



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

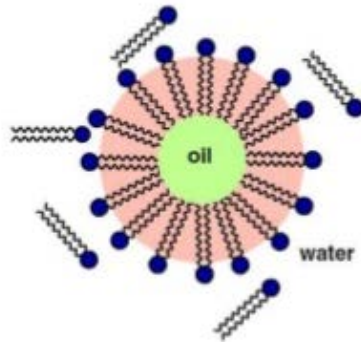
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

# Νανογαλακτώματα με ενσωμάτωση λειτουργικών συστατικών τροφίμων

Διπλωματική εργασία

Έλενα Σκαλτσά



Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Κωνσταντίνα Τζιά, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017



## *Ευχαριστίες*

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Κωνσταντίνα Τζιά Καθηγήτρια ΕΜΠ, για τις πολύτιμες συμβουλές της και την ηθική υποστήριξη μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Κατσούλη για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Σοφία Χανιώτη, Παρασκευή Σιαμανδούρα, Τζίνα Φρακολάκη και Βιργινία Γιάννου, όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρεία ΕΛΑΪΣ για την παροχή πρώτων υλών και τα εργαστήρια της Οργανικής και Ανόργανης Χημείας της Σχολής μας, για την παροχή των απαραίτητων οργάνων για την εκπόνηση των πειραμάτων μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και όλους εκείνους που μου στάθηκαν αυτή την περίοδο και όποτε άλλοτε χρειάστηκα τη βοήθεια και συμπαράστασή τους.



## Περίληψη

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο την παρασκευή και μελέτη των έλαιο-σε-νερό (o/w) νανογαλακτωμάτων με λιπαρή φάση το πυρηνέλαιο και το ηλιέλαιο. Για την ομογενοποίηση της λιπαρής με την υδατική φάση χρησιμοποιήθηκαν μη ιοντικοί γαλακτωματοποιητές, Tween 20 και Tween 40. Ακολούθως, μελετήθηκε η δυνατότητα της ενσωμάτωσης λιπόφιλων βιοδραστικών συστατικών στα έλαια που αναφέρθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, ενσωματώθηκε λυκοπένιο στο ηλιέλαιο και φαινολικά συστατικά προερχόμενα από εκχύλιση διαφορετικών πηγών (ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς) στο πυρηνέλαιο, με σκοπό να μελετηθεί η επίδρασή τους στις ιδιότητες των παρασκευασμένων νανογαλακτωμάτων. Οι ιδιότητες που μελετήθηκαν ήταν η μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MDD), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό (zeta potential), η ρεολογική συμπεριφορά (ιξώδες), το χρώμα, η θολότητα, ο δείκτης διάθλασης και ο δείκτης σταθερότητας (ESI). Επίσης, μετρήθηκε η επιφανειακή τάση των υδατικών διαλυμάτων γαλακτωματοποιητή, των εξεταζόμενων λιπαρών φάσεων (εμπλουτισμένων και μη) και η διεπιφανειακή τάση των ελαίων με τα διαλύματα νερού/γαλακτωματοποιητή. Σε όλα τα o/w νανογαλακτώματα ακολούθησε ο προσδιορισμός της διατηρησιμότητάς τους, τόσο για τα μη εμπλουτισμένα (έλεγχος της σταθερότητας του νανογαλακτώματος), όσο και για τα εμπλουτισμένα (διατήρηση του βιοδραστικού συστατικού στο σύστημα ενσωμάτωσής του).

Σε πρώτη φάση αναλύονται τα γαλακτώματα και οι υποκατηγορίες τους (νανογαλακτώματα, μικρογαλακτώματα) όσον αφορά τις φάσεις που τα αποτελούν, τις φυσικές, λειτουργικές ιδιότητές τους, τους τρόπους που παρασκευάζονται και τη σταθερότητά τους. Ακολούθως, αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά των ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν και αναλύονται εκτενέστερα τα βιοδραστικά συστατικά που ενσωματώθηκαν. Σημαντικά κρίνονται τα οφέλη που παρέχουν στην υγεία του ανθρώπου τόσο το λυκοπένιο, όσο και τα φαινολικά συστατικά, η βιοδιαθεσιμότητα και η δράση τους στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων που εμπλουτίζονται.

Κατά την πειραματική διαδικασία, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα φάσης (έλαιο-νερό-γαλακτωματοποιητής), όπου παρουσιάζονται τα σταθερά νανογαλακτώματα προκειμένου να προσδιοριστούν οι αναλογίες των φάσεων που θα τα αποτελούν. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα έλαια, εμπλουτισμένα ή μη. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα νανογαλακτώματα στις επιθυμητές αναλογίες, όπως καθορίστηκαν από τα διαγράμματα φάσης και προσδιορίστηκαν οι ιδιότητές τους. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του εκάστοτε βιοδραστικού συστατικού, του είδους και της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή και του είδους του ελαίου στις προαναφερθείσες ιδιότητες των τελικών νανογαλακτωμάτων.

Από τις αναλύσεις των ιδιοτήτων των νανογαλακτωμάτων προέκυψε ότι είναι δυνατό να παρασκευαστούν σταθερά o/w νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση το

πυρηνέλαιο και το ηλιέλαιο, παρουσία μικρών ποσοτήτων γαλακτωματοποιητή. Από τα διαγράμματα φάσης προέκυψε ότι η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή μπορεί να κυμαίνεται σε χαμηλά ποσοστά και σε συνδυασμό με την κατάλληλη ποσότητα ελαίου, να προκύψει ένα σταθερό νανογαλάκτωμα. Από τους γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν, καταλληλότερος κρίθηκε ο Tween 20, λόγω της καλύτερης γαλακτωματοποιητικής ικανότητας που παρουσίασε κατά την ομογενοποίηση, καθώς ο Tween 40 δεν αφομοίωνε πλήρως την προστιθέμενη ποσότητα ελαίου.

Η χρήση του ηλιέλαιου και του πυρηνέλαιου, στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στις ιδιότητες των συγκεκριμένων κολλοειδών συστημάτων που μελετήθηκαν. Αντίθετα το είδος και η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν το ιξώδες, το δείκτη διάθλασης, δείκτη πολυδιασποράς και τη θολότητα.

Η προσθήκη των βιοδραστικών συστατικών λειτούργησε θετικά ως προς την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων. Η μείωση της επιφανειακής τάσης των ελαίων μετά τον εμπλουτισμό τους, διευκόλυνε την ομογενοποίηση των φάσεων του νανογαλακτώματος. Επιπλέον, με την προσθήκη των συστατικών μειώθηκε η μέση διάμετρος των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων. Όσον αφορά τη διατήρηση των βιοδραστικών συστατικών στα συστήματα που ενσωματώθηκαν, φάνηκε πως τα ο/ω νανογαλακτώματα λειτουργούν ως καλοί φορείς ενσωμάτωσης των εν λόγω ουσιών και διαθέτουν υψηλή κινητική σταθερότητα.

## Abstract

---

The scope of the present study were the formation and the examination of the physicochemical properties of oil-in-water (o/w) nanoemulsions based on pomace and sunflower oil, using non-ionic emulsifiers (Tween 20 and Tween 40) and/or incorporated bioactive compounds. More specifically, lycopene was incorporated in sunflower oil and phenolic compounds from different sources (pomace and olive leaves), in olive pomace oil, in order to study their effects on the properties of the prepared nanoemulsions. The studied properties were the mean droplet diameter (MDD), the polydispersity index (PDI),  $\zeta$ -potential, viscosity, color, turbidity, refractive index and emulsion stability index (ESI) of the o/w nanoemulsions. Additionally it was measured the air/water surface tension of a) aqueous solutions b) oil phases and c) examined o/w nanoemulsions, as long as the interfacial tension of the lipid/water layer. The kinetic stability of o/w nanoemulsions during storage was determined for the blank nanoemulsions and nanoemulsions with the incorporated bioactive compounds.

Initially, emulsions and their subcategories (nanoemulsions, microemulsions) are analyzed for the phases that constitute their physical and functional properties, the different homogenization formations, the various destabilization mechanisms and their thermodynamic and kinetic stability. Moreover, in food industry it was discussed the incorporation of bioactive compounds into functional foods which gain interest, due to their potential health benefits.

During the experimental procedure, pseudo-ternary phase diagrams (oil-water-emulsifier) were constructed in order to identify the ratios of the ingredients that can lead to stable nanoemulsions and determine the emulsifying ability of each bioactive compound and emulsifier. Pseudo-ternary phase diagrams were performed for both examined oils. Then nanoemulsions were prepared to permissible ratios as determined by the phase diagrams and the data acquired from the determination of their properties were processed. Finally it was studied, the effect of each bioactive compound, type and concentration of emulsifier and the type of the examined oils, regards their influence in the aforementioned properties of the final o/w nanoemulsion.

In conclusion, the results of this study proved that stable o/w nanoemulsions can be prepared using pomace and sunflower oil and small amounts of emulsifier. Phase diagrams show that the concentration of emulsifier may range at low levels in combination with the appropriate amount of oil, in order to give a stable nanoemulsion. Comparing emulsifier Tween 20 with Tween 40, the first one has better emulsifying ability.

The properties of nanoemulsions were not significantly affected by the different oil phases used in the preparation of the nanoemulsion. On the contrary viscosity, refractive index, polydispersity index and turbidity were affected by the type and concentration of the emulsifier.

By incorporating bioactive components in the examined oils, the surface tension was decreased, indicating that the homogenization process was facilitated. Moreover, the mean droplet diameter of the nanoemulsion was reduced. As regards the preservation of the incorporated bioactive compounds, it was proven that the o/w nanoemulsions can be excellent delivery systems for bioactive compounds.



