατάλληλη ποσότητα καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης (CMC) ζυγίστηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε ορισμένη ποσότητα απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση υπό θέρμανση στους 80ºC για ορισμένο χρονικό διάσημα μέχρι να διαλυθεί μερικώς το CMC. Στη συνέχεια προστέθηκε και η υπόλοιπη ποσότητα απιονισμένου νερού μέχρι να διαλυθεί πλήρως το CMC. Τελικά παρασκευάστηκαν συνολικά 5 kg διαλύματος CMC περιεκτικότητας 1.5% w/w ως προς CMC. Το τελικό διάλυμα χωρίστηκε σε 6 ίσα μέρη. Στα δύο μέρη προστέθηκε Tween 20 σε συγκέντρωση 2% v/v ως γαλακτωματοποιητής. Τα πέντε από αυτά τα διαλύματα εμπλουτίστηκαν με αντιοξειδωτικό, ενώ το ένα χρησιμοποιήθηκε όπως ήταν ως επικαλυπτικό CMC χωρίς αντιοξειδωτικό.

Εικόνα 4.2 Επικαλυπτικά διαλύματα CMC με ενσωματωμένο εκχύλισμα δενδρολίβανου

4.4.8 Ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών στα διαλύματα επικάλυψης

Ως φυσικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιήθηκαν το αποχρωματισμένο αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου, το οποίο παρασκευάστηκε μέσω εκχύλισης με υπερήχους, καθώς και το αιθέριο έλαιό του που είχε παραληφθεί από υδροατμοαπόσταξη. Στα 5 από τα 6 μέρη της ποσότητας CMC που παρασκευάστηκε προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα αιθανολικού εκχυλίσματος.

Για την ενσωμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος, παραλήφθηκε η απαραίτητη κάθε φορά ποσότητά του σε σφαιρική φιάλη και προστέθηκε ποσότητα του διαλύματος επικάλυψης. Ακολούθησε απόσταξη σε περιστροφικό εξατμιστή κενού για να απομακρυνθεί ο διαλύτης. Μετά από την απόσταξη, στο διάλυμα CMC με το ενσωματωμένο εκχύλισμα προστίθετο η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος CMC έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα διαλύματα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού.

Συγκεκριμένα τα επίπεδα προσθήκης του αποχρωματισμένου εκχυλίσματος ήταν 200, 500 και 800 ppm ως προς τα ισοδύναμα trolox. Στην τέταρτη σειρά προστέθηκε αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου σε συγκέντρωση 2000 ppm και εκχύλισμα 200ppm ως προς τα ισοδύναμα trolox, στην πέμπτη σειρά προστέθηκε μόνο αιθέριο έλαιο σε συγκέντρωση 2000 ppm ενώ στην έκτη σειρά δεν προστέθηκε φυσικό αντιοξειδωτικό. Τα διαλύματα με αιθέριο έλαιο και αυτά με αντιοξειδωτικό οδηγήθηκαν σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (CAT Unidrive 1000, California). Τα τελικά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού έτσι ώστε να απομακρυνθούν πιθανά ίχνη του διαλύτη και παρέμειναν στο φούρνο κενού για λιγότερο από 24h οπότε και χρησιμοποιήθηκαν.

4.4.9 Επικάλυψη και αποθήκευση ιχθυρών

Τα χέλια αποτελούν μία κατηγορία ιχθύων με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπη. Αυτή η περιεκτικότητα παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις, ανάλογα με το είδος και την εποχή του έτους. Οι λιπαρές ουσίες στη σάρκα των χελιών ανέρχονται σε ποσοστό 0.1 – 25%. Τα λίπη των ιχθύων αποτελούνται από εστέρες λιπαρών οξέων (γλυκερίδια), εστέρες της στερόλης και από ένα ασαπωνοποίητο τμήμα, αποτελούμενο από ανώτερες αλκοόλες, στερόλες, αιθέρες και υδρογονάνθρακες. Στη σύνθεση των λιπών των ιχθύων απαντάται ένας μεγάλος αριθμός λιπαρών οξέων (Μπακλώρη, 2010).

Από ανάλυση φιλέτων χελιού από συνάδελφο στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΕΜΠ, προσδιορίστηκε η σύσταση φιλέτων χελιού ως προς τις ολικές πρωτεϊνες, τα λίπη, την αλατότητα, την υγρασία και τα ανόργανα συστατικά (τέφρα). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 4.1 (Μπακλώρη, 2010).

Πίνακας 4.1 Μέση διατροφική αξία ανά 100 g καπνιστού φιλέτου

Πρωτεΐνες	**21.4 g**
Υδατάνθρακες	0 g
Λίπη	23.9 g
Κορεσμένα	6.4 g
Ω3 λιπαρά οξέα	4.1 g
20:5 Ω3/Omega 3 EPA	1441 mg
22:6 Ω3/Omega 3 DHA	1404 mg
Νάτριο	0.9 g
Ενέργεια	1258 kJ/ 301 kcal

Στους πίνακες 4.2 και 4.3 παρουσιάζεται η ανάλυση των λιπών των δειγμάτων.

Πίνακας 4.2 Ανάλυση λιπαρής ύλης δειγμάτων καπνιστού χελιού

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ	ΜΟΝΑΔΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΟΡΙΑ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ	ΟΡΙΑ ΑΝΩΤΑΤΑ
Σύσταση λιπαρών οξέων	* AOAC 996,06		-	-	-
C 4:0 Βουτυρικό	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 6:0 Καπροϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 8:0 Καπρυλικό	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 10:0 Καπρινικό	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 11:0	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 12:0 Λαουρικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.06	-	-
C 13:0	* >>	% λιπαρής ύλης	0.02	-	-
C 14:0 Μυριστικό	* >>	% λιπαρής ύλης	5.13	-	-
C 14:1 Μυριστελαϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.06	-	-
C 15:0	* >>	% λιπαρής ύλης	0.33	-	-
C 15:1	* >>	% λιπαρής ύλης	Μη ανιχνεύσιμο	LOD=0.003	-
C 16:0 Παλμιτικό	* >>	% λιπαρής ύλης	16.38	-	-
C 16:1 Παλμιτελαϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	5.99	-	-
C 17:0 Δεκαεπτανικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.08	-	-
C 17:1 Δεκαεπτενικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.22	-	-
C 18:0 Στεατικό	* >>	% λιπαρής ύλης	4.57	-	-
C 18:1 Ελαϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	22.49	-	-
C 18:1 ω7	* >>	% λιπαρής ύλης	2.92	-	-
C 18:2 ω6 Λινελαϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	11.72	-	-
C 18:3 ω3 Λινολενικό	* >>	% λιπαρής ύλης	1.27	-	-
C 18:3 ω6	* >>	% λιπαρής ύλης	0.13	-	-
C 20:0 Αραχιδικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.13	-	-

Πίνακας 4.3 Ανάλυση λιπαρής ύλης δειγμάτων καπνιστού χελιού

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ	ΜΟΝΑΔΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΟΡΙΑ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ	ΟΡΙΑ ΑΝΩΤΑΤΑ
C 20:1 ω9 Γκαδελαϊκό	* >>	% λιπαρής ύλης	1.08	-	-
C 20:2 ω6	* >>	% λιπαρής ύλης	0.49	-	-
C 20:3 ω3	* >>	% λιπαρής ύλης	0.70	-	-
C 20:3 ω6	* >>	% λιπαρής ύλης	0.36	-	-
C 20:4 ω6	* >>	% λιπαρής ύλης	0.11	-	-
C 20:5 ω3 (EPA)	* >>	% λιπαρής ύλης	6.45	-	-
C 21:0	* >>	% λιπαρής ύλης	0.01	-	-
C 22:0 Βεχενικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.04	-	-
C 22:1 Ερουκικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.09	-	-
C 22:2 ω6	* >>	% λιπαρής ύλης	0.03	-	-
C 22:5 ω3	* >>	% λιπαρής ύλης	3.67	-	-
C 22:6 ω3 (DHA)	* >>	% λιπαρής ύλης	5.89	-	-
C 23:0	* >>	% λιπαρής ύλης	0.02	-	-
C 24:0 Λιγνοκερικό	* >>	% λιπαρής ύλης	0.03	-	-
C 24:1	* >>	% λιπαρής ύλης	0.11	-	-
Λοιπά μη ταυτοποιηθέντα	* >>	% λιπαρής ύλης	9.35	-	-
Κορεσμένα λιπαρά	* >>	% λιπαρής ύλης	26.78	-	-
Ακόρεστα λιπαρά	* >>	% λιπαρής ύλης	63.87	-	-
Μονοακόρεστα λιπαρά	* >>	% λιπαρής ύλης	33.58	-	-
Πολυακόρεστα λιπαρά	* >>	% λιπαρής ύλης	30.29	-	-
Trans λιπαρά	* >>	% λιπαρής ύλης	0.50	-	-

Παραλήφθηκαν συσκευασμένα φιλέτα καπνιστού χελιού, η μεταφορά των οποίων έγινε σε κατάλληλες συσκευασίες οι οποίες περιείχαν επαρκή ποσότητα πάγου για τη διατήρηση των ιχθυρών. Τα φιλέτα μετά την παραλαβή τους φυλάχθηκαν σε ψυγείο στους 4ºC για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι την επεξεργασία τους. Για την παρασκευή των σειρών δειγμάτων, τα φιλέτα τεμαχίζονταν έτσι ώστε το κάθε δείγμα να έχει μάζα 45±5 g. Τα τεμαχισμένα φιλέτα στη συνέχεια εμβαπτίζονταν στο κατάλληλο επικαλυπτικό διάλυμα στο οποίο και παρέμεναν για 5 min. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε σχάρες μέχρι να στεγνώσουν.


Εικόνα 4.3 Φιλέτα χελιού τεμαχισμένα πριν την εμβάπτιση στα επικαλυπτικά διαλύματα

Οι 6 σειρές δειγμάτων με επικαλυπτικό και η μία σειρά Control η οποία δεν είχε επικαλυπτικό, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri και χωρίστηκαν σε δύο θερμοκρασίες, στους 4ºC και στους 10ºC. Μετά την αποθήκευση των ιχθυρών πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της πορείας της οξείδωσής τους, κάνοντας μετρήσεις του αριθμού υπεροξειδίων, των συζυγών διενίων και τριενίων καθώς του αριθμού π-ανισιδίνης του ελαίου των ιχθυρών. Στην κάθε θερμοκρασία παραλαμβάνονταν διπλά δείγματα χελιών για το κάθε επικαλυπτικό που είχε παρασκευαστεί καθώς και διπλά δείγματα Control.

4.5 Αναλυτικές μέθοδοι

4.5.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών (TP) των εκχυλισμάτων. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 7.9 mL απιονισμένο νερό, 0.1 mL από το κάθε εκχύλισμα το οποίο είχε αραιωθεί κατάλληλα και 0.5 mL αντιδραστήριο Folin. Ακολουθούσε ανάδευση και στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεντο 1.5 mL Na_2CO_3. Έπειτα από ανάδευση οι σωλήνες αφήνονταν σε ηρεμία σε υδατόλουτρο (Memmert WB 22, Germany) στους 40ºC για 30 min και ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U29000). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE), μέσω κατασκευής καμπύλης αναφοράς.

4.5.2 Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με ρίζα DPPH

Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών προσδιορίστηκε έναντι της ρίζας του DPPH, σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνεται από τους Brand-Williams et al. (1995). Το διάλυμα DPPH παρασκευαζόταν αυθημερόν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. 0.0025 g DPPH ζυγίζονταν και τοποθετούνταν στην ογκομετρική φιάλη η οποία στη συνέχεια συμπληρωνόταν με μεθανόλη HPLC μέχρι τη χαραγή. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το DPPH στη μεθανόλη.

Υπό σταθερή θερμοκρασία 25°C, 3.9 mL του μεθανολικού διαλύματος DPPH τοποθετούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε αυτούς προστίθεντο 0.1 mL εκχυλίσματος το οποίο είχε αραιωθεί κατάλληλα. Ταυτόχρονα παρασκευάζονταν και δύο τυφλά δείγματα με 3.9 mL DPPH και 0.1 mL MeOH. Τα τυφλά διαλύματα παρασκευάζονται ώστε να προσδιοριστεί ο ρυθμός του αυθόρμητου αποχρωματισμού της ρίζας, ο οποίος χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την κατάλληλη διόρθωση της μείωσης της απορρόφησης του δείγματος, λόγω αντίδρασης της ρίζας με τα φλαβονοειδή. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες έπειτα από ανάδευση παρέμεναν σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα ούτως ώστε να γίνει η αντίδραση. Στη συνέχεια πραγματοποιείτο φωτομέτρηση στα 515 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U29000). Το πρώτο τυφλό μετριόταν στην αρχή των φωτομετρήσεων και το δεύτερο μετά το πέρας όλων των φωτομετρήσεων.

4.5.3 Παραλαβή ελαίου από τον προσομοιωτή τροφίμου

Κάθε δείγμα ζυμαριού οδηγούταν σε blender όπου γινόταν έντονη ανάδευση μαζί με 50 mL εξανίου. Το μίγμα στη συνέχεια έμπαινε σε ποτήρι ζέσεως και οδηγούταν στη συσκευή υπερήχων όπου και παρέμενε για 10 min. Στη συνέχεια συγκεντρωνόταν το υγρό σε σφαιρική φιάλη και επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία μία ακόμα φορά. Το τελικό διάλυμα μετά και τη δεύτερη διήθηση πήγαινε προς απόσταξη σε περιστροφικό εξατμιστή κενού, όπου και παρέμενα για τουλάχιστον 15 min μέχρι να απομακρυνθεί όλο το εξάνιο και στη σφαιρική φιάλη να παραμείνει μόνο το έλαιο. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 5 min ούτως ώστε να απομακρυνθούν τυχόν στερεά που δεν είχαν απομακρυνθεί από τις προηγούμενες διηθήσεις και παραλαμβανόταν το έλαιο.

4.5.4 Παραλαβή ελαίου από τα δείγματα ιχθυρών

Κάθε δείγμα χελιού οδηγούταν σε blender και στη συνέχεια η μάζα έμπαινε σε ποτήρι ζέσεως μαζί με 30 mL χλωροφόρμιο και 60 mL MeOH. Το ποτήρι στη συνέχεια τοποθετείτο στη συσκευή υπερήχων για 10 min. Μετά το πέρας των 10 min στο ίδιο ποτήρι προστίθεντο 30 mL χλωροφορμίου και ακολουθούσε τοποθέτηση στο λουτρό υπερήχων για 2 min και ακολούθως προστίθεντο άλλα 30 mL απιονισμένου νερού ενώ ακολουθούσαν υπέρηχοι για 2 min ακόμα. Έπειτα από αυτή τη διαδικασία γινόταν διήθηση υπό κενό για να απομακρυνθούν τα στερεά του φιλέτου, ενώ το υγρό αφηνόταν να έρθει σε ηρεμία για να γίνει διαχωρισμός των στιβάδων. Η κάτω στιβάδα, η οποία περιείχε το έλαιο από το φιλέτο χελιού μαζί με χλωροφόρμιο, οδηγείτο στη συνέχεια προς απόσταξη σε περιστροφικό εξατμιστή κενού, όπου και παρέμενε για τουλάχιστον 15 min μέχρι να μείνει μόνο το έλαιο στη σφαιρική φιάλη. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 5 min για να απομακρυνθούν και τα τελευταία στερεά που ίσως δεν είχαν απομακρυνθεί στη διήθηση.

4.5.5 Μέθοδος μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (P.V.)

Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων έγινε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο της AOCS, Cd 8-53. 1g λιπαρής ύλης ζυγιζόταν σε κωνική φιάλη των 100 mL και γινόταν καταγραφή της ακριβούς μάζας. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 20 mL διαλύματος οξικού οξέος-χλωροφορμίου σε αναλογία 3:2 v/v και 500 μL κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Ακολουθούσε ανάδευση για 1 min και έπειτα γινόταν προσθήκη 20 mL απιονισμένου νερού και 500 μL διαλύματος αμύλου (1% w/v). Το επόμενο βήμα ήταν η τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0.01 N και γινόταν καταγραφή του όγκου του απαιτούμενου διαλύματος. Παράλληλα γινόταν τιτλοδότηση και σε ένα τυφλό δείγμα έτσι ώστε να ελεγχθεί τυχόν ανάπτυξη αριθμών υπεροξειδίων στο διάλυμα ιωδιούχου καλίου και στο μίγμα διαλυτών. Έπειτα από αυτή τη διαδικασία υπολογίζεται ο αριθμός των υπεροξειδίων (Peroxide Value (PV)) σύμφωνα με τον τύπο:

$$PV = \frac{(S - B) \cdot N \cdot 1000}{m}$$

όπου:

S - ο όγκος του $Na_2S_2O_3$ που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του δείγματος ελαίου (mL)

B - ο όγκος του $Na_2S_2O_3$ που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος (mL)

N - η κανονικότητα του διαλύματος $Na_2S_2O_3$

m - η μάζα του δείγματος (g)

4.5.6 Μέθοδος μέτρησης αριθμού συζυγών διενίων-τριενίων (CD)

Ο αριθμός των συζυγών διενίων και τριενίων μετρήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο της IUPAC 2.205-2.206. Ποσότητα 0.03 g ελαίου ζυγιζόταν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γινόταν καταγραφή της ακριβούς μάζας. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρωνόταν μέχρι τη χαραγή με ισοοκτάνιο. Ακολουθούσε ανάδευση των δειγμάτων για την ομογενοποίησή τους και μέτρηση της απορρόφησής τους σε δύο μήκη κύματος, στα 232 nm και στα 268 nm, ώστε να προκύψει ο αριθμός συζυγών διενίων (K_{232}) και τριενίων (K_{268}), αντίστοιχα. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιούταν καθαρό ισοοκτάνιο. Σε περίπτωση που οι τιμές των απορροφήσεων προέκυπταν μεγαλύτερες της μονάδας πραγματοποιούταν κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων και έπειτα εκ νέου φωτομέτρηση. Ο αριθμός συζυγών διενίων και τριενίων υπολογίζεται σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$K_{232} = \frac{A_{232}}{C \cdot d}$$

$$K_{268} = \frac{A_{268}}{C \cdot d}$$

όπου:

A_{232} - η απορρόφηση του δείγματος στα 232 nm

A_{268} - η απορρόφηση του δείγματος στα 268 nm

C - η συγκέντρωση του δείγματος (g/100 mL)

d- το μήκος της κυψελίδας (d = 1 cm)

4.5.7 Μέθοδος μέτρησης αριθμού π-ανισιδίνης (p-AV)

Για τη μέτρηση του αριθμού της π-ανισιδίνης χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη μέθοδος της AOCS, Cd 18-90. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL ζυγιζόταν ποσότητα ελαιοδιαλύματος ίση με 1 g και γινόταν καταγραφή της ακριβούς μάζας. Το κάθε δείγμα αραιωνόταν μέχρι τη χαραγή με ισοοκτάνιο, αναδευόταν για πλήρη ομογενοποίησή του και προσδιοριζόταν η απορρόφησή του στα 350 nm (A_b). Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείτο διαλύτης ισοοκτανίου. Στη συνέχεια, παραλαμβάνονταν 5 mL από το κάθε αραιωμένο ελαιοδιάλυμα και εισάγονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου και ακολουθούσε προσθήκη 1 mL αντιδραστηρίου π-ανισιδίνης . Ομοίως, παρασκευαζόταν το τυφλό δείγμα, με προσθήκη 1 mL διαλύματος π-ανισιδίνης σε 5 mL καθαρού ισοοκτανίου. Ακολουθούσε καλή ανακίνηση όλων των δειγμάτων και αφού παρέμεναν σε ηρεμία για 10 min, γινόταν μέτρηση της απορρόφησής τους στα 350 nm και πάλι (A_s). Ο υπολογισμός του αριθμού π-ανισιδίνης (p-anisidine value (p-AV)) γίνεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$pAV = \frac{25 \cdot (1.2 \cdot A_s - A_b)}{m}$$

όπου:

A_s - η απορρόφηση του αραιωμένου ελαιοδιαλύματος μετά την αντίδρασή του με την π-ανισιδίνη

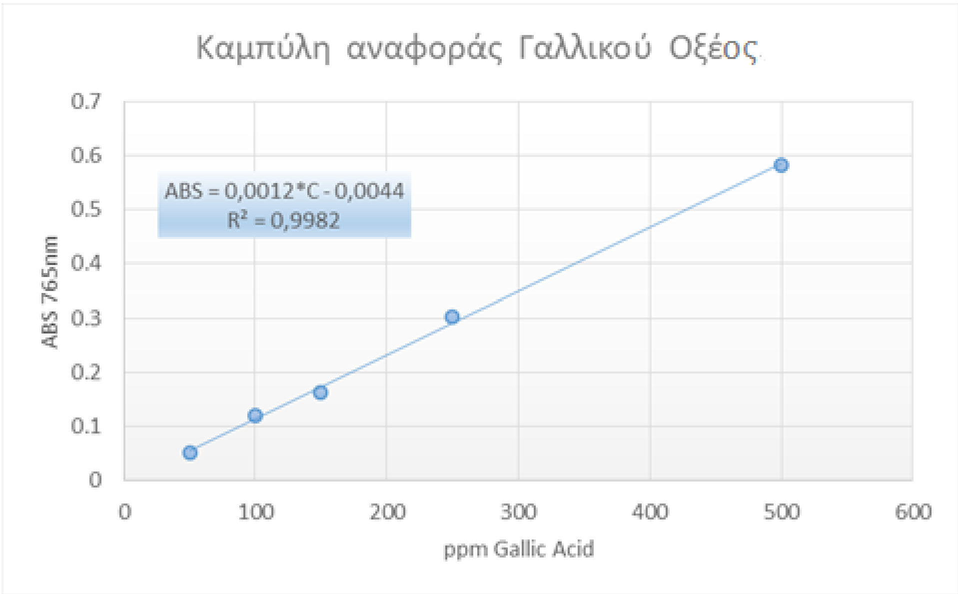
A_b - η αρχική απορρόφηση του αραιωμένου ελαιοδιαλύματος

m - η μάζα του ελαιοδιαλύματος (g)

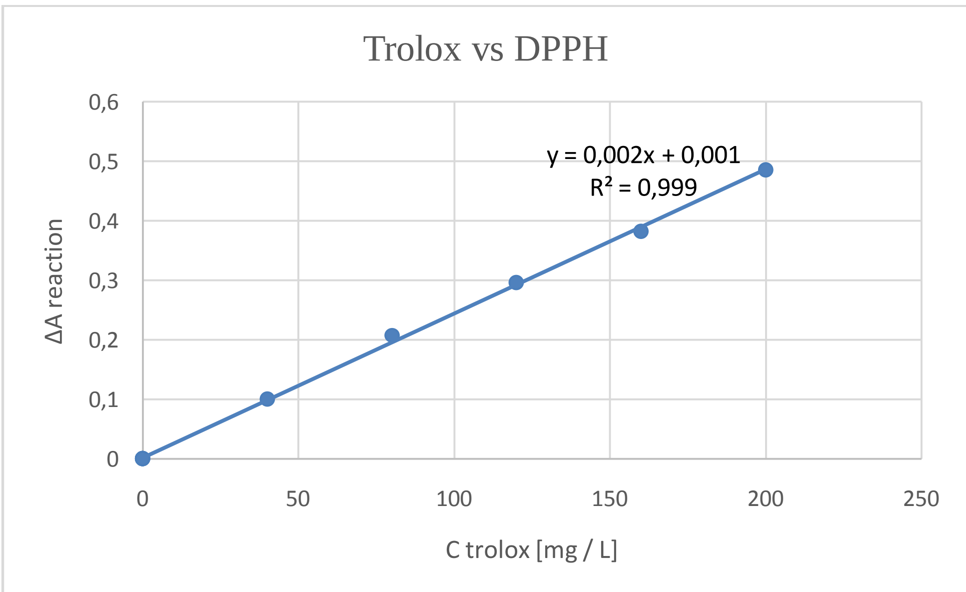
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Ανάλυση εκχυλισμάτων δενδρολίβανου

Τα εκχυλίσματα τόσο από τις διαδοχικές εκχυλίσεις Soxhlet όσο και από υπερήχους μελετήθηκαν ως προς τα ολικά φαινολικά τους (TP) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ μετρήθηκε επίσης η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE), ενώ τα αποτελέσματα της ικανότητας δέσμευσης DPPH εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mg trolox/ L εκχυλίσματος. Παρακάτω παρατίθενται στα διαγράμματα 5.1 και 5.2 οι καμπύλες αναφοράς γαλλικού οξέος και ισοδυνάμων trolox συναρτήσει του DPPH.



Διάγραμμα 5.1 Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος



Διάγραμμα 5.2 Καμπύλη αναφοράς trolox

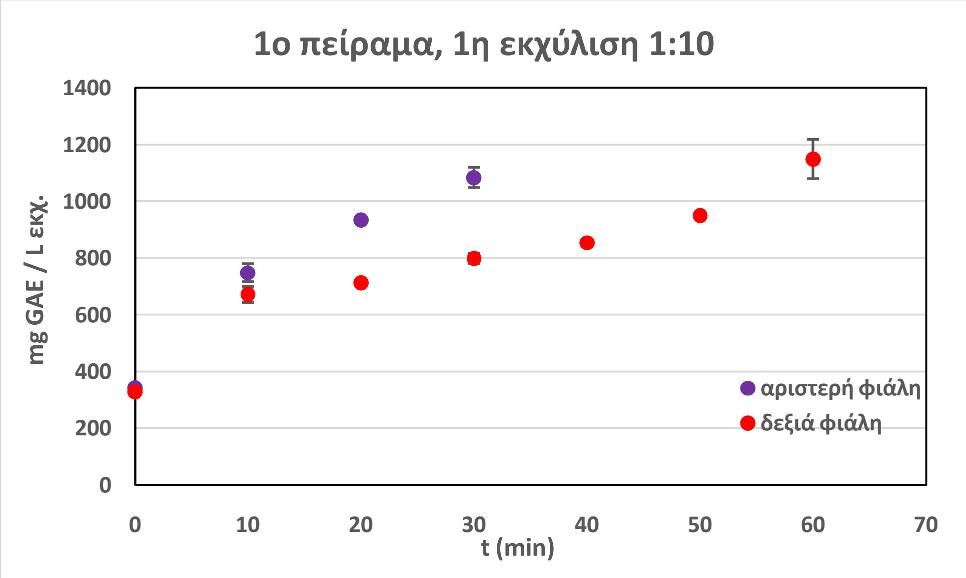
Το trolox είναι ένα αντιοξειδωτικό το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως βάση αναφοράς για να μπορούν τα αποτελέσματα κάθε έρευνας να έχουν βάση σύγκρισης. Η συγκέντρωση DPPH εκφράζεται σε mg DPPH/L MeOH. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 515 nm, όπου εμφανίζει μέγιστο το DPPH σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Αποχρωματισμός του DPPH παρατηρείται τόσο κατά την αντίδρασή του με αντιοξειδωτικές ουσίες, όσο και κατά την παραμονή του στο μεθανολικό διάλυμα. Επομένως ως ΔA reaction ορίζεται η διαφορά απορρόφησης του δείγματος από την απορρόφηση του DPPH μετά το πέρας της αντίδρασης και η οποία αντιστοιχεί στον αποχρωματισμό του DPPH που έλαβε χώρα λόγω της αντίδρασής του με το δραστικό αντιοξειδωτικό εκχύλισμα. Με την καμπύλη αναφοράς 5.2 οι μεταβολές απορρόφησης κάθε εκχυλίσματος μετατράπηκαν σε συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στο εκχύλισμα εκφρασμένη σε ισοδύναμα trolox (mg / L). Με την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος μπορούν να μετατραπούν οι τιμές απορρόφησης των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν, σε τιμές συγκέντρωσης ισοδυνάμων γαλλικού οξέος και επομένως με αυτό τον τρόπο να υπολογιστούν τα ολικά φαινολικά των εκχυλισμάτων.

5.2 Απόδοση εκχυλίσεων σε λουτρό υπερήχων

Όπως αναφέρθηκε στην Πειραματική Διαδικασία, για την παραλαβή του αιθανολικού εκχυλίσματος με χρήση του λουτρού υπερήχων, ποσότητα 20 g ξηραμένου και κονιοποιημένου δενδρολίβανου ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 mL. Σε αυτή τη φιάλη προστέθηκε ποσότητα 200 mL αιθανόλης (αναλογία 1:10). Αφότου ετοιμάστηκαν δύο κωνικές φιάλες, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια μαζί με το περιεχόμενό τους σε λουτρό υπερήχων, η μία για 30 min και η άλλη για 60 min. Ανά 10 min γινόταν δειγματοληψία και οι ποσότητες που παραλαμβάνονταν οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση και στη συνέχεια πραγματοποιούνταν μετρήσεις DPPH και Folin-Ciocalteu. Μετά το πέρας του χρόνου της πρώτης εκχύλισης της μάζας δενδρολίβανου ακολούθησε δεύτερη εκχύλιση για ακόμα 40 min και για τις δύο κωνικές φιάλες με 100 mL φρέσκιας αιθανόλης (αναλογία 1:5). Ανά 10 min γινόταν και πάλι δειγματοληψία και μετά από φυγοκέντρηση ακολουθούσαν μετρήσεις DPPH και Folin-Ciocalteu. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές και τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν σε διαγράμματα τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

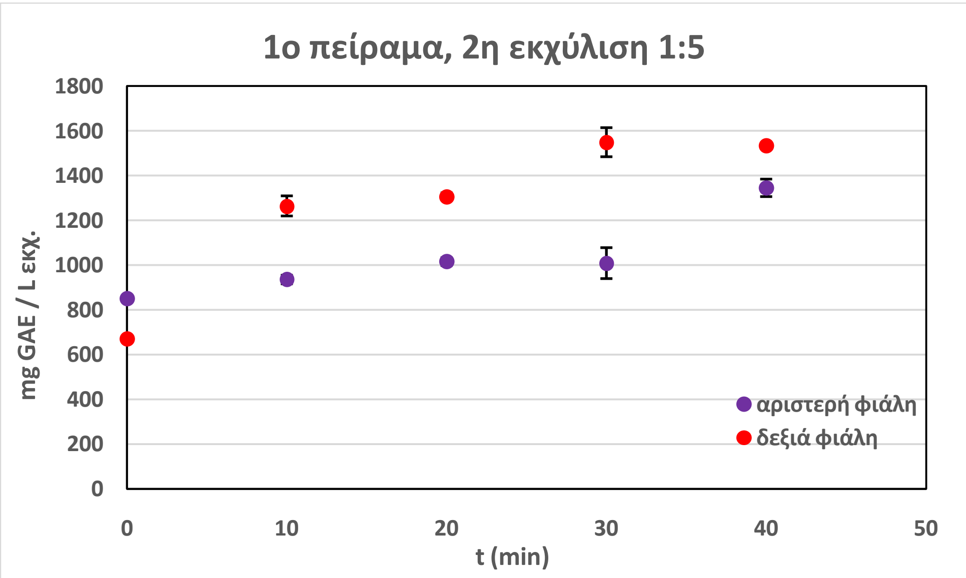
Folin-Ciocalteu

Στο πρώτο πείραμα εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκε τα αποτελέσματα των πρώτων και δεύτερων εκχυλίσεων φαίνονται στα διαγράμματα 5.3 και 5.4.



Διάγραμμα 5.3 Αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu για την πρώτη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 30 και 60 min αντίστοιχα

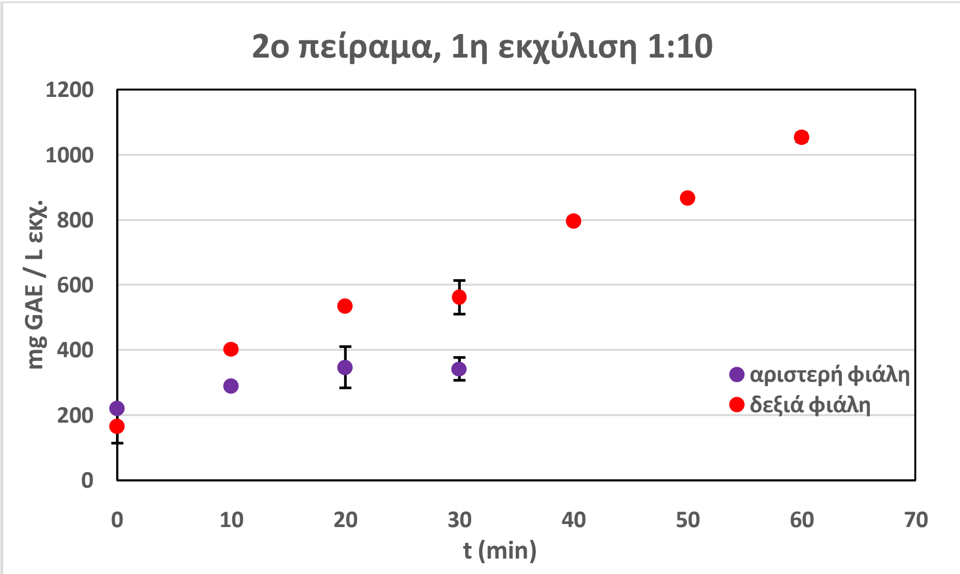
Στην πρώτη εκχύλιση παρατηρείται ταχεία αύξηση των mg GAE/L εκχυλίσματος, ενώ παρατηρείται και μία σημαντική διαφορά μεταξύ της κωνικής φιάλης που τοποθετήθηκε στην αριστερή θέση του λουτρού υπερήχων και αυτής που τοποθετήθηκε στη δεξιά. Οι τιμές της αριστερά κωνικής φιάλης φαίνεται να είναι υψηλότερες από αυτές της δεξιά κωνικής φιάλης.



Διάγραμμα 5.4 Αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu για την δεύτερη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 40 min

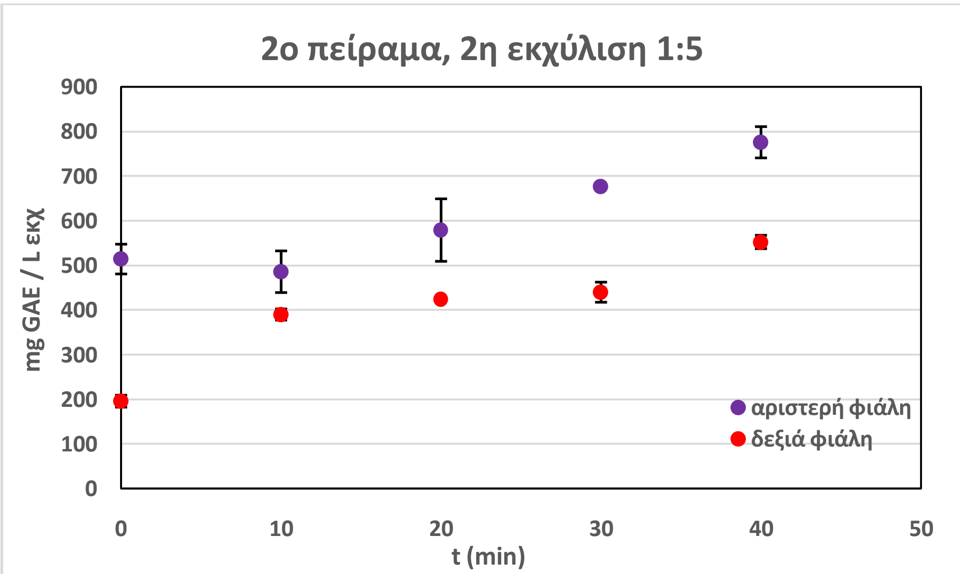
Στις δεύτερες εκχυλίσεις παρατηρείται ότι η φυτόμαζα η οποία προηγουμένως είχε εκχυλιστεί για 60 min, δηλαδή στη δεξιά κωνική φιάλη συνεχίζει να εκχυλίζεται με μεγαλύτερη απόδοση αυτή τη φορά από την κωνική φιάλη η οποία προηγουμένως εκχυλίστηκε για 30 min.