## Πίνακας περιεχομένων

---

Abstract.....	3
Περίληψη .....	4
Κεφάλαιο 1: Γαλακτώματα-Νανογαλακτώματα .....	12
1.1 Εισαγωγή.....	12
1.2 Γαλακτώματα .....	13
1.2.1 Γενικά .....	13
1.2.2 Ιδιότητες.....	14
1.3 Μικρογαλακτώματα .....	15
1.3.1 Ορισμός.....	15
1.3.2 Ιδιότητες.....	15
1.4 Νανογαλακτώματα .....	15
1.4.1 Ορισμός.....	15
1.4.2 Ιδιότητες.....	15
1.4.3 Γενικά .....	16
1.5 Τύποι (o/w και w/o).....	17
1.6 Συστατικά γαλακτωμάτων/τύπο γαλακτώματος .....	17
1.6.1 Λιπαρή φάση .....	17
1.6.2 Υδατική φάση .....	18
1.6.3 Γαλακτωματοποιητές.....	18
1.7 Σχηματισμός-μηχανισμός.....	29
1.7.1 Παράγοντες σχηματισμού.....	29
1.8 Παρασκευή-Τεχνολογία .....	30
1.8.1 Μέθοδοι χαμηλής ενέργειας.....	31
1.8.2 Μέθοδοι υψηλής ενέργειας .....	32
1.8.3 Επιλογή κατάλληλης διαδικασίας .....	38
1.8.4 Σύγκριση μεθόδων υψηλής και χαμηλής ενέργειας .....	39
1.9 Σταθερότητα-Αποσταθεροποίηση .....	40
1.9.1 Προσδιορισμός της σταθερότητας των γαλακτωμάτων .....	41
Κεφάλαιο 2: Έλαια, βιοδραστικά συστατικά και ενσωμάτωσή τους.....	44
2.1 Ηλιέλαιο.....	44

2.1.1 Εισαγωγή .....	44
2.1.2 Συστατικά .....	45
2.1.3 Χρήσεις.....	47
2.2 Πυρηνέλαιο.....	48
2.2.1 Εισαγωγή .....	48
2.2.2 Χαρακτηριστικά και συστατικά.....	50
2.2.3 Εφαρμογές.....	50
2.3 Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών στα νανογαλακτώματα .....	51
2.3.1 Καροτενοειδή.....	52
2.3.2 Φαινολικές ενώσεις.....	58
Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος.....	64
3.1 Σκοπός .....	64
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	65
3.2.1 Α' ύλες-αντιδραστήρια .....	65
3.2.2 Εξοπλισμός .....	65
3.2.3 Πειραματική Διαδικασία-Επεξεργασία των δειγμάτων .....	66
3.2.3.4 Αναλύσεις .....	67
3.3 Σχεδιασμός πειραμάτων .....	76
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα-Σχολιασμός .....	80
Α' μέρος: Διαγράμματα φάσης.....	81
Β' μέρος: Παρασκευή των νανογαλακτωμάτων και μελέτη των ιδιοτήτων τους.....	86
4.B.1 Πρώτη Σειρά Πειραμάτων: μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου και πυρηνέλαιου .....	87
4.B.2 Δεύτερη Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με λυκοπένιο νανογαλακτώματα ηλιέλαιου.....	101
4.B.3 Τρίτη Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με φαινολικά συστατικά νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου.....	113
4.B.4 Επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση .....	124
4.B.5 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) .....	127
4.B.5.1 Μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση πυρηνέλαιο και ηλιέλαιο.....	127
4.B.5.2 Εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λυκοπένιο (έλαιο: ηλιέλαιο).....	129

4.B.5.3 Εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με φαινολικά συστατικά από διαφορετικά εκχυλίσματα (έλαιο: πυρηνέλαιο) .....	130
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα-Προτάσεις.....	132
Βιβλιογραφία .....	136
Παράρτημα.....	143



## Κεφάλαιο 1: Γαλακτώματα-Νανογαλακτώματα

---

### 1.1 Εισαγωγή<sup>1,2,3,4,5</sup>

---

Στον τομέα των τροφίμων, τόσο τα φυσικά όσα και τα επεξεργασμένα τρόφιμα αποτελούνται εν μέρει είτε εξ ολοκλήρου από γαλακτώματα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το γάλα, η κρέμα γάλακτος, οι χυμοί φρούτων, οι παιδικές τροφές, οι σούπες, οι ζύμες των κέικ, οι επικαλύψεις σαλατών, η μαγιονέζα, τα κρεμώδη λικέρ, οι σάλτσες, τα γλυκά, το παγωτό, το γάλα για τον καφέ, το βούτυρο, και η μαργαρίνη (McClements 2005).

Τα γαλακτώματα εκτός από το ρόλο τους ως βασικά τρόφιμα, βρίσκουν όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή ως πρόσθετα τροφίμων. Αυτό γίνεται λόγω της αύξησης του ενδιαφέροντος στην αξιοποίηση των κολλοειδών συστημάτων, ως συστήματα ενσωμάτωσης λειτουργικών συστατικών στα τρόφιμα. Τέτοια λειτουργικά συστατικά μπορεί να είναι συγκεκριμένες γεύσεις ή χρωστικές ουσίες, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακά και γενικώς βιοδραστικά συστατικά.

Δύο μη αναμίξιμα υγρά, το ένα από τα οποία βρίσκεται σε διεσπαρμένη μορφή μέσα στο άλλο αποτελούν το γαλακτώμα. Στη βιομηχανία τροφίμων, τα δύο υγρά που αναμιγνύονται είναι: νερό και έλαιο. Ανάλογα με την κατανομή των φάσεων τα γαλακτώματα διακρίνονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες:

1) Έλαιο σε νερό γαλακτώματα (oil in water - o/w)

Είναι τα γαλακτώματα στα οποία σταγόνες ελαίου έχουν διασπαρεί σε νερό, π.χ. γάλα, κρέμα, παγωτό, μαγιονέζα, σούπες και σάλτσες.

2) Νερό σε έλαιο γαλακτώματα (water in oil – w/o)

Είναι τα γαλακτώματα στα οποία σταγόνες νερού έχουν διασπαρεί σε λιπαρή φάση, π.χ. βούτυρο, μαργαρίνη και κρεμώδες τυρί

Στα περισσότερα τρόφιμα, η διάμετρος των σταγονιδίων του γαλακτώματος κυμαίνεται περίπου από 100 nm μέχρι 100 μm, αλλά υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των γαλακτωμάτων με μικρότερες διαμέτρους σταγονιδίων ( $d < 100$  nm) λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Τα γαλακτώματα με βάση τη διάμετρο των σταγονιδίων τους διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τα γαλακτώματα, μικρογαλακτώματα και τα νανογαλακτώματα. Κάθε ένα από αυτά έχει συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, που μπορεί να προσδώσει πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματα σε διάφορες εφαρμογές.

## 1.2 Γαλακτώματα

---

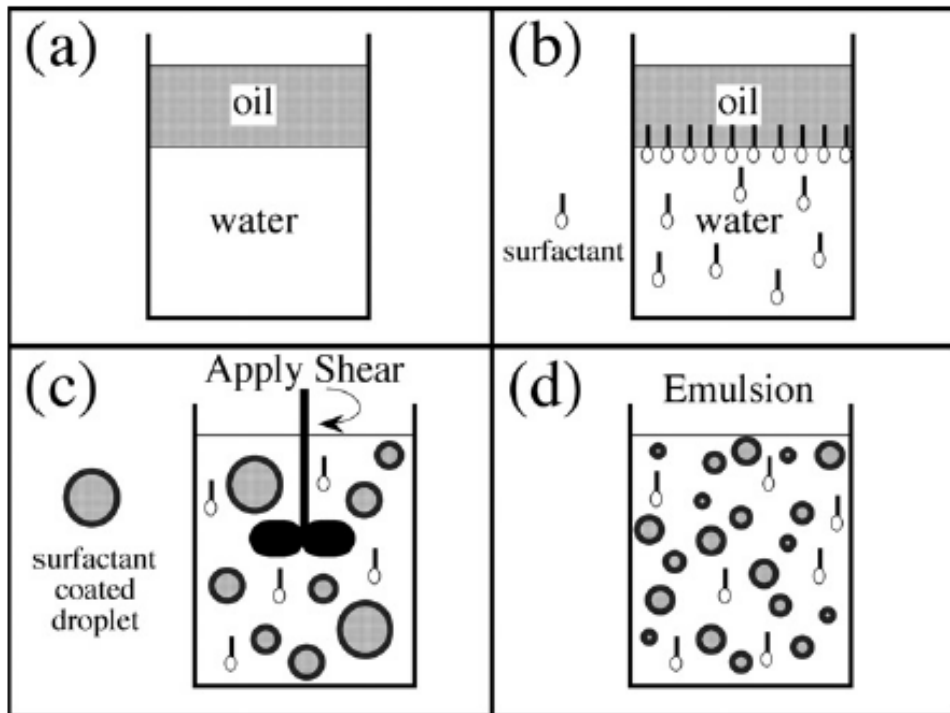
### 1.2.1 Γενικά <sup>3,4,5</sup>

---

Τα γαλακτώματα αποτελούν κολλοειδή συστήματα διασποράς τα οποία προκύπτουν από την ανάμιξη δύο μη αναμίξιμων υγρών. Η διάμετρος των σταγονιδίων είναι μεγαλύτερη των 500 nm.