Στο δεύτερο πείραμα εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο τα αποτελέσματα της μεθόδους Folin-Ciocalteu παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.5 και 5.6.



Διάγραμμα 5.5 Αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu για την πρώτη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 30 και 60 min αντίστοιχα

Στο δεύτερο πείραμα παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με το πρώτο. Η απόδοση της εκχύλισης φαίνεται να έχει μειωθεί καθώς οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 200 και 1000 mg GAE/L εκχυλίσματος. ενώ στο πρώτο πείραμα όλες οι τιμές εκτός από αυτές του χρόνου μηδέν κυμαίνονται μεταξύ 600 και 1200 mg GAE/L εκχυλίσματος.



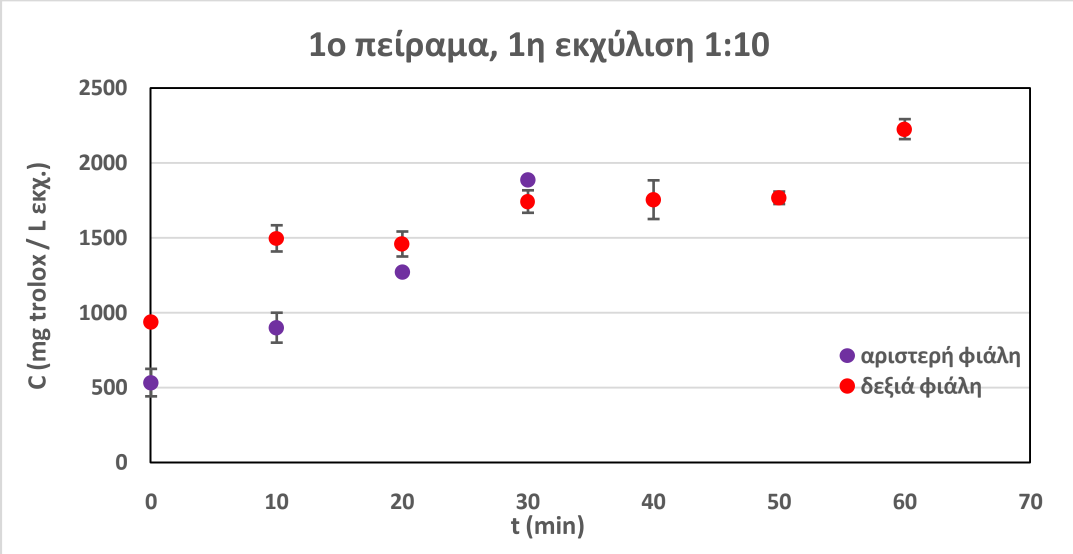
Διάγραμμα 5.6 Αποτελέσματα της Folin-Ciocalteu για την δεύτερη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 40 min

Οι ίδιες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν και για τις δεύτερες εκχυλίσεις όπου πάλι οι τιμές είναι χαμηλότερες απ' ότι στο πρώτο πείραμα, όμως εδώ η φυτόμαζα η οποία προηγουμένως είχε εκχυλιστεί για 60 min και βρισκόταν στη δεξιά θέση του λουτρού υπερήχων, εκχυλίζεται με μικρότερη απόδοση αυτή τη φορά από την κωνική φιάλη η οποία προηγουμένως εκχυλίστηκε για 30 min και ήταν τοποθετημένη στην αριστερή θέση του λουτρού υπερήχων. Αυτό μπορεί να συμβαίνει επειδή στην αριστερή κωνική φιάλη τα φαινολικά της φυτόμαζας δεν πρόλαβαν να αυξηθούν αρκετά και έτσι στη δεύτερη εκχύλιση εκχυλίστηκαν περισσότερα.

Στα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων είναι εμφανές ότι υπάρχουν διαφορές, στις αποδόσεις των εκχυλίσεων σε ολικά φαινολικά (mg GAE/L) που παρουσίαζαν οι δύο κωνικές φιάλες μεταξύ τους. Στο δεύτερο πείραμα οι τιμές των ισοδύναμων του γαλλικού οξέος είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές του πρώτου πειράματος, ενώ δεν παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά μεταξύ των δύο φιαλών που υποβλήθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι στο λουτρό υπερήχων δεν γινόταν καταγραφή της θερμοκρασίας, η οποία σημείωνε άνοδο κατά τη χρήση του λουτρού. Πιθανώς η θερμοκρασία επηρέασε την εκχύλιση, διότι ενώ πραγματοποιήθηκε ακριβώς το ίδιο πείραμα δύο φορές, οι μεγάλες διαφορές στα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάποιος παράγοντας τα επηρέασε. Άλλος ένας παράγοντας ο οποίος πιθανώς επηρέασε την εκχύλιση στο λουτρό υπερήχων είναι η θέση στην οποία τοποθετήθηκε η κάθε κωνική φιάλη, αν και δεν προέκυψε κάτι σαφές από την αλλαγή θέσεων. Επί πλέον η ανομοιομορφία των σωματιδίων του δενδρολίβανου πιθανώς επηρεάζει σημαντικά την ανάκτηση του εκχυλίσματος. Οι Romdhane et al (2002) σε πείραμά τους εξέτασαν την επίδραση της κοκκομετρίας του φυτού στην περίπτωση εκχύλισης με υπέρηχους. Όσο μικρότερη είναι η κοκκομετρία, τόσο μεγαλύτερη η επιφάνεια επαφής και συνεπώς η απόδοση της εκχύλισης. Για να εξαχθούν πιο σαφή αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναληφθεί το πείραμα και να ληφθούν υπόψη ο παράγοντας της θερμοκρασίας και η θέση μέσα στο λουτρό υπερήχων.

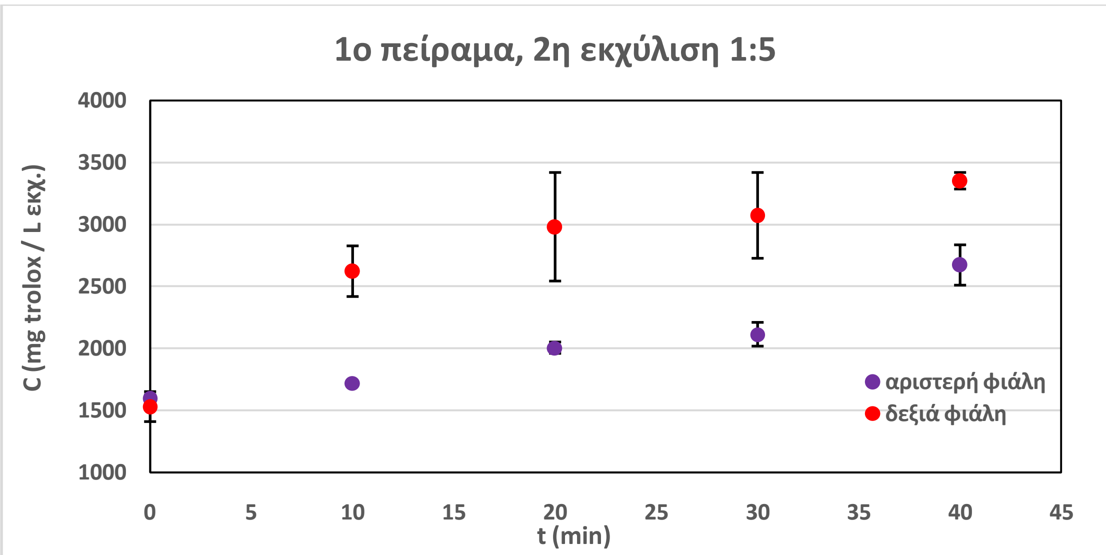
DPPH

Η μέθοδος δέσμευσης ελευθέρων ριζών δείχνει να έχει παρόμοια αποτελέσματα, κάτι το οποίο επιβεβαιώνει ότι κάποιος παράγοντας επηρέασε την εκχύλιση των δύο κωνικών φιαλών. Τα διαγράμματα αυτής της μεθόδου παρουσιάζονται παρακάτω.



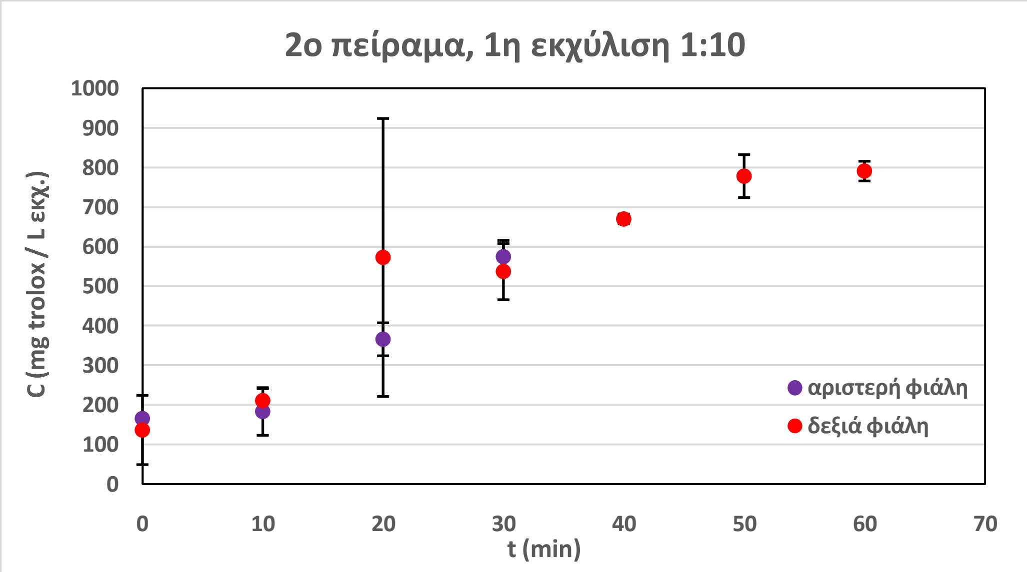
Διάγραμμα 5.7 Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH για την πρώτη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 30 και 60 min αντίστοιχα

Στην πρώτη εκχύλιση παρατηρείται ταχεία αύξηση των mg trolox/L εκχυλίσματος, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ της κωνικής φιάλης που παρέμεινε 30 min στο λουτρό υπερήχων και αυτής που παρέμεινε για 60 min. Παρ' όλα αυτά η κωνική φιάλη που βρισκόταν στην αριστερή θέση του λουτρού είχε λίγο χαμηλότερες τιμές σε mg trolox/L εκχυλίσματος.



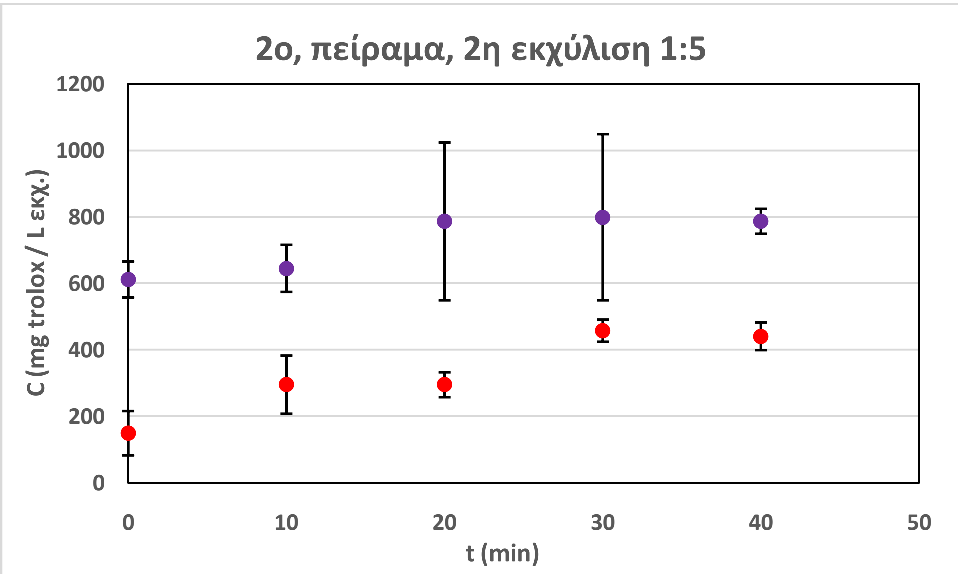
Διάγραμμα 5.8 Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH για την δεύτερη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 40 min

Στις δεύτερες εκχυλίσεις παρατηρείται ότι η φυτόμαζα η οποία προηγουμένως είχε εκχυλιστεί για 60 min και ήταν τοποθετημένη στη δεξιά θέση του λουτρού υπερήχων συνεχίζει να εκχυλίζεται με μεγαλύτερη απόδοση αυτή τη φορά από την κωνική φιάλη η οποία προηγουμένως εκχυλίστηκε για 30 min και οι μάλιστα οι τιμές έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους.



Διάγραμμα 5.9 Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH για την πρώτη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 30 και 60 min αντίστοιχα

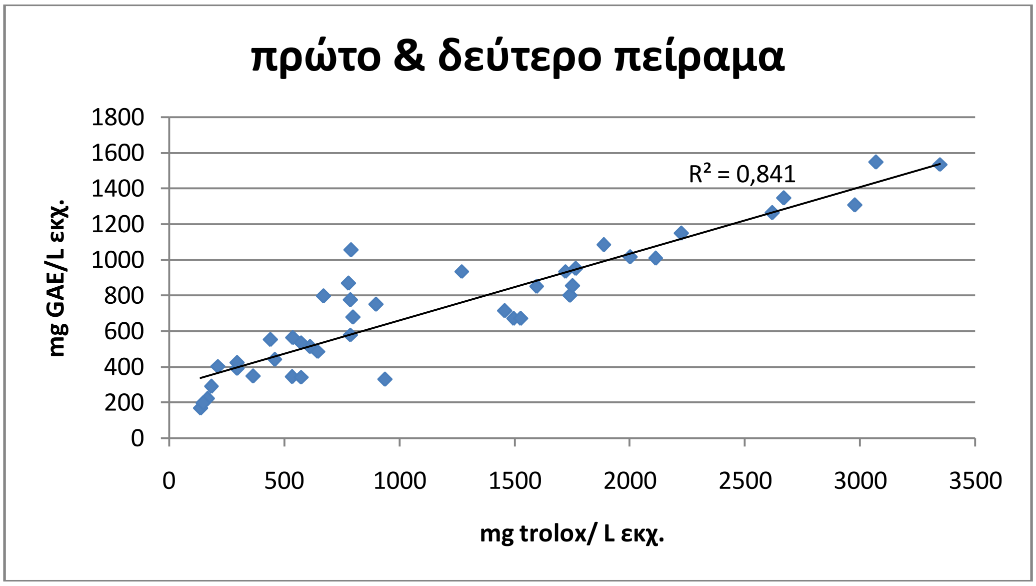
Στο δεύτερο πείραμα παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με το πρώτο. Η απόδοση της εκχύλισης φαίνεται να έχει μειωθεί καθώς οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 100 και 800 mg trolox/L εκχυλίσματος ενώ στο πρώτο πείραμα όλες οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 500 και 2200 mg trolox/L εκχυλίσματος. Παρ' όλα αυτά η δεξιά και αριστερή κωνική φιάλη δείχνουν να έχουν σχεδόν την ίδια πορεία εκχύλισης μέχρι τα 30 min όπου και διακοπτόταν η εκχύλιση της αριστερής κωνικής φιάλης.



Διάγραμμα 5.10 Αποτελέσματα της μεθόδου DPPH για την δεύτερη εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για τις δύο κωνικές φιάλες με χρόνους παραμονής 40 min

Οι ίδιες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν και για τις δεύτερες εκχυλίσεις όπου πάλι οι τιμές είναι χαμηλότερες απ' ότι στο πρώτο πείραμα, όμως εδώ η φυτόμαζα η οποία προηγουμένως είχε εκχυλιστεί για 60 min στη δεξιά θέση του λουτρού υπερήχων εκχυλίζεται με μικρότερη απόδοση αυτή τη φορά από την κωνική φιάλη η οποία προηγουμένως εκχυλίστηκε για 30 min στη δεξιά θέση του λουτρού, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για την απόδοση σε ολικές φαινόλες.

Επειδή η ικανότητα δέσμευσης ριζών οφείλεται στα φαινολικά συστατικά του εκχυλίσματος έγινε προσπάθεια συσχέτισης των δύο μεγεθών. Η συσχέτιση των ολικών φαινολών (mg GAE/L) και της δραστικότητας έναντι της δέσμευσης DPPH (mgtrolox/L) σε όλα τα δείγματα έδειξε ότι υπάρχει μία γραμμική συσχέτιση με αρκετά μεγάλη όμως διασπορά (R^2 = 0.8413), όπως φαίνεται στο διάγραμμα 5.11. Εκτός από τη συσχέτιση όλων των τιμών μεταξύ τους έγινε δοκιμή συσχέτισης με βάση τον αριθμό πειράματος, τη θέση της φιάλης και τον αριθμό εκχύλισης. Η βασική διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν ότι οι δεύτερες εκχυλίσεις είχαν καλύτερη συσχέτιση (R^2 = 0.9524) από τις πρώτες (R^2 = 0.6354), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη φύση των ουσιών που εκχυλίζονται και χρειάζεται περεταίρω διερεύνηση. Τα διαγράμματα παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω:



Διάγραμμα 5.11 Συσχέτιση ολικών φαινολικών με ικανότητα δέσμευσης ριζών. Το διάγραμμα περιλαμβάνει τις τιμές και από τα δύο πειράματα, και από τις δύο κωνικές φιάλες και από τις δύο εκχυλίσεις

Πίνακας 5.1 Σύγκριση αποδόσεων των εκχυλίσεων που δοκιμάστηκαν στο λουτρό υπερήχων

Πείραμα	Αριθμός εκχύλισης	Απόδοση σε φαινολικά συστατικά (gGAE/kg ξηρής φυτόμαζας)		Απόδοση σε αντιοξειδωτικά συστατικά (gtrolox/kg ξηρής φυτόμαζας)	
1ο	1η	11.50*	10.85**	22.24*	18.87**
	2η	7.67	6.73	16.74	9.44
	Ολικό	19.17	17.58	38.98	28.31
2ο	1η	10.54*	3.42**	7.91*	5.74**
	2η	2.76	3.88	2.21	3.94
	Ολικό	13.3	7.3	10.12	9.68

*60 min, ** 30 min

Τα αποτελέσματα συνολικά δεν επιτρέπουν κάποιο σαφές συμπέρασμα για την απόδοση σε σχέση με το χρόνο και τον αριθμό εκχύλισης. Οι αποδόσεις διαφέρουν αρκετά για το πρώτο και το δεύτερο πείραμα, με τις αποδόσεις του δεύτερου πειράματος να είναι αρκετά χαμηλότερες από αυτές του πρώτου. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι οι δεύτερες εκχυλίσεις είχαν χαμηλότερη απόδοση από τις πρώτες τόσο σε φαινολικά συστατικά όσο και σε ικανότητα δέσμευσης ριζών, κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι μεγαλύτερο μέρος της εκχύλισης έλαβε χώρα κατά τις πρώτες εκχυλίσεις.

Είναι πιθανό τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων να έχουν επηρεαστεί από τη θερμοκρασία διότι ενώ πραγματοποιήθηκε ακριβώς το ίδιο πείραμα δύο φορές, οι μεγάλες διαφορές στα αποτελέσματα δείχνουν ότι κάποιος παράγοντας τα επηρέασε. Σύμφωνα με τους Bernatoniene et al (2016) προτιμάται η εκχύλιση να πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες καθώς αυτές οι συνθήκες μειώνουν την κατανάλωση ενέργειας αλλά και τον κίνδυνο θερμικής καταστροφής των εκχυλιζόμενων ουσιών. Άλλος ένας παράγοντας ο οποίος πιθανώς επηρέασε την εκχύλιση στο λουτρό υπερήχων, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα είναι η θέση στην οποία τοποθετήθηκε η κάθε κωνική φιάλη, αν και δεν προέκυψε κάτι σαφές από την αλλαγή θέσεων. Σε έρευνα των Kulkarni et al (2014), έγινε μελέτη για να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το πόσο η θέση, το βάθος και η γεωμετρία της φιάλης, καθώς και το ύψος του υγρού μέσα στη φιάλη, επηρεάζουν την εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων. Για να εξαχθούν, λοιπόν, πιο σαφή αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναληφθεί το πείραμα και να ληφθούν υπόψη οι παραπάνω παράγοντες.

5.3 Απόδοση εκχυλίσεων σε συσκευή Soxhlet

Η εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet πραγματοποιήθηκε με τους ακόλουθους τρόπους: σε ένα στάδιο με αιθανόλη (EtOH) και σε δύο διαδοχικά στάδια πρώτα με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (EAc) κι έπειτα με αιθανόλη. Όλα τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τις ίδιες μεθόδους (Folin-Ciocalteu και DPPH). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στους πίνακες 5.2 και 5.3.

Πίνακας 5.2 Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu για τα εκχυλίσματα με συσκευή Soxhlet

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (g GAE/L)	gGAE/ kg ξηρού φυτού
EAc	1.48 ± 0.052	14.87
EtOH μετά από EAc	2.19 ± 0.065	21.95
EtOH	4.15 ± 0.038	41.49

Παρατηρείται ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis* εμφανίζουν υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με το εκχύλισμά του από οξικό αιθυλεστέρα. Συγκεκριμένα εδώ, τη μικρότερη απόδοση σε ολικά φαινολικά (g GAE/kg ξηρού φυτού) την παρουσίασε το εκχύλισμα το οποίο προήλθε από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, μόλις 14.87 g GAE/kg ξηρού φυτού, ενώ ακολουθεί το εκχύλισμα το οποίο προήλθε από εκχύλιση με αιθανόλη, της φυτόμαζας που είχε πρώτα εκχυλιστεί με οξικό αιθυλεστέρα. Η συγκέντρωση των ισοδυνάμων γαλλικού οξέος στο εκχύλισμα που προήλθε από απλή εκχύλιση με αιθανόλη ανήλθε σε 41.49 g GAE/kg ξηρού φυτού, η οποία και βρέθηκε παρόμοια με εκείνη που προήλθε από το άθροισμα των διαδοχικών εκχυλίσεων.

Πίνακας 5.3 Αποτελέσματα DPPH για τα εκχυλίσματα με συσκευή Soxhlet

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (g trolox/L)	gtrolox/ kg ξηρού φυτού
EAc	3.12 ± 0.125	31.23
EtOH μετά από EAc	6.22 ± 0.177	62.17
EtOH	8.13 ± 0.365	81.33

Και εδώ παρατηρείται ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis* εμφανίζουν υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με το εκχύλισμά του από οξικό αιθυλεστέρα. Από τις μετρήσεις DPPH που πραγματοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα, τη χαμηλότερη τιμή παρουσιάζει και πάλι το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα με 31.23 g trolox/kg ξηρού φυτού. Αρκετά υψηλότερη τιμή παρουσίασε το αιθανολικό εκχύλισμα μετά από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα.Η απόδοση της απλής εκχύλισης με αιθανόλη ανήλθε σε 81.33 g trolox/kg ξηρού φυτού, η οποία και βρέθηκε χαμηλότερη από το άθροισμα των διαδοχικών εκχυλίσεων.

Πέρα από τη Folin-Ciocalteu και την DPPH, πραγματοποιήθηκε μέτρηση στερεού υπολείμματος σε όλα τα εκχυλίσματα ώστε να προσδιορισθεί η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά στερεά για κάθε μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

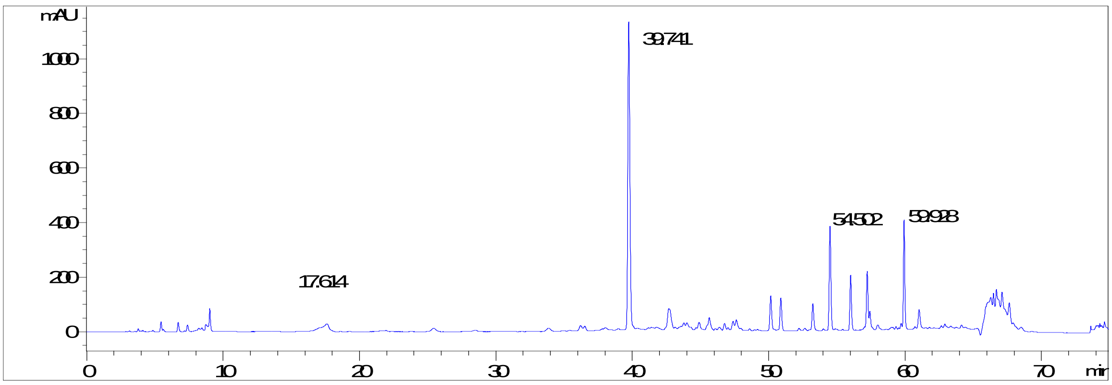
Πίνακας 5.4 Αποδόσεις του *Rosmarinus officinalis* σε εκχυλισθέντα στερεά συστατικά

Εκχύλισμα	g/kg ξηρού φυτού
EAc	134.2 ± 2.53
EtOH μετά από EAc	109.3 ± 0.28
EtOH	253 ± 14.18

Το αιθανολικό εκχύλισμα από εκχύλιση Soxhlet εμφάνισε τη μεγαλύτερη απόδοση (253 g/kg ξηρού φυτού), παραπλήσια όμως με το άθροισμα των δύο διαδοχικών εκχυλίσεων. Είναι γεγονός πως τα κλάσματα που λαμβάνονται με διαλύτη πολύ μεγαλύτερης πολικότητας τείνουν να έχουν καλύτερες αποδόσεις επί ξηρής βάσης (Μπράβου, 2015). Μικρότερες αποδόσεις εμφάνισαν τα εκχυλίσματα, στων οποίων την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας.

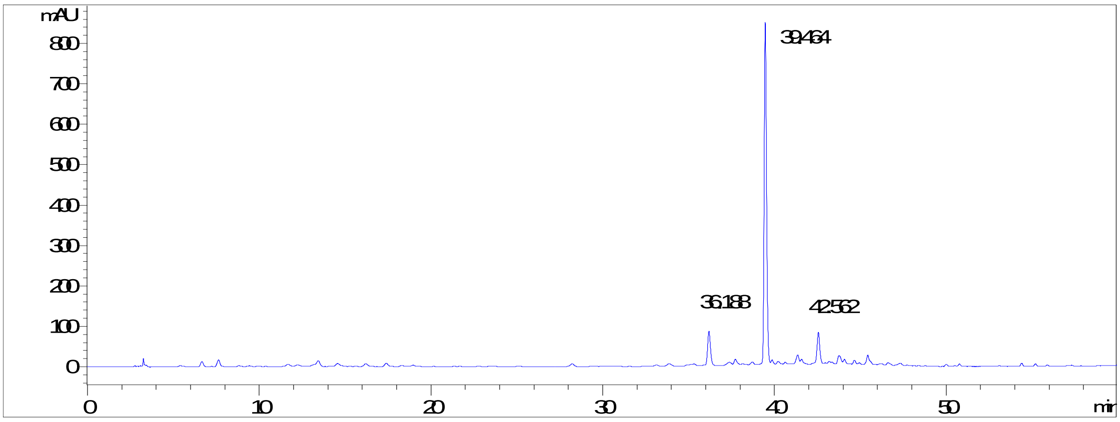
5.4 Ανάλυση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο HPLC

Τα εκχυλίσματα του *Rosmarinus officinalis* αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και συγκεκριμένα με τη μέθοδο βαθμωτής έκλουσης που πρότειναν οι Mercken&Beecher (2000) για το διαχωρισμό φλαβονοειδών αγλυκονών. Το σύστημα διαλυτών αποτελείτο από νερό (διαλύτης Α), μεθανόλη (διαλύτης Β) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης Γ). Ως βασικά μήκη κύματος για την ανίχνευση των συστατικών επιλέχθηκαν τα 280 και 360nm που ανταποκρίνονται σε χαρακτηριστικά σημεία των ζωνών απορρόφησης των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα για μήκος κύματος 280 nm. Η ταυτοποίηση των ουσιών βασίσθηκε στους χρόνους έκλουσης και στο φάσμα των ουσιών σε σύγκριση με πρότυπες ενώσεις ή βιβλιογραφικά δεδομένα που διαθέτει το Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων.



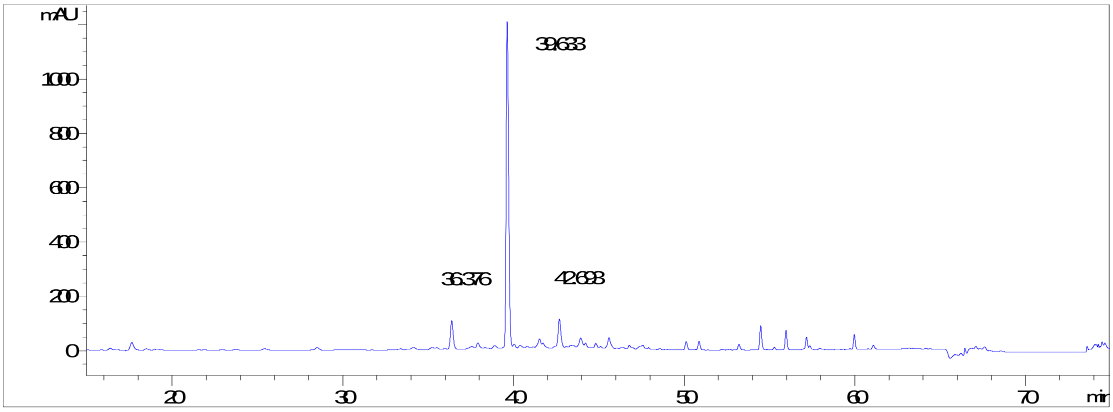
Διάγραμμα 5.12 Χρωματογράφημα που λήφθηκε κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα από Soxhlet στα 280 nm

Από τη μελέτη του χρωματογραφήματος του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (διάγραμμα 5.12) παρατηρήθηκε ότι στα 17 min εμφανίστηκε κορυφή που ταυτοποιήθηκε ως καφεϊκό οξύ, ενώ στα 39 min εμφανίστηκε κορυφή που αντιστοιχεί στο ροσμαρινικό οξύ. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι το δενδρολίβανο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ. Οι δευτερεύουσες κορυφές των οποίων ο χρόνος έχει σημειωθεί αντιστοιχούν, με βάση τα φάσματά τους, η μία σε κάποιο φλαβονοειδές και η άλλη σε φαινολικό διτερπένιο, πιθανότατα το καρνοσικό οξύ. Έπειτα από ποσοτικοποίηση με καμπύλες αναφοράς ροσμαρινικού οξέος και κερκετίνης βρέθηκε η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος (0.41g/L ή 4g/kg ξηρής φυτόμαζας) και η συγκέντρωση φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης (0.26g/L ή 2.58g/kg ξηρής φυτόμαζας).



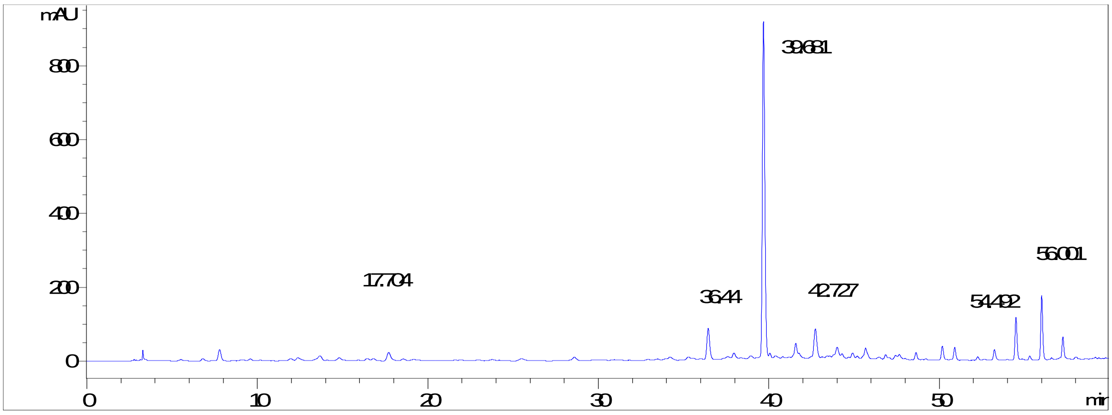
Διάγραμμα 5.13 Χρωματογράφημα που λήφθηκε από την ανάλυση του αιθανολικού εκχυλίσματος το οποίο παραλαμβάνεται μετά την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα σε Soxhlet

Το χρωματογράφημα του αιθανολικού εκχυλίσματοςαπό τις διαδοχικές εκχυλίσεις (διάγραμμα 5.13) παρουσίασε διαφορές σε σχέση με αυτό του οξικού αιθυλεστέρα. Παρατηρείται ότι ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας έδειξε να έχει παραλάβει και άλλα φλαβονοειδή, όπως υποδήλωναν οι κορυφές του χρωματογραφήματος, εντούτοις η αιθανόλη δεν έδειξε να παραλαμβάνει τις ίδιες ουσίες. Η μόνη κοινή κορυφή βρίσκεται στα 39 min και είναι το ροσμαρινικό οξύ. Η αιθανόλη φαίνεται ότι παρέλαβε δύο φλαβονοειδή (με βάση τα φάσματά τους) στα 36 και 42 min τα οποία δεν παρέλαβε ο οξικός αιθυλεστέρας. Μετά από ποσοτικοποίηση βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις ροσμαρινικού (1.08 g/L ή 10.72g/kg ξηρής φυτόμαζας) και φλαβονοειδών σε ισοδύναμα κερκετίνης (0.60 g/L ή 5.96 g/kg ξηρής φυτόμαζας).



Διάγραμμα 5.14 Χρωματογράφημα που λήφθηκε από την ανάλυση του αιθανολικού εκχυλίσματος από μονή εκχύλιση Soxhlet στα 280 nm

Στο διάγραμμα 5.14 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε με απευθείας εκχύλιση Soxhlet με αιθανόλη. Το γράφημα παρουσιάζει ομοιότητες με το προηγούμενο αιθανολικό, με βασική διαφορά την ύπαρξη κορυφών μεταξύ 50 και 60 min, οι οποίες παρατηρήθηκαν και στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Βέβαια για να υπάρξει ακρίβεια, χρειάζεται ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης και φυσικά αναγνώριση των ουσιών. Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλες αναφοράς ροσμαρινικού οξέος και κερκετίνης και οι συγκεντρώσεις βρέθηκαν 1.64 g/L και 0.84 g/L αντίστοιχα (ή 16.4 g/kg ξηρής φυτόμαζας και 8.36 g/kg ξηρής φυτόμαζας αντίστοιχα, σε αποδόσεις).