Κατά τη δημιουργία του γαλακτώματος το ένα μέσο βρίσκεται διεσπαρμένο σε μορφή μικρότατων σφαιριδίων (ασυνεχής φάση) στη μάζα του άλλου μέσου (συνεχής φάση). Η διαφορά στους όρους γαλάκτωμα και κολλοειδές έγκειται στις φάσεις των δύο μη αναμίξιμων μέσων. Στο γαλάκτωμα τα δύο μέσα ανήκουν στην υγρή φάση. Εάν ένα έλαιο και νερό αναμιχθούν και αναταραχθούν ισχυρά, τα δύο υγρά διασπείρονται το ένα στη μάζα του άλλου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γαλακτώματος. Ένα τέτοιο γαλάκτωμα δεν είναι σταθερό, γιατί τα σταγονίδια της ασυνεχούς φάσης τείνουν να συσσωματωθούν, με αποτέλεσμα την καταστροφή του γαλακτώματος και το διαχωρισμό των δύο φάσεων. Συνήθως χρησιμοποιούνται τασιενεργές ουσίες ή συστατικά που ευνοούν ή και σταθεροποιούν τα γαλακτώματα, στην περίπτωση που τα δύο υλικά δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους (Εικόνα 1). Οι ουσίες αυτές ονομάζονται γαλακτωματοποιητές και αναλύονται στην ενότητα 1.6.3. Ο όρος του γαλακτωματοποιητή συχνά συναντάται και ως επιφανειοδραστική ουσία. Σε αυτές τις ουσίες ανήκουν πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, πολυσακχαρίτες ή μίγματα των παραπάνω (Garti 1997, Garti and Bisperink 1998, Garti and Benichou 2004).

Η διασπορά των μέσων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την επίδραση μηχανικής ή άλλης μορφής ενέργειας. Ο κύριος μηχανισμός που χρησιμοποιείται είναι η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης ή ταχύτητας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των γαλακτωμάτων αναλύονται στην ενότητα 1.8.



Εικόνα 1. (a) Δύο μη αναμίξιμα υγρά, όπως το έλαιο και το νερό, διαχωρίζονται σε ένα στρώμα που αποτελείται από το λιγότερο πυκνό συστατικό και σε ένα στρώμα του πιο πυκνού υγρού, με μία επίπεδη διεπιφάνεια.

(b) Μία τασιενεργή ουσία (γαλακτωματοποιητής), γενικώς διαλυτή στη συνεχή φάση, προσροφάται επιλεκτικά στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού και παίρνει τη θέση των μονομερών και των μικκυλίων στο διάλυμα. Σε αυτό το παράδειγμα, το επιφανειοδραστικό είναι διαλυτό στην υδατική φάση.

(c) Εφαρμόζεται στο σύστημα ανάδευση ή ομογενοποίηση, με αποτέλεσμα το έλαιο να διαχωρίζεται σε σταγονίδια που είναι επικαλυμμένα με το επιφανειοδραστικό συστατικό.

(d) Η τελική μορφή του γαλακτώματος κατά την αποθήκευση μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### 1.2.2 Ιδιότητες<sup>5,1</sup>

Οι βασικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων είναι:

1. Χαμηλή θερμοδυναμική σταθερότητα
2. Χαμηλή κινητική σταθερότητα
3. Αυξημένη θολότητα
4. Υψηλό ιξώδες

## 1.3 Μικρογαλακτώματα

---

### 1.3.1 Ορισμός <sup>7,8,3</sup>

---

Ο όρος μικρογαλάκτωμα αφορά ένα αυθόρμητα σχηματιζόμενο σύστημα, δύο μη αναμίξιμων υγρών, που περιέχουν κατάλληλες ποσότητες γαλακτωματοποιητών. Το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνεται από 10-100 nm.

### 1.3.2 Ιδιότητες <sup>7,4,5,9</sup>

---

Τα μικρογαλακτώματα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις ιδιότητές τους σε σχέση με τα γαλακτώματα:

1. Είναι θερμοδυναμικώς σταθερά συστήματα
2. Σχηματίζονται αυθόρμητα και είναι εύκολα στην παρασκευή τους, όμως απαιτούν μεγάλες ποσότητες γαλακτωματοποιητών (επιφανειοδραστικών ουσιών)
3. Αποτελούν οπτικά διαυγή μίγματα νερού, ελαίου και γαλακτωματοποιητών, λόγω της ασθενούς σκέδασης του φωτός
4. Εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα λόγω της χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας και της μικρής απαίτησης σε υλικά. Όλοι αυτοί οι λόγοι μειώνουν το κόστος παραγωγής και παρέχουν οικονομικά οφέλη για τις εφαρμογές τέτοιων συστημάτων.

## 1.4 Νανογαλακτώματα

---

### 1.4.1 Ορισμός <sup>5</sup>

---

Τα νανογαλακτώματα αποτελούνται από έλαιο, επιφανειοδραστικές ουσίες (γαλακτωματοποιητές) και νερό. Έχουν μικρά μεγέθη σταγονιδίων, που κυμαίνονται σε διάμετρο από 100 μέχρι 500 nm. Τα διαλύματα αυτά τείνουν να είναι είτε διαυγή είτε ελαφρώς θολά, ανάλογα πάντα με τη διάμετρο των σωματιδίων.

### 1.4.2 Ιδιότητες <sup>5,10</sup>

---

Τα νανογαλακτώματα παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες με τα μικρογαλακτώματα. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

1. Είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα
2. Παρασκευάζονται εύκολα
3. Διακρίνονται για το μικρό μέγεθος σταγονιδίων



4. Έχουν σχετικά υψηλή σταθερότητα
5. Είναι διαυγή διαλύματα

### 1.4.3 Γενικά <sup>5,10</sup>

Μία από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των νανογαλακτωμάτων και των μικρογαλακτωμάτων είναι στην ενσωμάτωση λιπόφιλων ή υδατοδιαλυτών δραστικών συστατικών σε υδατική ή λιπαρή βάση αντίστοιχα, στα τρόφιμα ή και στα ποτά. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα ενσωμάτωσης λιπόφιλων βιοδραστικών συστατικών σε ο/w νανογαλακτώματα.

Χαρακτηριστικό των νανογαλακτωμάτων είναι ότι αποτελούν διαυγή διαλύματα και κατά αυτόν τον τρόπο μπορούν να βρουν εφαρμογή σε ορισμένα εμπλουτισμένα νερά, αναψυκτικά, σάλτσες, και νπιπ.

Στον Πίνακα 1 αναφέρονται βασικά στοιχεία για τα νανογαλακτώματα και τα μικρογαλακτώματα.

Πίνακας 1. Στοιχεία σύγκρισης μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων

Χαρακτηριστικά	Νανογαλακτώματα	Μικρογαλακτώματα
<b>Εμφάνιση</b>	Διαφανή/ ημιδιαφανή με ελαφρώς μπλε χρώμα	Διαφανή
<b>Συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητών</b>	Χαμηλές (3-10% κ.β.)	Υψηλές (20% κ.β.)
<b>Μέθοδοι παρασκευής</b>	Μέθοδοι υψηλής και χαμηλής ενέργειας	Αυφόρμητη γαλακτωματοποίηση
<b>Σταθερότητα</b>	Κινητικά σταθερά/θερμοδυναμικά ασταθή	Θερμοδυναμικά σταθερά

Οι ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων τα καθιστούν ευρέως εφαρμόσιμα στον κλάδο των τροφίμων. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες δυσκολίες κατά την εφαρμογή τους.

Είναι δύσκολο να παρασκευασθούν νανογαλακτώματα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βρώσιμα έλαια, όπως ιχθυέλαια, αραβοσιτέλαιο ή σογιέλαιο. Πολλοί από τους γαλακτωματοποιητές είναι συνθετικοί, γεγονός που τους καθιστά ακατάλληλους προς εφαρμογή ή που επιτρέπεται μόνο να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η σύνθεση του δείγματος και οι συνθήκες παρασκευής όλων των γαλακτωμάτων, επιδρούν στη διαμόρφωση και τη σταθερότητά τους. Η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, από αλλαγές στην τιμή του pH και την ωρίμανση κατά Ostwald. Οι παράμετροι της σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων αναλύονται εκτενώς στην ενότητα 1.9.

Τα νανογαλακτώματα, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών. Στην περίπτωση των συστατικών που έχουν υψηλό σημείο τήξης υπάρχει δυσκολία στη διαλυτοποίησή τους.

### 1.5 Τύποι (o/w και w/o) <sup>1,15,21,22</sup>

---

Οι δύο κατηγορίες των γαλακτωμάτων, o/w ή w/o, εξαρτώνται από το είδος που θα αποτελεί τη συνεχή ή την ασυνεχή φάση. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε αυτά τα είδη.

Τα o/w γαλακτώματα χαρακτηρίζονται από τη ρευστή μορφή τους, καθώς το μεγαλύτερο μέρος είναι η υδατική φάση, ενώ το υπόλοιπο είναι οι κρυσταλλικές φάσεις ελαίου. Η παρουσία γαλακτωματοποιητών ή ουσιών που δρουν ως γαλακτωματοποιητές (π.χ. μόρια πρωτεΐνης) αυξάνει τη σταθερότητά τους, η οποία μπορεί να ξεπεράσει τον ένα μήνα. Οι σημαντικότεροι παράγοντες στα o/w γαλακτώματα είναι η κρυσταλλικότητα της λιπαρής φάσης και η παρουσία των γαλακτωματοποιητών στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Συγκεκριμένα η παρουσία των γαλακτωματοποιητών (ανάλογα και με το ποσοστό ενσωμάτωσής τους) αυξάνει το ιξώδες της υδατικής φάσης. Στα o/w γαλακτώματα η συνεχής φάση είναι το νερό, επομένως το ιξώδες τους έχει χαμηλές τιμές.

Σε αντίθεση με τα o/w γαλακτώματα, τα w/o έχουν αυξημένο ιξώδες. Η σταθερότητά τους εξαρτάται περισσότερο από τις ιδιότητες του ελαίου και του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται, από ότι από τις ιδιότητες της υδατικής φάσης. Ως εκ τούτου, ο βαθμός της μηχανικής σταθεροποίησης είναι πιο σημαντικός στα w/o γαλακτώματα από ότι στα o/w γαλακτώματα (Krog and Sparso 2004). Ωστόσο, σε ορισμένα συστήματα νερό-σε-έλαιο (w/o), όπως το βούτυρο, η συνεχής φάση είναι εν μέρει στερεό, γεγονός που βελτιώνει τη σταθερότητα (Robins and Wilde 2002).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πολλαπλά γαλακτώματα όπως έλαιο-σε-νερό-σε-έλαιο (o/w/o), νερό-σε-έλαιο-σε-νερό (w/o/w) και έλαιο-σε-νερό-σε-νερό (o/w/w). Τα εν λόγω γαλακτώματα παράγονται με ομογενοποίηση ενός γαλακτώματος w/o ή o/w αντίστοιχα σε κάποια συνεχή φάση, με την παρουσία κατάλληλων γαλακτωματοποιητών.

### 1.6 Συστατικά γαλακτωμάτων/τύπο γαλακτώματος

---

Τα κύρια συστατικά των γαλακτωμάτων είναι η υδατική φάση, η λιπαρή και οι γαλακτωματοποιητές.

#### 1.6.1 Λιπαρή φάση <sup>11,12,19</sup>

---

Η λιπαρή φάση των γαλακτωμάτων αποτελείται από διάφορα είδη ελαίων όπως ελαιόλαδο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, πυρηνέλαιο και άλλα πολλά. Τα λίπη και τα

έλαια ανήκουν σε μία ομάδα ενώσεων που είναι γνωστή ως λιπίδια. Τα λιπίδια, λόγω της έντονης υδροφοβικότητας που παρουσιάζουν, είναι διαλυτές ενώσεις σε οργανικούς διαλύτες και συνεπώς αδιάλυτες ή ελάχιστα διαλυτές στο νερό (McClements 2005). Η λιπαρή φάση στα γαλακτώματα τροφίμων βρίσκεται με τη μορφή τριγλυκεριδίων και μπορεί να προέρχεται από ζωικές ή φυτικές πηγές. Το έλαιο περιέχει επιπλέον μικρές ποσότητες από διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια, πολικά λιπίδια, και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων τα έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαλυτοποίηση των λιπόφιλων θρεπτικών συστατικών και να διευκολύνουν την πέψη τους από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η επιλογή του λιποδιαλυτού θρεπτικού συστατικού που θα ενσωματωθεί στο ο/ω νανογαλάκτωμα εξαρτάται άμεσα από την επιλογή του ελαίου.

### 1.6.2 Υδατική φάση <sup>11,19,21</sup>

---

Το μέγεθος των σταγονιδίων και η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων μπορεί να επηρεαστεί από τη φύση του υδατικού μέσου. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο pH και στην παρουσία ηλεκτρολυτών της υδατικής φάσης, κατά την διάρκεια της προετοιμασίας του νανογαλακτώματος.

Ο ρόλος της υδατικής φάσης είναι κυρίως ως διαλύτης για τα υδατοδιαλυτά συστατικά (άλατα, γαλακτωματοποιητές, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, κτλ.), είτε ως συνεχής φάση στην περίπτωση των ο/ω γαλακτωμάτων, είτε ως διεσπαρμένη φάση σε w/o γαλακτώματα. Το pH, η ιοντική ισχύς και η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή της υδατικής φάσης επηρεάζουν το σχηματισμό και τα φυσικά χαρακτηριστικά του γαλακτώματος, μεταβάλλοντας το μέγεθος των σταγονιδίων και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Robins and Wilde 2003).

### 1.6.3 Γαλακτωματοποιητές <sup>5,16,19</sup>

---

Οι γαλακτωματοποιητές αποτελούν απαραίτητο συστατικό των νανογαλακτωμάτων, καθώς αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη σταθερότητά τους. Υπάρχουν πολλά είδη γαλακτωματοποιητών και χωρίζονται στους φυσικούς και τους συνθετικούς. Ο γαλακτωματοποιητής μπορεί να είναι ένα τασιενεργό συστατικό, κατάλληλο για τρόφιμα, (όπως πολυσορβικά, εστέρες σακχάρων, λεκιθίνες, κτλ) ή κάποιο βιοπολυμερές (φυσικά κόμμεα, φυτικές ή ζωικές πρωτεΐνες, τροποποιημένα άμυλα, κτλ). Οι ιδιότητες των γαλακτωματοποιητών ελέγχουν το πάχος και το μέγεθος των σταγονιδίων, τη ρεολογία, το pH και την ιοντική ισχύ των νανογαλακτωμάτων (Chen et al., 2006). Η δράση των γαλακτωματοποιητών στηρίζεται στη δημιουργία ενός προστατευτικού στρώματος, γύρω από τη διεσπαρμένη φάση του γαλακτώματος.

Ορίζονται ως οι ουσίες που μειώνουν τη διεπιφανειακή τάση μεταξύ του ελαίου και του νερού ή του αέρα και του νερού, ενισχύοντας έτσι τη γαλακτωματοποίηση και

αυξάνοντας τη σταθερότητα του τελικού γαλακτώματος. Αυτή η μείωση της επιφανειακής τάσης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτωμάτων με μικρότερη μέση διάμετρο σωματιδίων. Κατά αυτόν τον τρόπο, επιβραδύνεται η κίνηση των σταγονιδίων μέσα στο γαλάκτωμα λόγω της βαρύτητας ή της κίνησης Brown. Για το φαινόμενο Brown θα γίνει αναφορά στην ενότητα 1.9 της αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων.

Η αποτελεσματικότητα ενός γαλακτωματοποιητή σχετίζεται κυρίως με τη διαλυτότητά του στη φάση του ελαίου ή του νερού. Η διαλυτότητα κάθε επιφανειακώς ενεργού παράγοντα χαρακτηρίζεται από την υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία του (HLB - Hydrophilic-Lipophilic-Balance). Οι τιμές ισορροπίας των γαλακτωματοποιητών κυμαίνονται από 1-20. Χαμηλές τιμές αντιστοιχούν σε πιο λιπόφιλους και υψηλές τιμές σε πιο υδρόφιλους γαλακτωματοποιητές. Μία προσεγγιστική εκτίμηση της τιμής HLB μπορεί να γίνει υπολογίζοντας τον αριθμητικό μέσο των τιμών των συστατικών. Για τη σωστή επιλογή ενός γαλακτωματοποιητή, εκτός από τη γνώση του δείκτη HLB, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και άλλοι παράγοντες, όπως η ενυδάτωση πολικών ομάδων και οι αλληλεπιδράσεις με τα άλλα συστατικά του τροφίμου (ιόντα, άλλα πολικά λιπίδια, πρωτεΐνες κτλ.), οι οποίοι συχνά αλλάζουν δραστικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτωματοποιητή. Έτσι δύο γαλακτωματοποιητικοί παράγοντες με την ίδια τιμή ισορροπίας δεν θα έχουν τις ίδιες λειτουργικές ιδιότητες. Επομένως η τιμή HLB αποτελεί ενδεικτικό παράγοντα, αφού δεν μπορεί να προβλεφθεί απολύτως η αποτελεσματικότητα των γαλακτωματοποιητών, αν αυτοί δεν δοκιμαστούν πρώτα πειραματικά. (Colquhoun and Hicks 1996, Visioli and Galli 2002).

#### 1.6.3.1 Υπολογισμός δείκτη HLB (τιμή ισοζυγίου υδροφιλίας-λιποφιλίας) <sup>12,15</sup>

Ένας γαλακτωματοποιητής με σχετικά ισχυρή λιπόφιλη ομάδα και μια ασθενή υδρόφιλη ομάδα διαλύεται κυρίως σε έλαιο και κατά προτίμηση σταθεροποιεί ένα w/o γαλάκτωμα και το αντίστροφο. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην ανάπτυξη διάφορων μεθόδων για τον υπολογισμό αυτής της τιμής.

Ο υπολογισμός του λόγου HLB γίνεται με τη χρήση μίας ημιεμπειρικής μεθόδου και χρησιμοποιείται ευρέως για την κατάταξη των γαλακτωματοποιητών. Κάθε γαλακτωματοποιητής έχει έναν αριθμό HLB, σύμφωνα με τη χημική του δομή. Υψηλή τιμή HLB αντιστοιχεί σε υψηλή αναλογία των υδρόφιλων ομάδων ως προς τις λιπόφιλες, ενώ μικρή τιμή HLB το αντίστροφο. Η αναλογία των υδρόφιλων ομάδων ως προς τις λιπόφιλες εισήχθη πρώτη φορά από τον Griffin για την εταιρεία Atlas Powder Company στην Αμερική. Σύμφωνα με τον Griffin, η θεωρία της HLB καθορίζει την ισορροπία μεταξύ υδρόφιλων και υδρόφοβων τμημάτων του επιφανειοδραστικού μορίου σε σχέση με την αντοχή και την αποτελεσματικότητά του, και μπορεί να οριστεί από τη σχέση :

$$HLB = 20 \frac{M_o}{M}$$

Όπου:

- $M_o$  είναι το μοριακό βάρος του υδρόφιλου τμήματος του μορίου του γαλακτωματοποιητή
- $M$  είναι το μοριακό βάρος.