Διάγραμμα 5.15 Χρωματογράφημα που λήφθηκε από την ανάλυση του μη αποχρωματισμένου, συμπυκνωμένου αιθανολικού εκχυλίσματος από λουτρό υπερήχων στα 280 nm

Το χρωματογράφημα του αιθανολικού εκχυλίσματος από λουτρό υπερήχων (διάγραμμα 5.15) φαίνεται να μην παρουσιάζει και πάλι διαφορές από το αιθανολικό από Soxhlet, όμως φαίνεται ότι με τη διεργασία της Soxhlet έγινε παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας ροσμαρινικού οξέος αφού η απορρόφηση στο διάγραμμα 5.14 είναι αρκετά υψηλότερη από αυτή στο διάγραμμα 5.15. Αυτό θα μπορούσε να είναι ενδεικτικό του γεγονότος ότι η ανάκτηση από εκχύλιση Soxhlet έχει μεγαλύτερη απόδοση από αυτή του λουτρού υπερήχων. Η συγκέντρωση σε ροσμαρινικό οξύ προέκυψε 1.20 g/L (ή 5 g/kg ξηρής φυτόμαζας) ενώ η συγκέντρωση σε ισοδύναμα κερκετίνης 0.96 g/L (ή 3.84 g/kg ξηρής φυτόμαζας). Οι Bernatoniene et al (2016) ανέφεραν ότι με αύξηση θερμοκρασίας είχαν καλύτερη ανάκτηση ροσμαρινικού οξέος σε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με αιθανόλη ως διαλύτη. Μάλιστα στους 60ºC η ανάκτηση ήταν διπλάσια από αυτήν στους 30ºC. Η απόδοση της εκχύλισης σε λουτρό υπερήχων με αιθανόλη 90% στους 30ºC για το ροσμαρινικό οξύ ήταν παραπλήσια (4 g/kg ξηρής φυτόμαζας) με αυτή που προέκυψε από το παραπάνω χρωματογράφημα.

5.5 Παρασκευή εκχυλίσματος για χρήση ως φυσικό αντιοξειδωτικό

Το εκχύλισμα που επιλέχθηκε για χρήση ως φυσικό αντιοξειδωτικό σε εδώδιμα επικαλυπτικά ήταν το αιθανολικό εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά από παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 60 min καθώς οι αποδόσεις που παρουσίασε ήταν σε γενικές γραμμές υψηλότερες από τις αποδόσεις των κωνικών φιαλών που παρέμειναν στο λουτρό υπερήχων για 30 min. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές εκχυλίσεις ώστε να παραχθεί η απαραίτητη ποσότητα που θα χρειαζόταν για τα επόμενα πειράματα. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε από 1800 mL στα 500 mL και αποχρωματίστηκε και οι περιεκτικότητες σε φαινολικά συστατικά και ισοδύναμα trolox τόσο του αρχικού όσο και του αποχρωματισμένου παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5. Είναι προφανές ότι παρά τον αποχρωματισμό το εκχύλισμα συνέχισε να παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά και σε ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Το χρωματογράφημα του αποχρωματισμένου αιθανολικού εκχυλίσματος από υπερήχους είχε την ίδια μορφή με αυτή του μη αποχρωματισμένου.

Πίνακας 5.5 Αποτελέσματα Folin-Ciocalteu, DPPH και στερεό υπόλειμμα για το μη αποχρωματισμένο και το αποχρωματισμένο αιθανολικό εκχύλισμα από υπέρηχους

Εκχύλισμα	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (g GAE/L)	gGAE/ kg ξηρού φυτού	Συγκέντρωση εκχυλίσματος (g trolox/L)	gtrolox/ kg ξηρού φυτού
EtOH	3.79	15.73	7.49 ± 0.31	31.24
αποχρωματισμένο EtOH	3.41 ± 0.2	14.21	6.12 ± 0.25	25.51

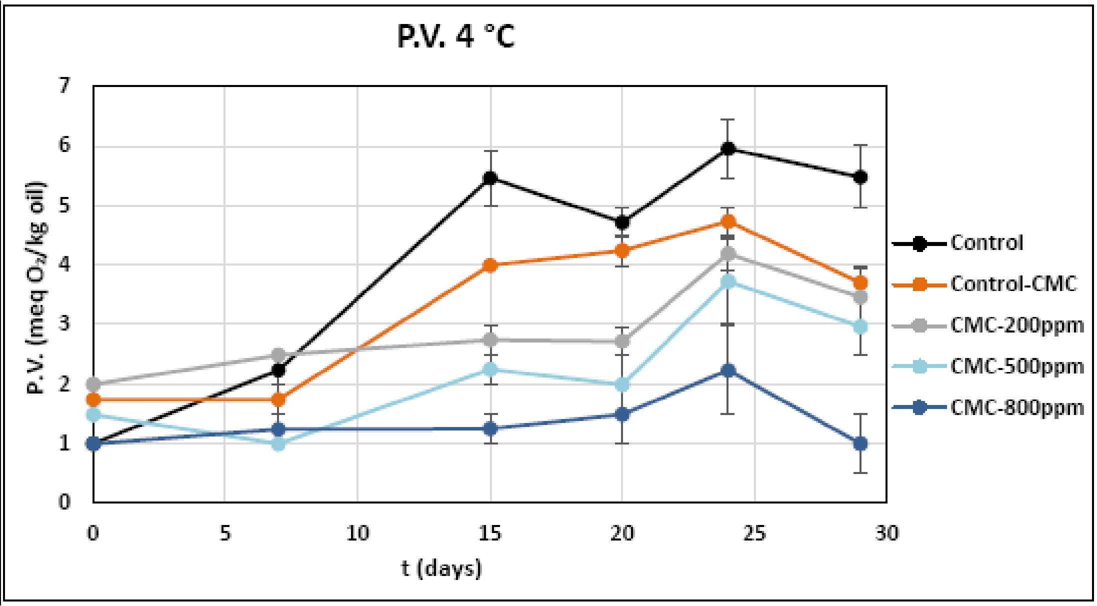
Επί πλέον η σύγκριση των τιμών του Πίνακα 5.5 με τις τιμές των αιθανολικών εκχυλισμάτων των Πινάκων 5.2 και 5.3 δείχνουν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα από τους υπέρηχους αναμένεται να έχει συνολικά μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το αιθανολικό εκχύλισμα από εκχύλιση Soxhlet αφού τόσο η περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά όσο και η συγκέντρωση σε mg trolox/L εκχυλίσματος είναι αρκετά μικρότερη από αυτή του εκχυλίσματος από Soxhlet. Το αποχρωματισμένο εκχύλισμα, φαίνεται να παρουσιάζει μία μείωση σε σχέση με το αρχικό των υπερήχων, στα 3.41 g GAE/L εκχυλίσματος.

Το λουτρό υπερήχων όμως είναι ένας φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος εκχύλισης, ο οποίος δεν χρησιμοποιεί υψηλές θερμοκρασίες και χρειάζεται πολύ λιγότερο χρόνο από μία εξαντλητική εκχύλιση Soxhlet. Επιλέχθηκε, λοιπόν το εκχύλισμα από υπερήχους για εφαρμογή στο πείραμα. Η απόδοση σε στερεά εκχυλίσιμα συστατικά του συμπυκνωμένου, μη αποχρωματισμένου αιθανολικού εκχυλίσματος που παράχθηκε με υπέρηχους ανήλθε σε 128 ± 3.06 g εκχυλίσιμων συστατικών/kg ξηρού φυτού.

5.6 Αντιοξειδωτική δράση εκχυλίσματος δενδρολίβανου κατά την προσθήκη του σε επικαλυπτικό CMC για την επικάλυψη ιχθυρών

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών, συγκεκριμένα αιθανολικού εκχυλίσματος και αιθέριου ελαίου του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis* της οικογένειας *Lamiaceae*, στον εμπλουτισμό εδώδιμων μεμβρανών, έναντι της οξείδωσης καπνισμένων ιχθυρών. Στα ιχθυρά μετρήθηκαν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης μέσω του αριθμού υπεροξειδίων και των συζυγών διενίων και τριενίων, ενώ τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης μετρήθηκαν μέσω του αριθμού π-ανισιδίνης.

Αρχικά, μελετήθηκε η ανάπτυξη του αριθμού υπεροξειδίων των μη επεξεργασμένων ιχθυρών, ιχθυρών που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC αλλά και με εμπλουτισμένες μεμβράνες CMC με διαφορετικές συγκεντρώσεις φυσικού αντιοξειδωτικού κατά την αποθήκευσή τους στους 4^{o}C για 29 ημέρες. Εκτός από τα δείγματα με αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου, εξετάστηκαν δείγματα που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου αλλά και δείγματα με αιθέριο έλαιο και αιθανολικό εκχύλισμα του *Rosmarinus officinalis*. Η πορεία ανάπτυξης των υπεροξειδίων των ιχθυρών παρουσιάζεται στα διαγράμματα 5.16 και 5.17.

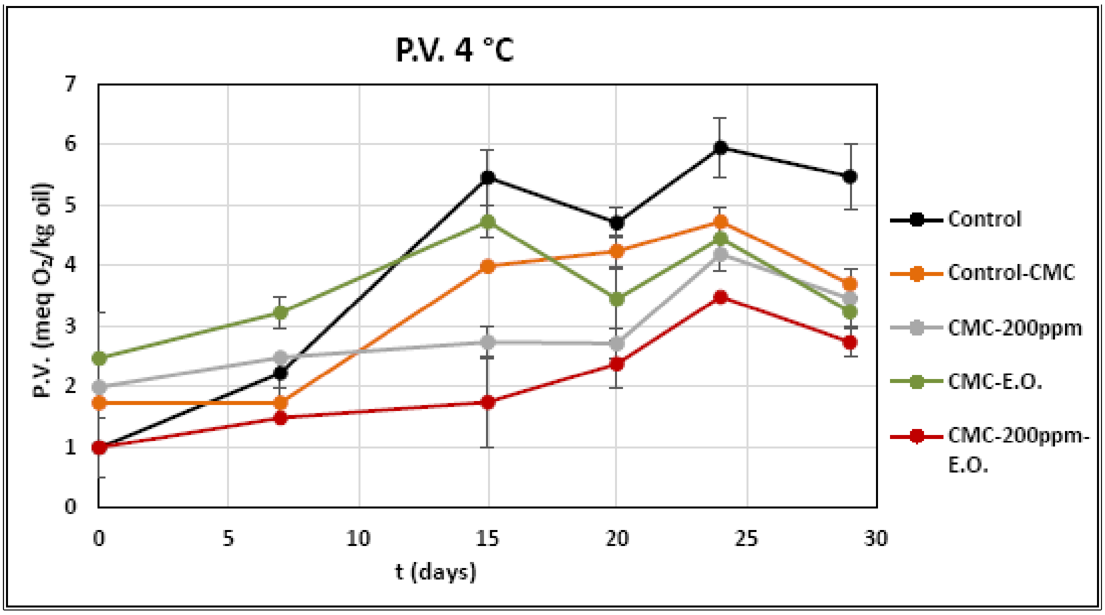


Διάγραμμα 5.16 Ανάπτυξη του αριθμού υπεροξειδίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με απλές μεμβράνες CMC (Control-CMC) και CMC που έχουν εμπλουτιστεί με αιθανολικό εκχύλισμα του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (200, 500 και 800 ppm), κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 5.16, ακόμη και τα δείγματα με την μη εμπλουτισμένη με αντιοξειδωτικό μεμβράνη CMC, παρουσίασαν μικρότερους αριθμούς υπεροξειδίων, σε σύγκριση με τη μη χρήση επικαλυπτικού (δείγματα Control).

Παρ' όλα αυτά η ενσωμάτωση αιθανολικού εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού σε αύξουσες συγκεντρώσεις στην εδώδιμη μεμβράνη CMC έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ότι αφορά την οξείδωση των ιχθυρών, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα. Φαίνεται πως τα φιλέτα που επικαλύφθηκαν με τις τρεις εμπλουτισμένες μεμβράνες είχαν χαμηλότερες τιμές υπεροξειδίων σε σχέση με τα δείγματα Control αλλά και Control-CMC καθ' όλη τη διάρκεια μελέτης της οξείδωσης. Μάλιστα, παρατηρείται ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού στην εδώδιμη μεμβράνη CMC, τόσο μικρότεροι είναι και οι αριθμοί υπεροξειδίων που μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια και των 6 δειγματοληψιών. Συγκεκριμένα, και οι τρεις σειρές δειγμάτων εμπλουτισμένες με αιθανολικό εκχύλισμα, παρουσίαζαν σχεδόν σταθερό αριθμό υπεροξειδίων μέχρι την εικοστή ημέρα, στη συνέχεια στις 24 ημέρες παρουσίασαν οι τιμές μία μικρή αύξηση, ενώ στις 29 ημέρες ο αριθμός υπεροξειδίων φαίνεται να μειώνεται σε όλα τα δείγματα, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι πιθανώς έχουν αρχίσει να σχηματίζονται δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης. Συνολικά, από το διάγραμμα 5.16 γίνεται προφανές ότι την καλύτερη προστασία στην οξείδωση παρέχουν οι εδώδιμες μεμβράνες CMC με συγκεντρώσεις 500 και 800 ppm εκχυλίσματος δενδρολίβανου.

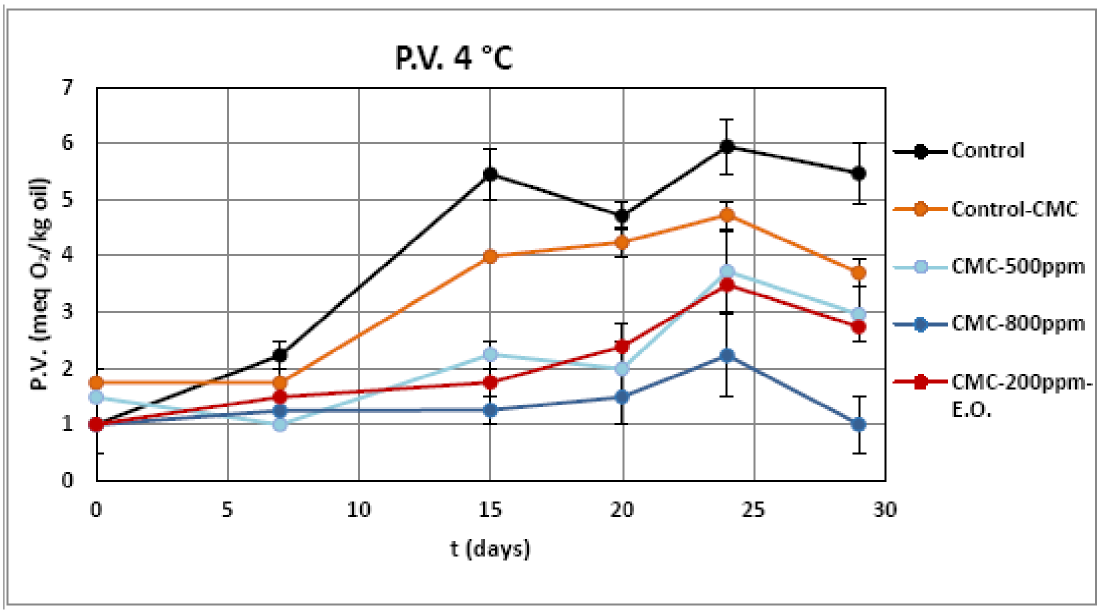
Η πορεία συσσώρευσης υπεροξειδίων των ιχθυρών που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο 2000 ppm (CMC-E.O.) και με συνδυασμό αιθέριου ελαίου σε ποσοστό 2000 ppm και αιθανολικού εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 200 ppm παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.17.



Διάγραμμα 5.17 Ανάπτυξη του αριθμού υπεροξειδίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-200ppm), με αιθέριο έλαιο (CMC-E.O.) και συνδυασμό των κλασμάτων (CMC-200ppm-E.O.) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Στο διάγραμμα 5.17 παρουσιάζεται και πάλι η πορεία των δειγμάτων Control, Control-CMC και CMC-200ppm για λόγους σύγκρισης. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, τα δείγματα ιχθυρών που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο έδειξαν αποτελέσματα τα οποία δεν διέφεραν σημαντικά από εκείνα των Control-CMC, αν και στις πρώτες μέρες αποθήκευση φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερους αριθμούς υπεροξειδίων από τα δείγματα Control-CMC. Τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη που είχε εμπλουτιστεί και με αιθανολικό εκχύλισμα και με αιθέριο έλαιο έδειξαν στην προκειμένη περίπτωση τα καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις μεμβράνες που περιείχαν μεμονωμένα τα 200 ppm εκχύλισμα και το αιθέριο έλαιο.