Ένας άλλος τρόπος υπολογισμού, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, είναι μέσω της διηλεκτρικής σταθεράς ή από τη χρωματογραφική συμπεριφορά του γαλακτωματοποιητή. Η τιμή HLB των εστέρων λιπαρών οξέων με πολυ-υδροξυ αλκοόλες μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$HLB = 20\left(1 - \frac{SV}{AV}\right)$$

Όπου:

- $SV$ =αριθμός σαπωνοποίησης του γαλακτωματοποιητή (saponification number)
- $AV$ =τιμή οξύτητας (acid value) του διαχωρισμένου οξέος

Ο λόγος HLB ενός γαλακτωματοποιητή μπορεί να υπολογιστεί γνωρίζοντας τον αριθμό και τον τύπο των υδρόφιλων και λιπόφιλων ομάδων που περιέχει, ή μπορεί να εκτιμηθεί από πειραματικές μετρήσεις του σημείου θόλωσης (Shinoda and Friberg 1986). Οι τιμές πολλών γαλακτωματοποιητών σχετικά με το λόγο HLB έχουν ταξινομηθεί σε πίνακες. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος ημιεμπειρικός τρόπος για τον υπολογισμό του HLB είναι:

$$HLB = 7 + \sum \text{πλήθος υδρόφιλων ομάδων} - \sum \text{πλήθος λιπόφιλων ομάδων}$$

Με βάση την παραπάνω σχέση έχουν υπολογιστεί τιμές HLB για αρκετούς γαλακτωματοποιητές τροφίμων. Αν και φαινομενικά δεν φαίνεται η παραπάνω σχέση να έχει κάποια θερμοδυναμική βάση, στην πραγματικότητα έχει αποδειχθεί ότι η διαφορά των αθροισμάτων αντιστοιχεί στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των ομάδων, όταν σχηματίζεται το μικκύλιο.

Ο λόγος HLB δίνει μία χρήσιμη ένδειξη για τη διαλυτότητα του γαλακτωματοποιητή, είτε σε έλαιο, είτε σε νερό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί ο τύπος του γαλακτώματος που μπορεί να σταθεροποιήσει:

- Γαλακτωματοποιητές με χαμηλή τιμή HLB (3-6) είναι κατά κύριο λόγο υδρόφοβοι, διαλύονται εκλεκτικά σε έλαιο και σταθεροποιούν γαλακτώματα τύπου w/o, σχηματίζοντας αντίστροφα μικκύλια στο έλαιο.
- Γαλακτωματοποιητές με υψηλή τιμή HLB (10 -18) είναι κυρίως υδρόφιλοι, διαλύονται εκλεκτικά στο νερό και σταθεροποιούν γαλακτώματα τύπου o/w, σχηματίζοντας μικκύλια στο νερό.

- Γαλακτωματοποιητές με ενδιάμεσες τιμές HLB (7-9) δεν έχουν καμία ιδιαίτερη προτίμηση στο νερό ή στο έλαιο και θεωρούνται καλά «μέσα διαβροχής».
- Γαλακτωματοποιητές με τιμές HLB μικρότερες από 3 (πολύ υδρόφοβοι) και με τιμές μεγαλύτερες από 18 (πολύ υδρόφιλοι) δεν αναπτύσσουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικές ιδιότητες και δεν συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Η σταθερότητα του γαλακτώματος, όταν χρησιμοποιούνται τέτοιου είδους επιφανειοδραστικές ουσίες, είναι περιορισμένη.

Εμπειρικά έχει αναφερθεί πως η μέγιστη σταθερότητα γαλακτώματος επιτυγχάνεται για γαλακτώματα ο/w με τη χρήση γαλακτωματοποιητών με τιμή HLB περίπου 10-12, και για w/o γαλακτώματα περίπου 3-5.

### 1.6.3.2 Φυσικοί γαλακτωματοποιητές <sup>1,12,15</sup>

Στους φυσικούς γαλακτωματοποιητές ανήκουν:

#### Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες δρουν ως γαλακτωματοποιητές, λόγω των επιμέρους μοριακών δομών τους και παρέχουν πολλές χαρακτηριστικές ιδιότητες των τροφίμων στα γαλακτώματα (McClements 2005). Η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών είναι είτε να αυξήσει τη σταθερότητα του γαλακτώματος προς συνένωση ή κρεμοποίηση/καθίζηση των σταγονιδίων κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας αποθήκευσης (π.χ. ανασυσταμένο γάλα, σάλτσες για σαλάτες, κτλ.), είτε να προκαλέσει την αποσταθεροποίηση και την αύξηση κτυπήματος των γαλακτωμάτων που πρόκειται να εγκλείσουν αέρα (π.χ. μίγμα παγωτού, κρέμα γάλακτος, κρέμα για επικάλυψη, κτλ.) (Dickinson and Tanai 1992).

Οι πρωτεΐνες σχηματίζονται από αμινοξέα μέσω πεπτιδικών δεσμών. Είναι μεγάλα βιολογικά μόρια, ή μακρομόρια. Η δομή τους εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων που καθορίζει τη μοριακή τους διαμόρφωση. Όλες οι πρωτεΐνες στην αρχική τους κατάσταση διαθέτουν ειδικές τρισδιάστατες δομές, οι οποίες διατηρούνται σε μορφή διαλύματος, εκτός εάν υποβληθούν σε ακραίες συνθήκες, όπως η έντονη θέρμανση. Έχουν υδρόφιλα χαρακτηριστικά λόγω της παρουσίας του καρβοξυλίου ή της αμινομάδας στη δομή τους. Κατά συνέπεια, όταν προσροφώνται σε μία διεπιφάνεια ελαίου-νερού, είναι πολύ πιθανό ότι οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων τους θα διαπεράσουν στο περιβάλλον. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες διαθέτουν αμινοξέα με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες που θα απορροφηθούν από τη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Όταν μία πρωτεΐνη προσροφάται, η δομή της ίδιας της πρωτεΐνης θα αποτρέψει να έρθει σε επαφή με το περιβάλλον και ως αποτέλεσμα, η προσρόφηση της πρωτεΐνης θα μειώσει τη διεπιφανειακή τάση λιγότερο από ότι η προσρόφηση μικρών μορίων γαλακτωματοποιητών.

Αν και μερικές πρωτεΐνες είναι εξαιρετικοί γαλακτωματοποιητές, δεν μπορούν όλες οι πρωτεΐνες να απορροφηθούν έντονα από μία διεπιφάνεια ο/ω, επειδή οι πλευρικές τους αλυσίδες είναι ισχυρά υδρόφιλες ή επειδή έχουν άκαμπτες δομές που δεν επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να συνδεθεί με τη διεπιφάνεια. Η ζελατίνη δρα με αυτόν τον τρόπο λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της και λόγω της μεγάλης και ιδιαίτερα άκαμπτης δομής της. Η λυσοζύμη, αν και μπορεί να απορροφηθεί από τη διεπιφάνεια των σταγονιδίων, δεν είναι ένας καλός γαλακτωματοποιητής, πιθανότατα λόγω της σχετικά ανελαστικής δομής της.

### Λεκιθίνη (σόγια)

Η κύρια πηγή της λεκιθίνης, που είναι ο μόνος φυσικός γαλακτωματοποιητής που χρησιμοποιείται σε διάφορες ποσότητες στη βιομηχανία των τροφίμων, είναι η σόγια. Το ακατέργαστο σογιέλαιο περιέχει από 1 μέχρι και 30% φωσφολιπίδια. Άλλες όχι τόσο σημαντικές πηγές λεκιθίνης είναι το καλαμπόκι, ο βαμβακόσπορος, η ελαιοκράμβη και τα αυγά. Η λεκιθίνη ανακτάται με ενυδάτωση από το έλαιο της ελαιοκράμβης. Κατά την ενυδάτωση των φωσφολιπιδίων λαμβάνει χώρα διαχωρισμός φάσης, οπότε οι δύο φάσεις διαχωρίζονται μεταξύ τους με φυγοκέντρηση. Το ακατέργαστο προϊόν, μετά από την απομάκρυνση του νερού περιέχει περίπου 35% τριγλυκερίδια και ένα μικρότερο ποσοστό μη φωσφολιπιδικών υλικών. Η εξαγωγή με ακετόνη χρησιμοποιείται, προκειμένου να παραχθεί καθαρή λεκιθίνη χωρίς έλαιο. Ο όρος «λεκιθίνη» χρησιμοποιείται για να περιγράψει και τη φωσφατιδυλοχολίνη, και μίγματα φωσφολιπιδίων. Τα εμπορικά παρασκευάσματα λεκιθίνης μπορούν να επεξεργαστούν ή να τροποποιηθούν χημικά, ώστε να παραχθεί ένα προϊόν με διαφορετικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Η επεξεργασία με υπεροξειδίο του υδρογόνου προκαλεί τη δημιουργία πιο ανοιχτόχρωμου προϊόντος. Η χημική τροποποίηση της λεκιθίνης με αντίδραση με υπεροξειδίο του υδρογόνου ή γαλακτικό ή οξικό οξύ και νερό παράγει ένα υδροξυλιωμένο προϊόν. Η υδροξυλίωση συμβαίνει στους διπλούς δεσμούς, μετατρέποντας έτσι τη λεκιθίνη, ώστε να αυξάνεται ο υδρόφιλος χαρακτήρας της. Το αποτέλεσμα είναι ένα προϊόν με βελτιωμένες γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες σχετικά με τη μη- τροποποιημένη λεκιθίνη.