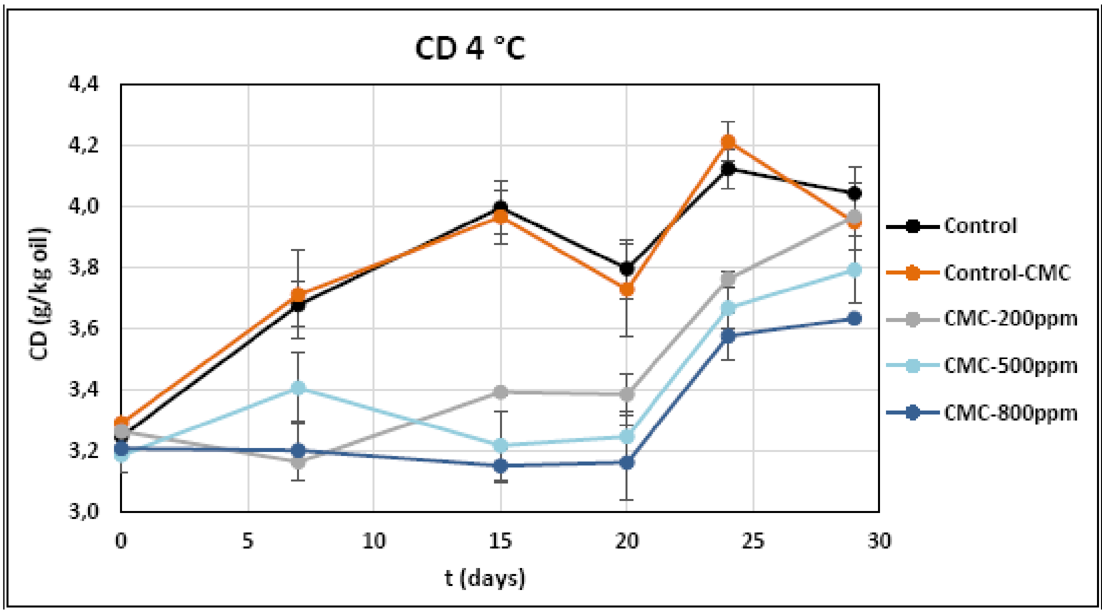
Ένα πιο συνολικό συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί από το διάγραμμα 5.18 στο οποίο εμπεριέχονται οι τιμές υπεροξειδίων των δειγμάτων που παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα, σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες σειρές δειγμάτων. Στο διάγραμμα επίσης παρατίθενται και πάλι οι τιμές υπεροξειδίων των δειγμάτων Control και Control-CMC για πιο ολοκληρωμένη σύγκριση.



Διάγραμμα 5.18 Ανάπτυξη του αριθμού υπεροξειδίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-500ppm και CMC-800ppm), και συνδυασμό των κλασμάτων (CMC-200ppm-E.O.) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4ºC

Στο διάγραμμα 5.18, φαίνεται ότι από τις τρεις σειρές δειγμάτων που εμφάνισαν τον χαμηλότερο αριθμό υπεροξειδίων κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 500 ppm και τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με συνδυασμό αιθανολικού εκχυλίσματος και αιθέριου ελαίου, έδειξαν αρκετά κοντινές τιμές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 800 ppm είχαν τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

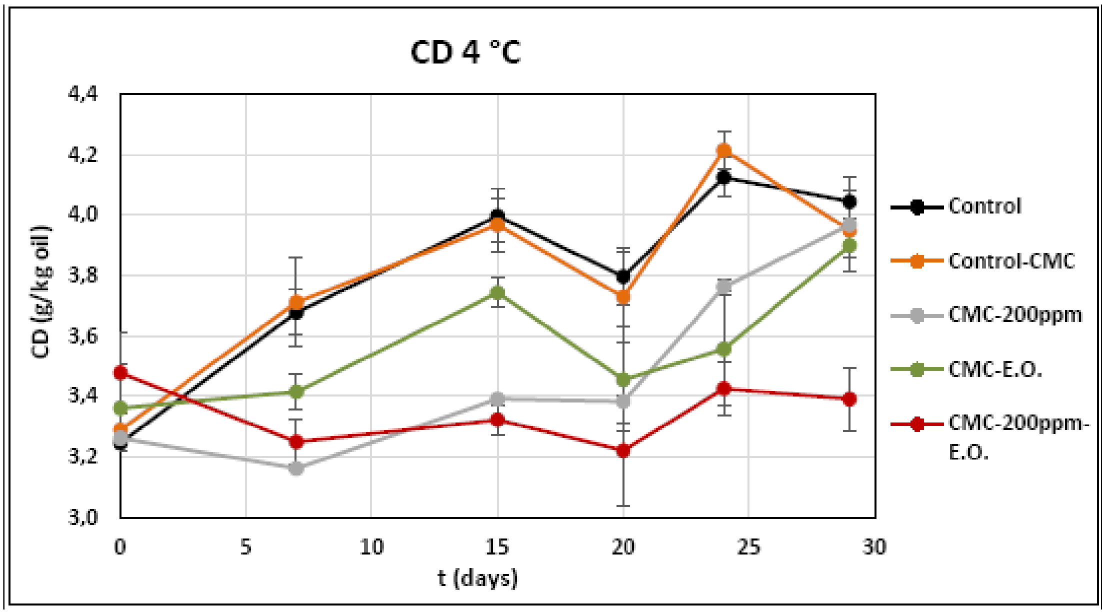
Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η ανάπτυξη συζυγών διενίων στα μη επεξεργασμένα ιχθυρά, στα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC αλλά και με εμπλουτισμένες μεμβράνες CMC με διαφορετικές συγκεντρώσεις φυσικού αντιοξειδωτικού κατά την αποθήκευσή τους στους 4ºC για 29 ημέρες. Εξετάστηκαν επίσης δείγματα που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου αλλά και δείγματα με αιθέριο έλαιο και αιθανολικό εκχύλισμα του *Rosmarinus officinalis*. Στα διαγράμματα 5.19 και 5.20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλυτικά.



Διάγραμμα 5.19 Ανάπτυξη συζυγών διενίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με απλές μεμβράνες CMC και CMC που έχουν εμπλουτιστεί με αιθανολικό εκχύλισμα του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (200, 500 και 800 ppm), κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι η παραγωγή συζυγών διενίων ήταν περίπου η ίδια για τα δείγματα Control και τα επικαλυμμένα δείγματα Control-CMC. Μία ελαφρώς καλύτερη εικόνα σε σύγκριση με τον αριθμό υπεροξειδίων παρουσιάζουν τα δείγματα με την μικρότερη συγκέντρωση αιθανολικού εκχυλίσματος στις εδώδιμες μεμβράνες CMC, ενώ και πάλι τα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή τις χαμηλότερες τιμές σε συζυγή διένια έδωσαν τα δείγματα ιχθυρών που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με εκχύλισμα του *Rosmarinus officinalis* σε συγκέντρωση 800 ppm. Η περιεκτικότητα σε συζυγή διένια είναι σταθερή για τις 20 πρώτες μέρες αποθήκευσης, σε συμφωνία με τον αριθμό υπεροξειδίων, ενώ παρουσιάζει συνεχή αύξηση στη συνέχεια.

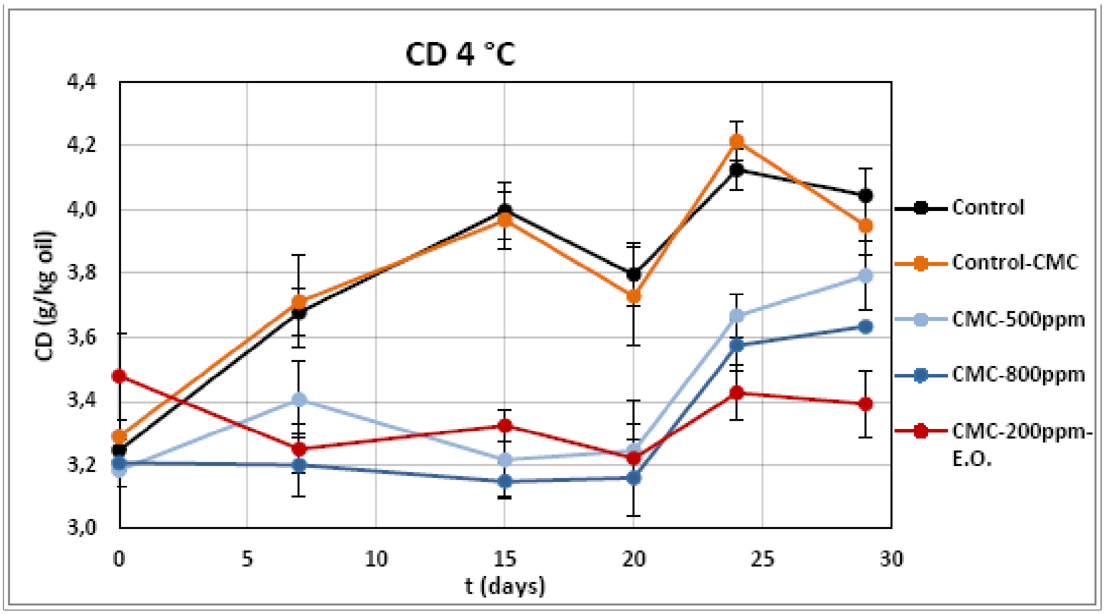
.



Διάγραμμα 5.20 Ανάπτυξη του αριθμού υπεροξειδίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-200ppm), με αιθέριο έλαιο (CMC-E.O.) και συνδυασμό των κλασμάτων (CMC-200ppm-E.O.) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Στο διάγραμμα 5.20 παρατίθενται οι τιμές των συζυγών διενίων για τις σειρές δειγμάτων που είχαν επικαλυφθεί με CMC εμπλουτισμένο με αιθέριο έλαιο και με συνδυασμό αιθέριου ελαίου και αιθανολικού εκχυλίσματος. Και στην περίπτωση των συζυγών διενίων, η προσθήκη του αιθέριου ελαίου φαίνεται να προστάτευσε λιγότερο τα ιχθυρά σε σύγκριση με τα δείγματα CMC-200 ppm και CMC-200 ppm-E.O. Με τις πειραματικές μετρήσεις για τα συζυγή διένια επιβεβαιώνεται ότι και πάλι τα επικαλυμμένα ιχθυρά με συνδυασμό αιθέριου ελαίου και αιθανολικού εκχυλίσματος είναι αρκετά ικανοποιητικά, δηλαδή η επικάλυψη παρείχε προστασία στα φιλέτα ιχθυρών.

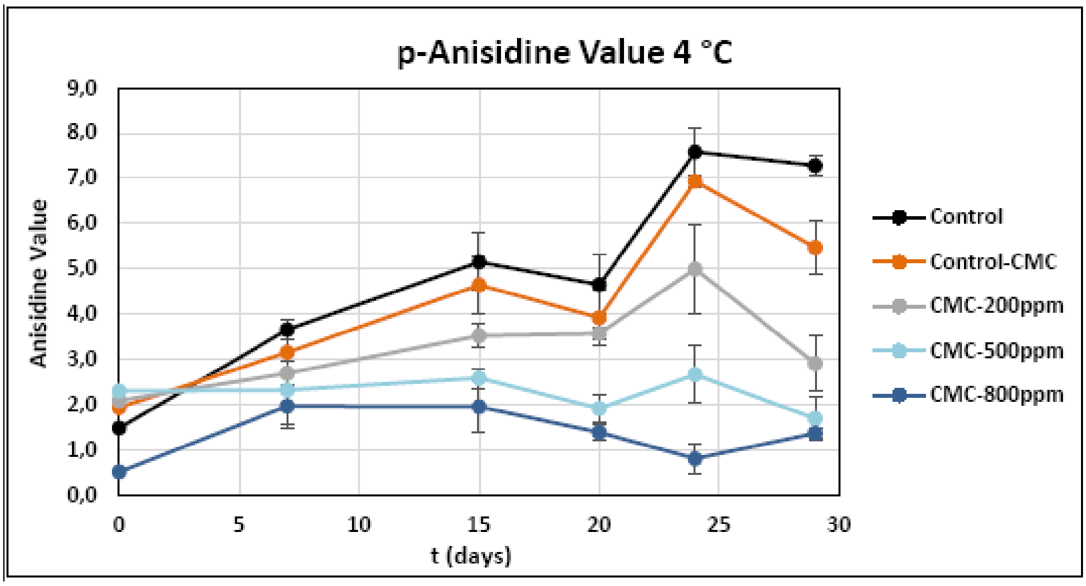
Μία πιο συνολική εικόνα παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.21 στο οποίο εμπεριέχονται οι τιμές συζυγών διενίων των δειγμάτων που παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα, σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες σειρές δειγμάτων. Στο διάγραμμα επίσης παρατίθενται και πάλι οι τιμές συζυγών διενίων των δειγμάτων Control και Control-CMC για πιο ολοκληρωμένη σύγκριση.



Διάγραμμα 5.21 Ανάπτυξη συζυγών διενίων των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-500ppm και CMC-800ppm), και συνδυασμό των κλασμάτων (CMC-200ppm-E.O.) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Στο διάγραμμα 5.21, φαίνεται ότι από τις τρεις σειρές δειγμάτων που εμφάνισαν τις μικρότερες συγκεντρώσεις συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 500 και 800 ppm και τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με συνδυασμό αιθανολικού εκχυλίσματος και αιθέριου ελαίου, έδειξαν κοντινά αποτελέσματα κατά τις 20 πρώτες μέρες του πειράματος. Στο διάστημα των 20-28 ημερών, τα δείγματα CMC-500ppm και CMC-800ppm δείχνουν μία αύξηση στα συζυγή διένια, πιο απότομη από την αύξηση που παρατηρείται στα δείγματα CMC-200ppm-E.O.

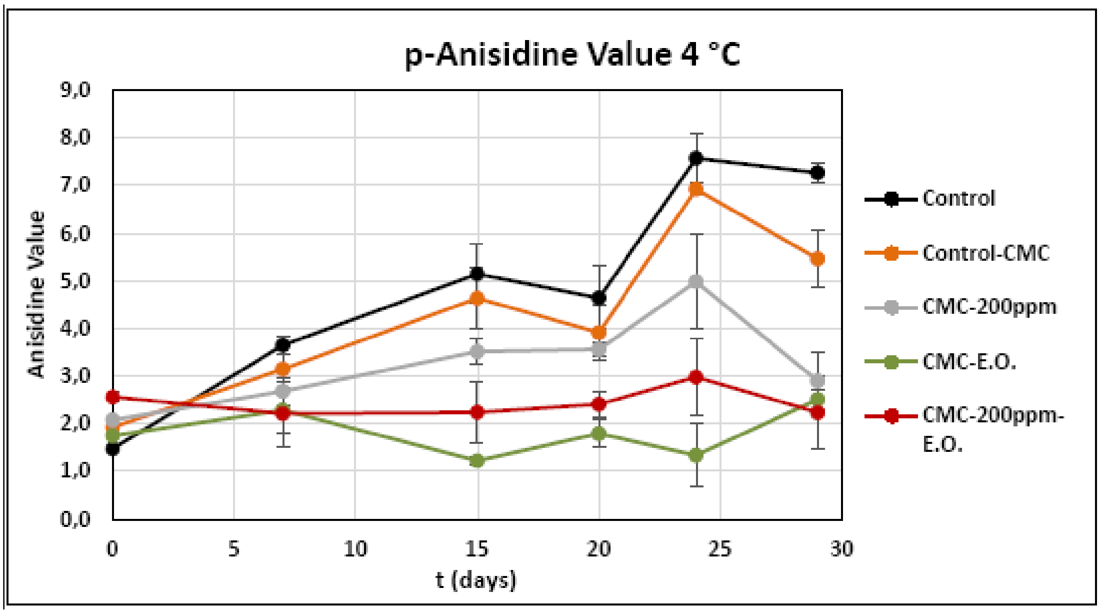
Η τιμή της π-ανισιδίνης όπως καταγράφηκε για την κάθε σειρά ιχθυρών που επικαλύφθηκε με εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC κατά το χρονικό διάστημα των 29 ημερών αποθήκευσής τους, σε σύγκριση με τα μη επικαλυμμένα ιχθυρά και τα ιχθυρά με μη εμπλουτισμένη επικάλυψη CMC, παρουσιάζεται στα διαγράμματα 5.22 και 5.23. Στο διάγραμμα 5.22 παρατίθενται οι τιμές για τα δείγματα με επικάλυψη εμπλουτισμένη με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανολικού εκχυλίσματος, ενώ στο διάγραμμα 5.23 γίνεται σύγκριση των δειγμάτων με επικάλυψη εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο.



Διάγραμμα 5.22 Ανάπτυξη p-AV των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-200ppm, CMC-500ppm και CMC-800ppm) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

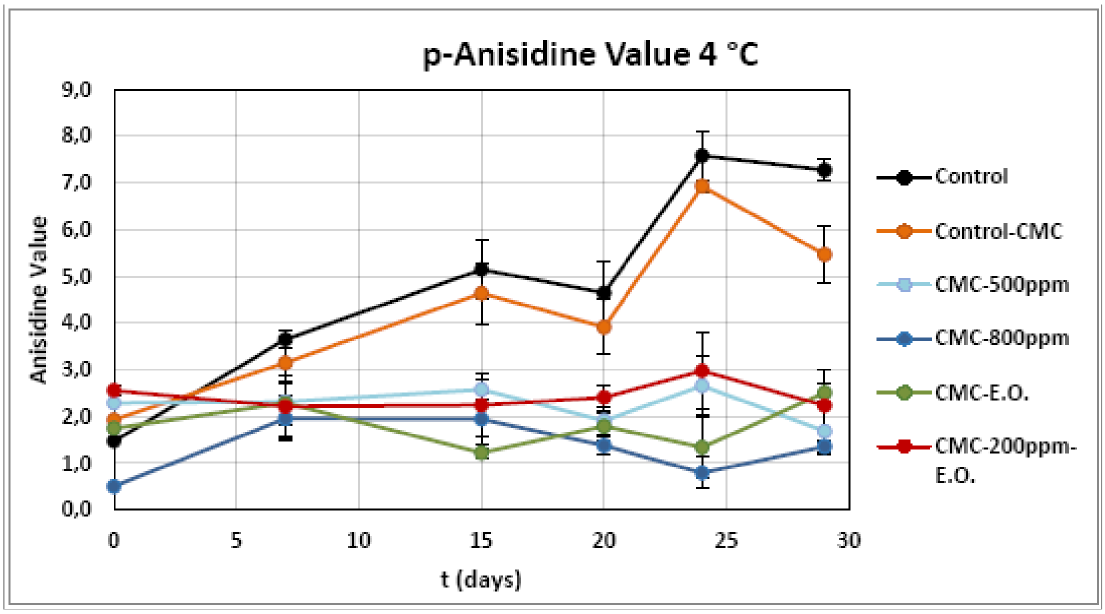
Τη μεγαλύτερη ποσότητα σε δευτερογενή προϊόντα την παρουσίασαν τα μη επικαλυμμένα δείγματα, όπως και είναι λογικό, ενώ αμέσως μετά ακολουθούν τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC και στη συνέχεια τα επικαλυπτόμενα με εμπλουτισμένη εδώδιμη μεμβράνη με συγκέντρωση 200 ppm. Και πάλι την καλύτερη προστασία παρείχαν οι εμπλουτισμένες μεμβράνες με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αιθανολικού εκχυλίσματος δενδρολίβανου, δηλαδή 500 ppm και 800 ppm. Όπως φάνηκε από όλες τις σειρές ελέγχων (αριθμό υπεροξειδίων, συζυγή διένια και αριθμό π-ανισιδίνης), η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στα εδώδιμα επικαλυπτικά CMC, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα προστασίας του τροφίμου. Επιβεβαιώνεται μάλιστα, ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, τόσο αυξάνεται και η προστασία στην οξείδωση.