Τα τριγλυκερίδια είναι διαλυτά στην ακετόνη, όχι όμως τα φωσφολιπίδια. Έτσι, όσο πιο μεγάλο είναι το ποσοστό του μη διαλυτού υλικού στην ακετόνη, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των φωσφολιπιδίων στην ακατέργαστη λεκιθίνη. Εξαιτίας αυτού, ένα από τα κυριότερα κριτήρια αξιολόγησης της λεκιθίνης είναι το ποσοστό του μη διαλυτού στην ακετόνη υλικού. Η λεκιθίνη επίσης αξιολογείται βάσει διαφόρων παραγόντων, που περιλαμβάνουν το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων, το ποσοστό μη διαλυτού στο εξάνιο υλικού, το ποσοστό του νερού, τον αριθμό υπεροξειδίων και το περιεχόμενο μεταλλικών ιχνοστοιχείων. Οι γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες της ακατέργαστης και της τροποποιημένης λεκιθίνης μπορούν να

καθοριστούν βάσει μίας μεθόδου που έχει προταθεί από τον Von Pardun (1982). Αρχικά, δημιουργείται ένα γαλακτώμα χρησιμοποιώντας λεκιθίνη. Στη συνέχεια, αφού τοποθετηθεί κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες πίεσης, μετρείται ο χρόνος ημιζωής του σκευάσματος. Εναλλακτικά, ο ρυθμός διαχωρισμού των φάσεων, της συσσωμάτωσης, της αύξησης της κρεμώδους υφής του σκευάσματος και της συνάφειας μπορούν να υπολογιστούν βάσει οπτικής παρατήρησης σε συνδυασμό με τον υπολογισμό του μεγέθους των σταγονιδίων (Pinfield et al. 1997).

### *1.6.3.3 Συνθετικοί γαλακτωματοποιητές*<sup>1,12,14,15,17</sup>

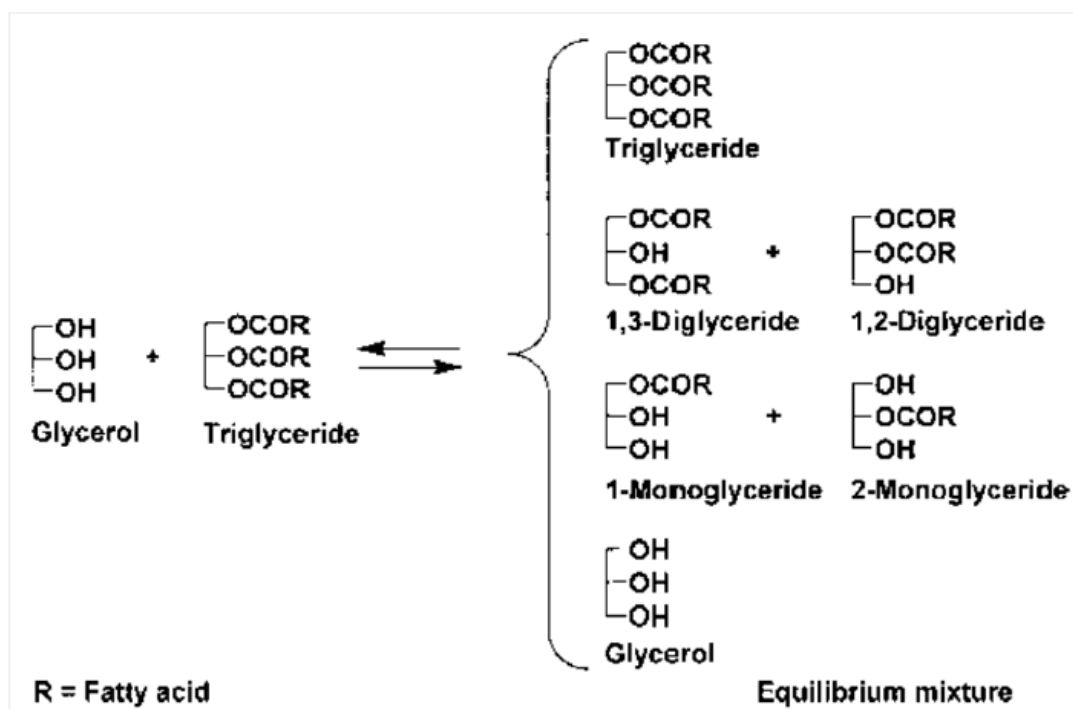
---

Το μεγαλύτερο ποσοστό των σύνθετων γαλακτωματοποιητών που παράγονται ετησίως (75%) αναλογεί στα μονο- και δι-γλυκερίδια και τα παράγωγά τους. Οι συνθετικοί γαλακτωματοποιητές περιέχουν και μία σειρά μη ιοντικών ενώσεων. Σε αντίθεση με τις ιοντικές ενώσεις, η διεπιφανειακή δραστηριότητα των μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών δεν είναι δυνατόν να μειωθεί λόγω σχηματισμού αλάτων με τα συστατικά των τροφίμων.

#### *Μονογλυκερίδια - Διγλυκερίδια*

Τα μονογλυκερίδια χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως γαλακτωματοποιητές γύρω στο 1930 με εφαρμογή στην παραγωγή μαργαρίνης. Τα μονογλυκερίδια παράγονται βιομηχανικά από αντιδράσεις εστεροποίησης βρώσιμων λιπών ή ελαίων με γλυκερίνη. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (200-260°C) με αλκαλική κατάλυση. Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στην εικόνα 2. Αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους γαλακτωματοποιητές. Τα μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια επίσης σχηματίζονται άμεσα από γλυκερόλη και λιπαρά οξέα κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Με μοριακή απόσταση είναι δυνατόν να παρασκευαστεί ένα καθαρό προϊόν που περιέχει το ανώτερο μέχρι 90% μονογλυκερίδια. Προκειμένου να χαρακτηριστούν οι εμπορικές πηγές μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων χρησιμοποιούνται διάφορες δοκιμές, όπως ο ολικός αριθμός μονογλυκεριδίων, ο βαθμός υδροξυλίων, ο αριθμός ιωδίου, και ο αριθμός σαπωνοποίησης (McClements and Decker 2000).





Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης γλυκερόλυσης

Η ενζυμική σύνθεση των μονογλυκεριδίων αποτελεί μέθοδο για την παραγωγή γαλακτωματοποιητών. Ωστόσο, η απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων από το μίγμα της αντίδρασης είναι ένα πρόβλημα για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα και η εμπορική παραγωγή των γαλακτωματοποιητών με βιοχημικές μεθόδους δεν χρησιμοποιείται συνήθως.

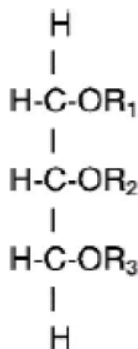
Πίνακας 2. Γαλακτωματοποιητές που προέρχονται από μίγματα μονο- και διγλυκεριδίων

Όνομα		Αριθμός Ευρωπαϊκής Ένωσης	Παραγωγή με μετατροπή μιγμάτων των μονο- και διγλυκεριδίων
Οξικό οξύ (ακετυλιωμένα μονο- και διγλυκερίδια)	Acetem	E 472a	Οξικός ανυδρίτης
Γαλακτικό οξύ	Lactem	E 472b	Γαλακτικό οξύ
Κιτρικό οξύ	Citrem	E 472c	Κιτρικό οξύ
Μονοακετυλο- και διακετυλοτρυγικό οξύ	Datem	E 472e	Τρυγικό οξύ και οξικός ανυδρίτης

### Υδροξυ - καρβοξυλικά και εστέρες λιπαρών οξέων

Προκειμένου να παραχθεί ένας γαλακτωματοποιητής με περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα σε σχέση με τα μονογλυκερίδια, εστεροποιούνται μικρά οργανικά οξέα σε μονογλυκερίδια. Μερικά από αυτά τα οξέα που χρησιμοποιούνται είναι το οξικό, το κιτρικό, το φουμαρικό και το τρυγικό. Τα μονογλυκερίδια συντίθενται από ανυδρίτη

ηλεκτρικού οξέος και χρησιμοποιούνται από την αρτοβιομηχανία. Οι εστέρες οξικού οξέος των μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων συντίθενται από λιπαρά οξέα μαζί με οξικό ανυδρίτη ή με μετεστεροποίηση. Το προϊόν είναι λιποδιαλυτό και αδιάλυτο στο νερό. Χρησιμοποιούνται συχνά σε μαγειρικά λίπη και σε μίγματα για κέικ (McClements and Decker 2000).



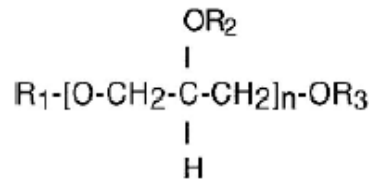
**Εικόνα 3. Εστέρες οργανικού οξέος μονογλυκεριδίων όπου τουλάχιστον ένα R είναι μικρή αλυσίδα οργανικού οξέος π.χ. οξικό οξύ.**

### Γαλακτυλιωμένοι εστέρες λιπαρών οξέων

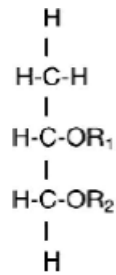
Οι πολυμερικοί εστέρες γαλακτικού οξέος μονογλυκεριδίων είναι γνωστοί ως στεαρολυ-2-γαλακτυλιωμένο νάτριο ή ασβέστιο. Τυπικά υπάρχουν δύο ομάδες γαλακτικών οξέων για κάθε μόριο γαλακτωματοποιητή. Για να παραχθεί ο γαλακτωματοποιητής, θερμαίνεται ένα μίγμα λιπαρών οξέων, πολυγαλακτικού οξέος και ανθρακικού νατρίου ή ασβεστίου περίπου στους 200°C για περίπου 1h, υπό ανάδευση, σε αδρανή ατμόσφαιρα. Το άλας ασβεστίου διαχέεται λιγότερο στο νερό από ότι το στεαρολυ-2-γαλακτυλιωμένο ασβέστιο (McClements and Decker 2000).