Στο διάγραμμα 5.23 παρατίθενται οι τιμές του αριθμού π-ανισιδίνης των άλλων δύο σειρών δειγμάτων που επικαλύφθηκαν με μεμβράνες εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο και συνδυασμό αιθέριου ελαίου και αιθανολικού εκχυλίσματος και συγκρίνονται με τα μη επικαλυπτόμενα δείγματα καθώς και με αυτά που επικαλύφθηκαν με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC αλλά και με εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC με 200 ppm εκχυλίσματος. Σε αυτή την περίπτωση, φαίνεται τα λιγότερα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης να τα παρουσίασαν τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη εμπλουτισμένη με σκέτο αιθέριο έλαιο, ενώ ακολουθούν, με αρκετά καλή απόδοση τα δείγματα με μεμβράνη εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο και αιθανολικό εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis*.



Διάγραμμα 5.23 Ανάπτυξη p-AV των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-200ppm, CMC-500ppm και CMC-800ppm) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C

Στο διάγραμμα 5.24 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές π-ανισιδίνης των σειρών που έδειξαν τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, δηλαδή τα επικαλυπτόμενα δείγματα με εμπλουτισμένη με εκχύλισμα μεμβράνη σε συγκεντρώσεις 500 και 800 ppm, καθώς και τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο και συνδυασμό αιθέριου ελαίου και εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 200 ppm.



Διάγραμμα 5.24 Ανάπτυξη p-AV των μη επικαλυμμένων ιχθυρών (Control), των επικαλυμμένων ιχθυρών με μη εμπλουτισμένη μεμβράνη CMC, καθώς και των επικαλυμμένων ιχθυρών με εδώδιμες μεμβράνες που εμπλουτίστηκαν με αιθανολικό εκχύλισμα (CMC-500ppm και CMC-

800ppm), αιθέριο έλαιο (CMC-E.O.) και συνδυασμό των κλασμάτων (CMC-200ppm-E.O.) του αρωματικού φυτού *Rosmarinus officinalis*, κατά την αποθήκευσή τους στους 4ºC

Και οι τέσσερις σειρές δειγμάτων που παρουσιάζονται στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται να προστάτευσαν τα ιχθυρά από την ανάπτυξη δευτερογενών προϊόντων, τουλάχιστον για το διάστημα των 29 ημερών που πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Μάλιστα οι τιμές του αριθμού π-ανισιδίνης φαίνεται να κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0.5 - 3.0 σε όλο αυτό το διάστημα σε αντίθεση με τα δείγματα Control και Control-CMC που οι τιμές τους, ειδικά στις τελευταίες δειγματοληψίες πλησιάζουν το 8.

Γενικά, το E.O. μόνο του, το CMC-200ppm και το control-CMC δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, όπως προκύπτει από την Anova, γεγονός που σημαίνει ότι το αιθέριο έλαιο και η συγκέντρωση των 200 ppm δεν προσφέρουν σημαντική αντιοξειδωτική προστασία. Αντίθετα, ο συνδυασμός αιθέριου ελαίου και εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 200 ppm παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία, δηλαδή είναι πιθανόν να έχουν συνεργιστική δράση.

Εκτός από τα πειράματα αποθήκευσης επικαλυμμένων και μη ιχθυρών στους 4ºC έγινε προσπάθεια μελέτης της πορείας οξείδωσης δειγμάτων χελιού στους 10ºC με σκοπό να επιταχυνθεί η οξείδωση. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με την ίδια διαδικασία όπως και των 4ºC που παρουσιάστηκαν παραπάνω και οι δειγματοληψίες έγιναν στα ίδια χρονικά διαστήματα που πραγματοποιήθηκαν και για τα δείγματα των 4ºC. Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 10ºC μετά την εικοστή ημέρα είχαν αλλοιωθεί μικροβιολογικά σε μεγάλο βαθμό οπότε απορρίφθηκαν χωρίς να συνεχιστεί το πείραμα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τιμές των υπεροξειδίων και των συζυγών διενίων την εικοστή ημέρα δειγματοληψίας.

Πίνακας 5.6 Πορεία οξείδωσης δειγμάτων ιχθυρού που αποθηκεύτηκαν στους 10ºC

Δείγμα	Μέθοδος υπολογισμού οξείδωσης	
	P.V.	CD
Control	2.479	3.897
Control-CMC	1.694	2.827
CMC-200 ppm	0.474	2.837
CMC-500 ppm	1.509	3.808
CMC-800 ppm	1.066	3.769
CMC- E.O.	1.983	3.178
CMC-E.O.-200 ppm	2.795	4.241

Από τις ενδεικτικές αυτές τιμές δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη εμπλουτισμένη με συνδυασμό αιθέριου ελαίου και εκχυλίσματος οξειδώθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό από τα μη επικαλυμμένα δείγματα ενώ τα επικαλυμμένα δείγματα με εμπλουτισμένη μεμβράνη με συγκέντρωση εκχυλίσματος 200 ppm προστάτευσαν καλύτερα τα δείγματα από τις μεμβράνες που είχαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος. Γενικά η θερμοκρασία των 10°C κρίθηκε ακατάλληλη για μελέτη της πορείας οξείδωσης του ιχθυρού καθώς η μικροβιολογική αλλοίωση ξεκίνησε νωρίς πριν προλάβει ουσιαστικά να οξειδωθεί το χέλι.

5.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για να μπορέσει να εξαχθεί ένα συνολικό συμπέρασμα, ήταν απαραίτητο να γίνει στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις που έγιναν στα φιλέτα ιχθυρών. Οι μέθοδοι που επιλέχθηκαν ήταν η Anova και το τεστ πολλαπλής κατεύθυνσης Duncan.

Το Duncan τεστ πραγματοποιήθηκε για όλους τους χρόνους δειγματοληψίας, απ' όπου και επιβεβαιώθηκε ότι οι τιμές ων δειγμάτων δεν είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους μέχρι την εικοστή ημέρα όπου έγινε δειγματοληψία. Οι σημαντικές διαφορές φάνηκαν για όλες τις μεθόδους κατά την εικοστή τέταρτη και την εικοστή ένατη ημέρα και τα αποτελέσματα του Duncan τεστ παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

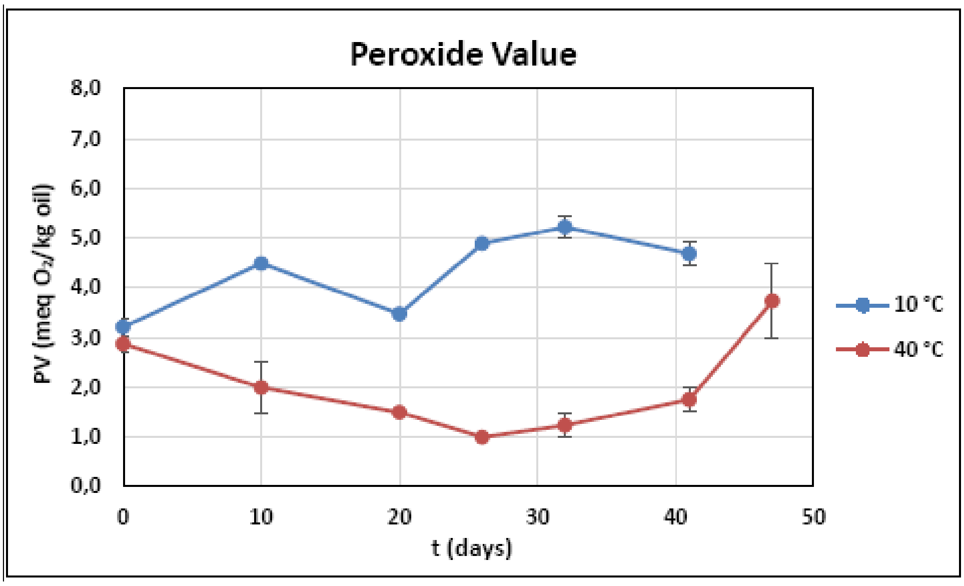
Πίνακας 5.7 Αποτελέσματα του Duncan τεστ για τις διάφορες μεθόδους υπολογισμού πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όλων των δειγμάτων

Δείγμα	Μέθοδος υπολογισμού οξείδωσης		
	P.V.	CD	p-AV
Control	5.953^{a}	4.044^{a}	7.578^{a}
Control-CMC	4.731^{ab}	3.950^{ab}	6.928^{ab}
CMC-200 ppm	4.189^{b}	3.968^{a}	4.990^{bc}
CMC-500 ppm	3.724^{bc}	3.793^{ab}	2.660^{d}
CMC-800 ppm	2.226^{c}	3.634^{bc}	0.796^{d}
CMC- E.O.	4.453^{ab}	3.900^{ab}	1.341^{d}
CMC-E.O.-200 ppm	3.487^{bc}	3.392^{c}	2.980^{cd}

Όπως έγινε σαφές από τα διαγράμματα, έτσι με το Duncan τεστ επιβεβαιώθηκε ότι τη χειρότερη πορεία την παρουσίασαν τα δείγματα Control, κάτι το οποίο είναι λογικό αφού τα δείγματα αυτά δεν είχαν επικαλυφθεί με μεμβράνη. Λίγο καλύτερη πορεία, αν και μη σημαντική στατιστικά, παρουσίασαν τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με μεμβράνη CMC χωρίς προσθήκη αντιοξειδωτικού, πράγμα που σημαίνει ότι το επικαλυπτικό CMC από μόνο του παρέχει μία αμφισβητήσιμη προστασία. Ακολουθούν με παρόμοια αποτελέσματα τα δείγματα με επικάλυψη CMC και συγκέντρωση 200 ppm μαζί με αυτά που είχαν εμπλουτιστεί με αιθέριο έλαιο. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται από τον πίνακα, μία σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι στη συγκέντρωση των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπου τα δείγματα με αιθέριο έλαιο στην επικάλυψη, παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τις περισσότερες σειρές δειγμάτων. Επόμενα έρχονται τα δείγματα με συγκέντρωση αιθανολικού εκχυλίσματος στα 500 ppm ενώ την καλύτερη αντιοξειδωτική προστασία με προσέφεραν τα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού (800 ppm) και αυτά με συνδυασμό αιθέριου ελαίου και 200 ppm εκχυλίσματος στην επικαλυπτική μεμβράνη. Σε όλα τα πειράματα παρατηρήθηκε με τη μέθοδο Anova η στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου στην πορεία της οξείδωσης ($P<0.05$).

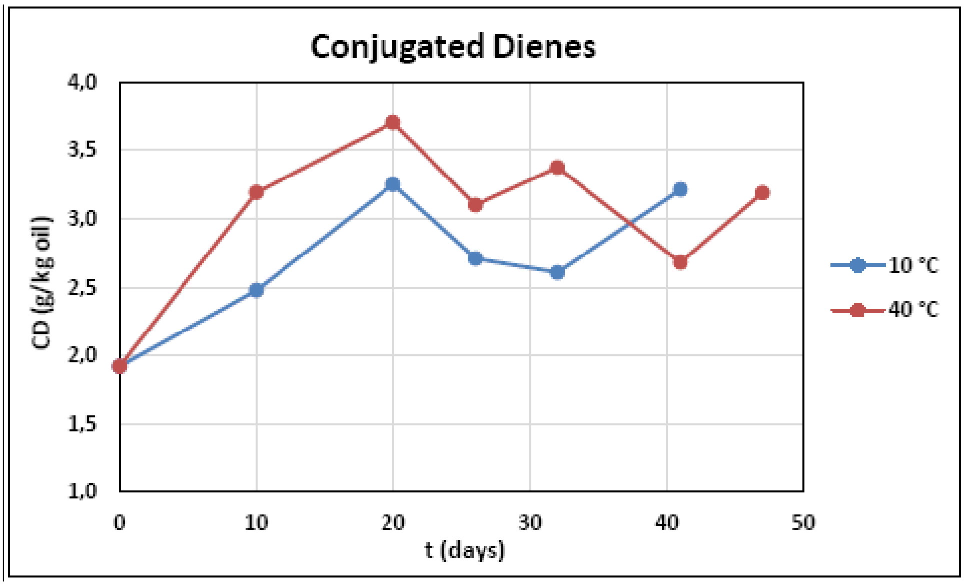
5.8 Πορεία οξείδωσης προσομοιωτών τροφίμων

Εκτός από τη μελέτη της πορείας οξείδωσης των ιχθυρών με και χωρίς επικάλυψη εμπλουτισμένη με αντιοξειδωτικό ή μη, έγινε και μελέτη της πορείας οξείδωσης σφαιριδίων από ζυμάρι με 14.3% περιεκτικότητα σε φοινικέλαιο, για να εξετασθεί η πιθανότητα χρήσης τους ως προσομοιωτή τροφίμου σε μετέπειτα πειράματα. Τα σφαιρίδια ζυμαριού δεν επικαλύφθηκαν, αλλά χωρίστηκαν σε δύο σειρές δειγμάτων, από τις οποίες η μία αποθηκεύτηκε στους 10ºC (Sanyo incubator) και η άλλη σε φούρνο Thermawatt στους 40ºC. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για ένα διάστημα 41 ημερών για τα δείγματα στους 10ºC, και 47 ημερών για τα δείγματα στους 40ºC. Οι μετρήσεις που έγιναν στο λάδι των δειγμάτων μετά από κάθε δειγματοληψία ήταν ίδιες με αυτές που έγιναν για τα ιχθυρά, δηλαδή υπολογισμός των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (αριθμός υπεροξειδίων και συζυγή διένια) καθώς και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης (αριθμός π-ανισιδίνης). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 5.25 Αριθμός υπεροξειδίων για σφαιρίδια ζυμαριού χωρίς επικάλυψη έπειτα από αποθήκευση στους 10 και στους 40ºC

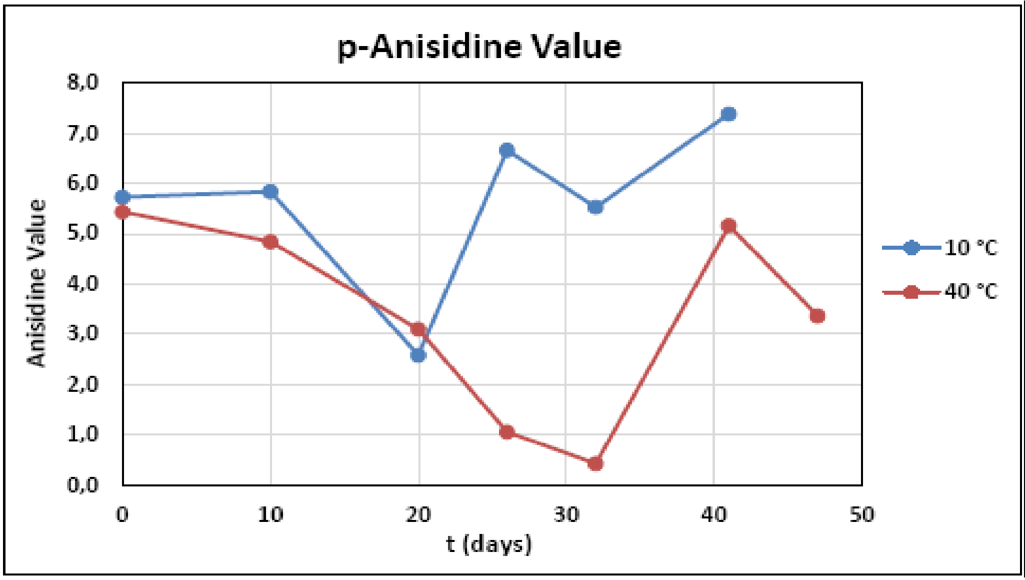
Από το διάγραμμα φαίνεται ότι τα δείγματα στους 10ºC είχαν για όλο το διάστημα των μετρήσεων αριθμούς υπεροξειδίων υψηλότερους από τα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί στους 40ºC. Αυτό έρχεται επί πλέον σε αντίθεση με το γεγονός ότι τα δείγματα στους 40ºC είχε σχεδόν ψηθεί επομένως το περιεχόμενο έλαιο ήταν πιο εκτεθειμένο σε επαφή με τον αέρα και επομένως σε οξείδωση με αυτόν τον τρόπο. Πιθανότατα όμως με την απομάκρυνση του νερού περιορίζεται η ικανότητα διάχυσης εκκινητών οξείδωσης, όπως ιόντων μετάλλων, που περιέχονται στο ζυμάρι.



Διάγραμμα 5.26 Συζυγή διένια για σφαιρίδια ζυμαριού χωρίς επικάλυψη έπειτα από αποθήκευση στους 10 και στους 40°C

Τα συζυγή διένια δεν δείχνουν να συμφωνούν με τον αριθμό υπεροξειδίων. Στο διάγραμμα παρατηρείται πιο μεγάλη αύξηση των συζυγών διενίων για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 40°C. Οι διαφορές βέβαια στις τιμές των δύο σειρών δειγμάτων είναι αρκετά μικρές και προφανώς δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο γενικό συμπέρασμα για την πορεία οξείδωσης στις δύο αυτές θερμοκρασίες. Πιθανώς οι δύο θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για εξέταση της οξείδωσης να έπρεπε να έχουν μεγαλύτερη διαφορά για να μπορεί να εξαχθεί κάποιο πιο ευκρινές αποτέλεσμα. Διαφορετικά, ίσως να προέκυπτε κάποια διαφορετική πορεία οξείδωσης για μελέτη σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αποθήκευσης. Βέβαια και πάλι, λύση θα ήταν η επιλογή διαφορετικών θερμοκρασιών καθώς τα δείγματα ζύμης που βρίσκονταν στους 10°C μετά τις 41 ημέρες είχαν χαλάσει εμφανώς και μικροβιολογικά επομένως απορρίφθηκαν και δεν εξετάστηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Σε μελλοντικό πείραμα, ίσως να έπρεπε να προτιμηθούν διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, και ιδιαίτερα παρασκευής άλλων προσομοιωτών τροφίμων για παρακολούθηση της οξείδωσης, καθώς η εξέλιξή της στα συγκεκριμένα δείγματα ήταν πολύ αργή και επομένως δεν θα επιτρέψει τη διεξαγωγή σαφών συμπερασμάτων με τη χρήση αντιοξειδωτικών.

Ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και από τις τιμές του αριθμού π-ανισιδίνης, με διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω.



Διάγραμμα 5.27 Αριθμός p-AV για δείγματα ζυμαριού χωρίς επικάλυψη έπειτα από αποθήκευση στους 10 και στους 40°C

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών με δυνατότητα να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής τροφίμων, καθυστερώντας ή παρεμποδίζοντας την οξείδωσή τους. Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας εξετάσθηκε η χρήση του φυτού *Rosmarinus officinalis* της οικογένειας *Lamiaceae* ως αντιοξειδωτικό για την προστασία ιχθυρών.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παραλαβής εκχυλισμάτων τόσο σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη την αιθανόλη, όσο και με εξαντλητικές εκχυλίσεις Soxhlet με αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα. Όλα τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ως προς την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH και ως προς τα ολικά εκχυλισθέντα στερεά συστατικά με μέτρηση τους στερεού υπολείμματος. Παράλληλα εξετάστηκαν με τη μέθοδο HPLC για να υπολογιστεί η ποσότητα του βασικού αντιοξειδωτικού που περιέχει το δενδρολίβανο (δηλαδή του ροσμαρινικού οξέος). Το αιθανολικό εκχύλισμα από Soxhlet εμφάνισε τις υψηλότερες αποδόσεις, με το αιθανολικό έπειτα από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα να ακολουθεί, ενώ το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα εμφάνισε τις χαμηλότερες αποδόσεις, κοντινές με αυτές του αιθανολικού εκχυλίσματος υπερήχων. Από τις δοκιμές που έγιναν για την εκχύλιση σε υπερήχους (δύο φιάλες σε διαφορετικές θέσεις στο λουτρό, διπλές εκχυλίσεις, δύο χρόνοι εκχύλισης) δεν μπόρεσε να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα ως προς το ποια θέση, ή ποιος χρόνος εκχύλισης είναι οι βέλτιστες συνθήκες για εξασφάλιση μεγαλύτερης απόδοσης και θα χρειαστεί μελέτη σε επόμενο πείραμα για να εξαχθεί ένα πιο σαφές συμπέρασμα. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η συσχέτιση των ολικών φαινολών (mg GAE/L) και της δραστικότητας έναντι της δέσμευσης DPPH (mgtrolox/L) σε όλα τα δείγματα έχουν μία γραμμική συσχέτιση με αρκετά μεγάλη όμως διασπορά ($R^2 = 0.8413$).

Σε ότι αφορά την επικάλυψη των ιχθυρών και την αποθήκευσή τους στους 4°C, τα διαγράμματα υπεροξειδίων, συζυγών διενίων και αριθμού π-ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου, αλλά και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα δενδρολίβανου, με το οποίο εμπλουτίστηκε το εδώδιμο επικαλυπτικό CMC, πρόσφερε προστασία στα δείγματα από την οξείδωση. Πιο συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη οξείδωση παρουσίασαν τα δείγματα που δεν είχαν καμία επικάλυψη. Μικρή, μη στατιστικά σημαντική, προστασία στην οξείδωση προσέφεραν οι μη εμπλουτισμένες μεμβράνες CMC. Επίσης μικρή προστασία προσέφεραν οι μεμβράνες με τη μικρότερη συγκέντρωση αιθανολικού εκχυλίσματος (200 ppm) και αυτές που είχαν εμπλουτιστεί με αιθέριο έλαιο. Τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 500 ppm και τα ιχθυρά που επικαλύφθηκαν με CMC εμπλουτισμένο με συνδυασμό αιθανολικού εκχυλίσματος και αιθέριου ελαίου, έδειξαν αρκετά κοντινές τιμές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα δείγματα που επικαλύφθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη CMC εμπλουτισμένη με αιθανολικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 800 ppm είχαν τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Οι προσομοιωτές τροφίμων δεν έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά την αποθήκευσή τους στους 10 και τους 40ºC. Οι διαφορές στις τιμές των δύο σειρών δειγμάτων ήταν αρκετά μικρές και προφανώς δεν ήταν δυνατόν να εξαχθεί κάποιο γενικό συμπέρασμα για την πορεία οξείδωσης στις δύο αυτές θερμοκρασίες. Πιθανώς οι δύο θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για εξέταση της οξείδωσης να έπρεπε να έχουν μεγαλύτερη διαφορά για να μπορεί να εξαχθεί κάποιο πιο ευκρινές αποτέλεσμα. Τα δείγματα ζύμης που βρίσκονταν στους 10ºC μετά τις 41 ημέρες είχαν χαλάσει εμφανώς και μικροβιολογικά επομένως απορρίφθηκαν και δεν εξετάστηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Σε μελλοντικό πείραμα, ίσως να έπρεπε να προτιμηθούν διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, και ιδιαίτερα παρασκευής άλλων προσομοιωτών τροφίμων για παρακολούθηση της οξείδωσης, καθώς η εξέλιξή της στα συγκεκριμένα δείγματα ήταν πολύ αργή και επομένως δεν θα επιτρέψει τη διεξαγωγή σαφών συμπερασμάτων με τη χρήση αντιοξειδωτικών.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdollahi M., Rezaei M., Farzi G. (2011), «Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging», International Journal of Food Science & Technology, 47, 847-853

Aguilar F., Autrup H., Barlow S., Castle L., Crebelli R., Dekant W., Engel K.H., Gontard N., Gott D., Grilli S., Gütler R., Larsen J., Leclercq C., Leblanc J.C., Malcata X., Mennes W., Milana M.R., Pratt I., Rietjens I., Tobback P., Toldrá F. (2008), «Use of rosemary extracts as a food additive. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food», The EFSA Journal, 721, 1-29

Akoh C.C, Min D.B. (2008), «Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology», Marcel Dekker, pp 483-501

Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J. (2004) «Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry», Ultrasonics Sonochemistry, 11, 261-265

Angelo A. (1996), «Lipid oxidation in foods», Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36/3, pp 175-224

Bal M.O., Tuner H. (2014), «ESR dosimetry and radical kinetics of gamma-irradiated propyl gallate», Journal of Molecular Structure, 1071, 123-127

Batista Reis L.C., Oliveira de Souza C., Alves da Silva J.B., Martins A.C., Nunes I.L., Druzian J.I. (2015), «Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product», Journal of Food and Bioproducts Processing, 94, 382-391

Betz M., Steiner B., Schantz M., Oidtmann J., Mäder K., Richling E., Kulozik U. (2012), «Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels», Journal of Food Research International, 47, 51-57

Bifani V., Ramírez C., Ihl M., Rubilar M., García A., Zaritzky N. (2007), «Effects of murta (*Ugni molinae Turcz*) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films», LWT, 40, 1473-1481

Biswal D.R., Singh R.P. (2004), «Characterization of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer», Carbohydrate Polymers, 57, 379-387

Bolumar T., Andersen M.L., Orlien V. (2011), «Antioxidant active packaging for chicken meat processed by high pressure treatment», Journal of Food Chemistry, 129, 1406-1412

Bolumar T., LaPeña D., Skibsted L.H., Orlien V. (2016), «Rosemary and oxygen scavenger in active packaging for prevention of high-pressure induced lipid oxidation in pork patties», Journal of Food Packaging and Shelf Life, 7, 26-33

Bourtoom T. (2008), «Edible films and coatings: characteristics and properties», International Food Research Journal, 15/3, 1-12

Brewer M.S. (2011), «Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action and Potential Applications», Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10/4, pp 221-247

Camo J., Beltrán J.A., Roncalés P. (2008), «Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging», Journal of Meat Science, 80, 1086-1091

Camo J., Lorés A., Djenane D., Beltrán J.A., Roncalés P. (2010), «Display life of beef packaged with an antioxidant active film as function of the concentration of oregano extract», Journal of Meat Science, 88, 174-178

Choe E., Min D.B. (2009), «Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods», Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8/4, 345-358

Contini C., Katsikogianni M., O'Neill F.T., O'Sullivan M., Dowling D.P., Monahan F.J. (2011), «Development of active packaging containing natural antioxidants», Procedia Food Science, 1, 224-228

Decker E.A., Elias R.J., McClements D.J. (2010), «Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications» Volume 1, Woodhead publishing.

Eça K.S., Sartori T., Menegalli F.C. (2014), «Films and edible coatings containing antioxidants – a review», Brazilian Journal of Food Technology, 17/2, 98-112

Falguera V., Quintero J.P., Jiménez A., Muñoz J.A., Ibarz A. (2011), «Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use», Trends in Food Science & Technology, 22, pp 292-303

Frankel E.N. (2005), «Lipid Oxidation», Woodhead Publishing, pp 1-128

Frankel E.N. (2012), «Lipid Oxidation», A volume in Oily Press Library Series, pp 1-14

Gálico D.A., Nova C.V., Guerra R.B., Bannach G. (2015), «Thermal and spectroscopic studies of the antioxidant food additive propyl gallate», Food Chemistry, 182, 89-94

Genskowsky E., Puente L.A., Pérez-Álvarez J.A., Fernandez-Lopez J., Muñoz L.A. (2015), «Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*)», LWT – Food Science and Technology, 64, 1057-1062

Gómez-Estaca J., Montero P., Giménez B., Gómez-Guillén M.C. (2007), «Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*)», Food Chemistry, 105, 511-520

Gómez-Estaca J., Bravo L., Gómez-Guillén M.C., Alemán A., Montero P. (2008), «Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts», Journal of Food Chemistry, 112, 18-25

Kanner J., Rosenthal I. (1992), «An assessment of lipid oxidation in foods: technical report», International Union of Pure and Applied Chemistry, 64/12, 969-1964, (www.iupac.org/publications/pac-2007/1992/pdf/6412x1959.pdf)

Kulkarni V., Rathod V. (2014), «Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera indica*leaves», Ultrasonics Sonochemistry, 21, 606-611

Liu C., Li J., Bi Y., Wang X., Sun S., Yang G. (2016), «Thermal losses of tetriary butylhydroquinone (TBHQ) and its effect on the qualities of palm oil», Journal of Oleo Science

López de Dicastillo C., Gómez-Estaca J., Catalá R., Gavara R., Hernández-Muñoz P. (2011), «Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines», Journal of Food Chemistry, 131, 1376-1384

López de Dicastillo C., Rodríguez F., Guarda A., Galotto M.J. (2015), «Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications», Journal of Carbohydrate Polymers, 136, 1052-1060

Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (1995), «Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives», Marcel Dekker

Marcos B., Sárraga C., Castellari M., Kappen F., Schennink G., Arnau J. (2014), «Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α-tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications», Food Packaging and Shelf Life, 1, 140-150

Matrucci J.F., Gende L.B., Neira L.M., Ruseckaite R.A. (2015), «Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films», Journal of Industrial Crops and Products, 71, 205-213

Mourtzinos I., Papadakis S., Igoumenidis P., Karathanos V. (2011), «Encapsulation of *Melissa Officinalis* leaf's active compounds in β-cyclodextrin and modified starch», Procedia Food Science, 1, 1679-1685

Μπακλώρη Χ. (2010), «Κινητική Μελέτη Δεικτών Διατηρησιμότητας Καπνιστού Χελιού», Διπλωματική εργασία

Μπράβου Κ. (2015), «Ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών από αρωματικά φυτά σε έλαια και συστήματα συσκευασίας τροφίμων», διπλωματική εργασία

Navarrete A., Herrero M., Martín A., Cocero M.J., Ibáñez E. (2011), «Valorization of solid wastes from essential oil industry», Journal of Food Engineering, 104, 196-201

Norajit K., Myong Kim K., Hyung Ryu G. (2010), «Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract», Journal of Food Engineering, 98, 377-384

Oussalah M., Caillet S., Salmiéri S., Saucier L., Lacroix M. (2004), «Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle», Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5598-5605

Peng Y., Wu Y., Li Y. (2013), «Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials», International Journal of Biological Macromolecules, 59, 282-289

Pereira de Abreu D.A., Paseiro Losada P., Maroto J., Cruz J.M. (2010), «Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Journal of Food Research International, 43, 1277-1282

Pereira de Abreu D.A., Paseiro Losada P., Maroto J., Cruz J.M. (2010), «Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants», Journal of Food Chemistry, 126, 315-320

Pereira de Abreu D.A., Paseiro Losada P., Maroto J., Cruz J.M. (2010), «Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*)», Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12, 50-55

Pereira de Abreu D.A., Villalba Rodriguez K., Cruz J.M. (2011), «Extraction, purification and characterization of an antioxidant extract from barley husks and development of an antioxidant active film for food package», Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies, 13, 134-141

Pérez Espitia P.J., Du W.X., Avena-Bustillos R., Ferreira Soares N., McHugh T. (2014), «Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties – A review», Journal of Food Hydrocolloids, 35, 287-296

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001), «Antioxidants in food: Practical applications», Woodhead publishing

Ponce A.G., Roura S.I., del Valle C.E., Moreira M.R. (2008), «Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies», Journal of Postharvest Biology and Technology, 49, 294-300

Qin Y.Y., Zhang Z.H., Li L., Yuan M.L., Fan J., Zhao T.R. (2015), «Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind», Journal of Food Science & Technology, 52/3, 1471-1479

Quilaqueo Gutiérrez M., Echeverría I., Ihl M., Bifani V., Mauri A. (2012), «Carboxymethylcellulose-montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract», Journal of Carbohydrate Polymers, 87, 1495-1502

Riveros C.G., Nepote V., Grosso N.R. (2015), «Thyme and basil essential oils included in edible coatings as a natural preserving method of oilseed kernels», Journal of the Science of Food and Agriculture, 96/1, 183-191

Romdhane M., Gourdon C. (2002), «Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound», Chemical Engineering Journal, 87, 11-19

Sabaghi M., Maghsouldou Y., Khomeiri M., Ziaiifar A.M. (2015), «Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel», Journal of Postharvest Biology and Technology, 110, 224-228

Shit S., Shah P. (2014), «Edible Polymers: Challenges and Opportunities», Journal of Polymers, 2014, 1-13

Siripatrawan U., Harte B.R. (2010), «Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract», Journal of Food Hydrocolloids, 24, 770-775

Siripatrawan U., Noipha S. (2011), «Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages», Journal of Food Hydrocolloids, 27, 102-108

Tavassoli_Kafrani E., Shekarchizadeh H., Masoudpour-Behabadi M. (2016), «Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans», Journal of Carbohydrate Polymers, 137, 360-374

Tharanathan R.N. (2003), «Biodegradable films and composite coatings: past, present and future», Trends in Food Science & Technology, 14, pp71-78

Varzakas T., Tzia C. (2016), «Handbook of Food Proccessing», pages 541-548

Vekiari S. A., Oreopoulou V., Tzia C., Thomopoulos C. D. (1993), «Oregano flavonoids as lipid antioxidants», Journal of the American Oil Chemists Society, 70/5, 483-487

Wang Q., Tian F., Feng Z., Fan X., Pan Z., Zhou J. (2014), «Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging», International Journal of Food Science & Technology, 50/2, 458-464

Wąsowicz E., Gramza A., Hęś M., Jeleń H., Korczak J., Malecka M., Mildner-Szkudlarz S., Rudzińska M., Samotyja U., Zawirska-Wojtasiak R. (2004), «Oxidation of Lipids in Food», Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 13/54, 87-100, (http://journal.pan.olsztyn.pl/fd.php?f=479)

Yehye W.A., Rahman N.A., Ariffin A., Hamid S.B., Alhadi A.A., Kadir F.A., Yaeghoobi M. (2015), «Understanding the chemistry behind the antioxidants activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review», European Journal of Medicinal Chemistry, 101, 295-312

Zu G., Zhang R., Yang L., Ma C., Zu Y., Wang W., Zhao C. (2012), «Ultrasound-Assisted Extraction of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid Using Ionic Liquid Solution from *Rosmarinus officinalis*», International Journal of Molecular Sciences, 13, 11027-11043