### Πολυγλυκερικοί εστέρες λιπαρών οξέων

Οι πολυγλυκερικοί εστέρες λιπαρών οξέων χρησιμοποιούνται, επίσης, στα προϊόντα τροφίμων, κυρίως στα ψημένα προϊόντα. Αποτελούνται από διάφορους μικτούς εστέρες που συντίθενται από την αντίδραση της πολυμερισμένης γλυκερόλης με τα εδάδιμα λιπαρά. Οι πολυγλυκερόλες ποικίλλουν ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού της γλυκερόλης. Η πηγή των λιπαρών οξέων καθώς και ο βαθμός πολυμερισμού ποικίλλει, παρέχοντας μία μεγάλη ποικιλία γαλακτωματοποιητών, από υδροφιλικούς μέχρι πολύ λιποφιλικούς (McClements and Decker 2000).



Εικόνα 4 Πολυγλυκερικοί εστέρες λιπαρών οξέων όπου τα R1, R2 και R3 είναι λιπαρά οξέα ή υδρογόνο και όπου η μέση τιμή του n είναι μεγαλύτερη του 1.



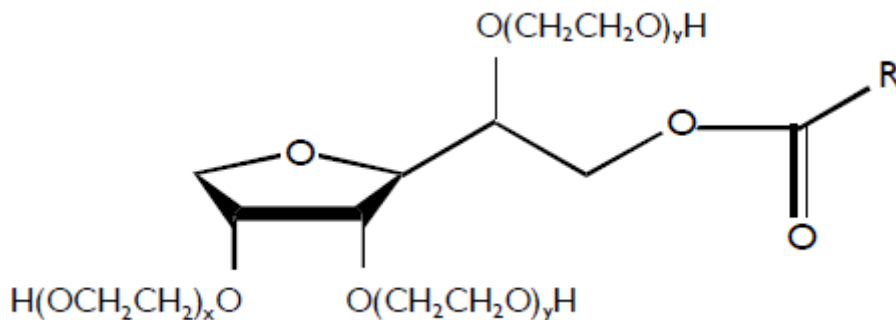
Εικόνα 5 Εστέρες προπυλενογλυκόλης λιπαρών οξέων όπου τα R1 και R3 είναι λιπαρά οξέα ή υδρογόνο και όπου τουλάχιστον ένα από τα R είναι λιπαρό οξύ.

### Εστέρες λιπαρών οξέων πολυαιθυλενικής ή προπυλενικής γλυκερόλης

Τα λιπαρά οξέα μπορούν να εστεροποιηθούν άμεσα προς αιθέρεις πολυαιθυλενικής γλυκόλης ή με ενζυμική διεργασία, επιτρέποντας μεγαλύτερο έλεγχο στην αντίδραση. Οι Shaw και Lo (1994) ανέφεραν την παραγωγή μονοεστέρων λιπαρών οξέων (C12, C14, C16, C18, και C18:1) προπυλενικής γλυκόλης από καταλυτικές αντιδράσεις λιπάσης. Οι μονοεστέρες προπυλενικής γλυκόλης, δωδεκαεξανοϊκού οξέος, και εικοσιπεντανοϊκού οξέος, οι οποίοι είναι γαλακτωματοποιητές τύπου νερό-σε-έλαιο και είναι πολύ χρήσιμοι στη βιομηχανία τροφίμων, συντέθηκαν από καταλυόμενη εστεροποίηση με λιπάση (McClements and Decker 2000).

### Αιθοξυλιωμένα παράγωγα μονογλυκεριδίων.

Αποτελούν τους γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Σε αυτούς κατονομάζονται οι Tween 20, Tween 40. Τα αιθοξυλιωμένα μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια παράγονται από την αντίδραση αρκετών moles αιθυλενικού οξειδίου και μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων κάτω από συνθήκες πίεσης. Η αιθοξυλίωση των μονογλυκεριδίων έχει ως αποτέλεσμα ένα προϊόν που είναι αρκετά πιο υδροφιλικό σε σχέση με τα μονογλυκερίδια (McClements and Decker 2000). Ανήκουν στην κατηγορία των μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών και προσφέρουν υψηλή σταθερότητα. Είναι σταθερά σε ήπια οξέα, αλκάλια και ηλεκτρολύτες και δεν αντιδρούν με ιοντικά συστατικά.



Εικόνα 6. Πολυαιθοξυλιωμένος μονοεστέρας, όπου R η αλκυλική ομάδα και x, y, z ο αριθμός των moles του αιθυλενικού οξέος

Οι γαλακτωματοποιητές Tween είναι εκ φύσεως υδρόφιλα και διαλύονται στο νερό ή και σε αραιά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Η διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα αυξάνεται με το βαθμό αιθοξυλίωσης. Για ένα σταθερό βαθμό αιθοξυλίωσης και εστεροποίησης, η υδατική διαλυτότητα μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των εστέρων και το μοριακό βάρος των λιπαρών οξέων. Ακολουθεί πίνακας με τις διαλυτότητες των Tween σε διάφορα εμπορικά έλαια και διαλύματα σε συγκέντρωση 10%w/w και στους 25°C .

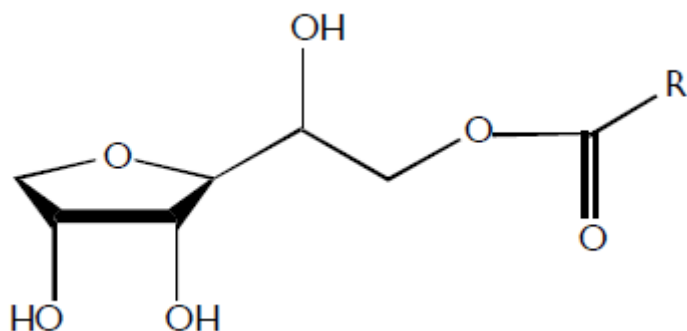
Πίνακας 3. Δεδομένα διαλυτότητας γαλακτωματοποιητών τύπου Tween.

Product Name	Water	Mineral Oil	Kerosene	Rapeseed oil	Methyl oleate	Butyle stearate
Tween 20	PS	I	I	I	I	I
Tween 40	S	I	I	I	I	I
Tween 60	PS	I	I	PS	I	I
Tween 65	G	PS	PS	I	S	I
Tween 80	S	I	I	PS	PS	I

S: διαλυτό, PS: σχεδόν διαλυτό, G: σχηματίζει πηκτή, I: αδιάλυτο

### Εστέρες σορβιτόλης με λιπαρά οξέα

Οι πολυαιθοξυλιωμένοι εστέρες σορβιτόλης παράγονται μέσω της προσθήκης αιθυλενικού οξειδίου, με πολυμερισμό, στους σορβικούς εστέρες λιπαρών οξέων. Αυτοί οι μη ιοντικοί υδρόφιλοι γαλακτωματοποιητές είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για τη σταθερότητα, και έτσι, χρησιμοποιούνται σε μεγάλο αριθμό προϊόντων αρτοποιίας. Αυτοί οι γαλακτωματοποιητές είναι γνωστοί ως πολυσορβικά (20, 60, 80). Τα πολυσορβικά (με συντομία αναφέρονται ως SPAN) 20, 60 και 80 χρησιμοποιούν λαυρικό, στεατικό και ελαϊκό, ανάλογα με την αναλογία των λιπαρών οξέων (McClements and Decker 2000).



Εικόνα 7. Μονοεστέρας σορβιτόλης. Με R συμβολίζεται η αλκυλική ομάδα του λιπαρού οξέος. Το μέγεθος της τιμής HLB μειώνεται, αυξάνοντας το βαθμό της εστεροποίησης, με αποτέλεσμα οι γαλακτωματοποιητές SPAN να γίνονται πιο διαλυτοί στα λιπαρά συστατικά.

Ακολουθεί πίνακας με δεδομένα διαλυτότητας των SPAN στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν και παραπάνω στους Tween.

Πίνακας 4. Δεδομένα διαλυτότητας γαλακτωματοποιητών τύπου SPAN

Product Name	Water	Mineral Oil	Kerosene	Rapeseed oil	Methyl oleate	Butyle stearate
Span 20	PS	S	S	PS	S	S
Span 40	PS	G	I	I	I	I
Span 60	PS	G	I	I	I	I
Span 80	PS	S	S	S	PS	PS
Span 83	PS	S	PS	S	PS	PS
Span 85	PS	S	S	S	S	S
Span 120	PS	S	PS	S	PS	PS

S: διαλυτό, PS: σχεδόν διαλυτό, G: σχηματίζει πηκτή, I: αδιάλυτο

Επιπλέον επισυνάπτεται πίνακας με τις τιμές HLB τόσο των SPAN όσο και των Tween γαλακτωματοποιητών.

Πίνακας 5. Τιμές HLB για γαλακτωματοποιητές SPAN, Tween

Product Name	HLB Value	Product Name	HLB Value
Span 20	8.6	Tween 20	16.7
Span 40	6.7	Tween 21	13.3
Span 60	4.7	Tween 40	15.6
Span 80	4.3	Tween 60	14.9
Span 83	3.7	Tween 61	9.6
Span 85	1.8	Tween 65	10.5
Span 120	4.7	Tween 80	15.0

Σημειώνεται πως αν συνδυαστούν αυτοί οι δύο γαλακτωματοποιητές σε διαφορετικές αναλογίες, μπορούν να δημιουργήσουν συστήματα που θα λαμβάνουν την επιθυμητή τιμή HLB, ώστε να δημιουργούν γαλακτώματα με τα περισσότερα έλαια. Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή μία συγκεκριμένη τιμή HLB, έστω X, οι ποσότητες των γαλακτωματοποιητών A και B υπολογίζονται από τις εξής σχέσεις:

$$\% (A) = \frac{(X - HLB_B) \times 100}{HLB_A - HLB_B}$$

$$\% (B) = 100 - \% (A)$$

### Ετερογενή παράγωγα

Τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται άμεσα σε άλλα συστατικά πέρα από τη γλυκερόλη. Για παράδειγμα αλκοόλες σακχάρων, όπως η σορβιτόλη, μανιτόλη και σε σάκχαρα, όπως η σακχαρόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη. Οι σορβικοί εστέρες ή η σορβιτόλη σχηματίζονται από 1,4-ανυδροσορβιτόλη και λιπαρά οξέα. Τυπικά ο γαλακτωματοποιητής αποτελείται από ένα μίγμα εστέρων στεατικού και παλμιτικού λιπαρού οξέος σορβιτόλης και τους μονο και δι-ανυδρίτες (McClements and Decker 2000).

## 1.7 Σχηματισμός-μηχανισμός

---

### 1.7.1 Παράγοντες σχηματισμού<sup>1,15</sup>

---

Για τα νανογαλακτώματα λόγω της σημαντικότητας που παρουσιάζουν στον τομέα των τροφίμων, αλλά και των φαρμάκων, είναι απαραίτητο να είναι γνωστοί οι μηχανισμοί με τους οποίους σχηματίζονται, ώστε να παραμένουν σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Για την παρασκευή ενός σταθερού γαλακτώματος με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτυγχάνεται το ίδιο αποτέλεσμα κάθε φορά που παρασκευάζεται, πρέπει να ελέγχεται αυστηρά ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων και να ακολουθούνται οι ίδιες συνθήκες παρασκευής του.

Παράγοντες σχηματισμού του νανογαλακτώματος:

- ✚ η επιλογή της κατάλληλης σύνθεσης του νανογαλακτώματος
- ✚ ο έλεγχος της σειράς προσθήκης των συστατικών και με συγκεκριμένο τρόπο (ποσότητα/ χρονικό διάστημα)
- ✚ η εφαρμογή κατάλληλης διάτμησης και τρόπου παρασκευής
- ✚ ο γαλακτωματοποιητής θα πρέπει να επιλέγεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτυγχάνεται πολύ χαμηλή διεπιφανειακή τάση και να μην σχηματίζονται κρυσταλλικές φάσεις με τη μορφή μικρογαλακτωμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η επιλογή των σωστών συστατικών στην παρασκευή του νανογαλακτώματος. Το είδος του γαλακτωματοποιητή και η συγκέντρωσή του στην υδατική φάση (εφόσον το γαλάκτωμα που μελετάται είναι ο/ω), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμπόδιση του σχηματισμού γαλακτώματος με κρυσταλλικές φάσεις. Ως επί το πλείστο, η περίσσεια γαλακτωματοποιητή επιτρέπει τη γρήγορη επικάλυψη των επιφανειών των σταγονιδίων που σχηματίζονται, αναστέλλοντας τα φαινόμενα συσσωμάτωσης που τείνουν να εκδηλωθούν μεταξύ των σταγονιδίων. Στόχος με την πάροδο του χρόνου, είναι να παρασκευάζονται το ίδιο αποτελεσματικά νανογαλακτώματα, με τη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή.

## 1.8 Παρασκευή-Τεχνολογία

---

Για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων είναι απαραίτητη η επιβολή διατμητικής δύναμης, ώστε να πραγματοποιηθεί η διάρρηξη των σωματιδίων. Ορισμένες συσκευές ανάμιξης κατορθώνουν να επιτύχουν υψηλούς ρυθμούς διάτμησης, όμως αυτό συμβαίνει κοντά στα «άκρα κοπής» (blade edges) και η ικανότητα μεταφοράς όλων των σταγονιδίων σε αυτή την περιοχή είναι σχετικά χαμηλή.

Ο σχηματισμός του γαλακτώματος προϋποθέτει ότι η ενέργεια που μεταφέρεται στο σύστημα ξεπερνά την αντίσταση από τη δημιουργία των νέων επιφανειών, η οποία προκύπτει από τη διεπιφανειακή τάση των συστατικών. Η παρασκευή γίνεται με την υποβολή και των δύο φάσεων (έλαιο και νερό) σε βίαιη ανατάραξη, με σκοπό τα μεγάλα σταγονίδια της εσωτερικής φάσης να ωθηθούν σε διάτμηση.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μπορούν να διαχωριστούν σε αυτές που απαιτούν υψηλά επίπεδα ενέργειας και σε αυτές που απαιτούν χαμηλά. Η πρώτη κατηγορία βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής μηχανικής ενέργειας, ώστε να αναμιχθούν οι δύο ξεχωριστές φάσεις ελαίου και νερού και να σχηματιστούν μικροσκοπικά σταγονίδια ελαίου. Με βάση την αρχή αυτή περιλαμβάνονται οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, οι συσκευές υπερήχων και οι συσκευές μικρορευστοποίησης. Το μέγεθος των σταγονιδίων εξαρτάται από πολλές μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένης της μεθόδου και των συνθηκών παραγωγής και των συστατικών του συστήματος. Τυπικά, το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται με την αύξηση της ενέργειας που εφαρμόζεται στο σύστημα, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει επαρκής ποσότητα γαλακτωματοποιητή είτε στη λιπαρή, είτε στην υδατική φάση.

Αντίθετα, οι μέθοδοι χαμηλής ενέργειας βασίζονται σε αλλαγές στο περιβάλλον ή στις συνθήκες του διαλύματος, με στόχο την ενίσχυση του αυθόρμητου σχηματισμού του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων. Η δυνατότητα να παράγεται νανογαλάκτωμα με τις μεθόδους χαμηλής ενέργειας συνδέεται στενά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτωματοποιητή και εξαρτάται από τον τύπο και την ποσότητά του. Οι

μέθοδοι αυτές γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς, επειδή μπορούν να δημιουργήσουν μικρά μεγέθη σωματιδίων και έχουν χαμηλότερο κόστος.

### 1.8.1 Μέθοδοι χαμηλής ενέργειας <sup>18,1,15,20</sup>

---

Στις μεθόδους χαμηλής ενέργειας, δεν παρέχεται καμία εξωτερική δύναμη, αντίθετα γίνεται χρήση των εγγενών φυσικών ιδιοτήτων του συστήματος για τη παραγωγή του νανογαλακτώματος. Αυτές βασίζονται στην αποθηκευμένη ενέργεια του συστήματος και τα νανογαλακτώματα παράγονται από μεταβολή των παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία και η σύνθεση του συστήματος.

#### 1.8.1.1 Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση (*spontaneous emulsification*)

---

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται απλή ανάμιξη, καθώς η μία φάση προστίθεται αργά στην άλλη, ώστε να σχηματιστεί αυθόρμητα το νανογαλακτώμα, π.χ. η οργανική φάση που περιέχει γαλακτωματοποιητή και έλαιο προστίθεται σε μία υδατική φάση που περιέχει νερό. Το τελικό γαλακτώμα προκύπτει καθορίζοντας πολλές μεταβλητές, όπως το ποια φάση προστίθεται στην άλλη, ποια είναι η σύνθεση των φάσεων και ποιες οι συνθήκες ανάμιξης, υπό τις οποίες θα γίνει η παρασκευή του γαλακτώματος (θερμοκρασία, pH και ρυθμός προσθήκης των φάσεων).

#### 1.8.1.2 Σημείο αναστροφής φάσης του γαλακτώματος (*emulsion inversion point-EIP*)

---

Η μέθοδος αυτή αλλάζει την αναλογία μεταξύ των φάσεων του ελαίου και του νερού, ενώ διατηρεί τις ιδιότητες του γαλακτωματοποιητή. Προστίθεται νερό σε ένα μίγμα ελαίου και υδατοδιαλυτού γαλακτωματοποιητή, υπό συνεχή ανάδευση. Καθώς προστίθενται ποσότητες του νερού, αρχικά σχηματίζεται ένα w/o γαλακτώμα, στη συνέχεια ένα o/w/o γαλακτώμα και τέλος ένα γαλακτώμα o/w. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρά εσωτερικά σταγονίδια του ελαίου μέσα στο o/w/o γαλακτώμα (που αργότερα γίνονται σταγονίδια ελαίου στο o/w γαλακτώμα) σχηματίζονται από αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση στο σύνορο ελαίου-νερού (Ostertag et al. 2012).

#### 1.8.1.3 Θερμοκρασία αναστροφής φάσης (*phase inversion temperature-PIT*)

---

Η μέθοδος PIT χρησιμοποιεί μεταβολές της θερμοκρασίας για να αλλάξει η διαλυτότητα ή η βέλτιστη καμπυλότητα (μοριακή γεωμετρία) των μη-ιοντικών γαλακτωματοποιητών, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται ένα γαλακτώμα o/w σε γαλακτώμα w/o ή και αντίστροφα. Τυπικά, ένα μίγμα γαλακτωματοποιητή, ελαίου και νερού με κατάλληλη σύνθεση, θερμαίνεται και στη συνέχεια ψύχεται γρήγορα υπό συνεχή ανάδευση, ώστε να σχηματιστεί το νανογαλακτώμα.



## 1.8.2 Μέθοδοι υψηλής ενέργειας <sup>11,1,16</sup>

---

Στις μεθόδους υψηλής ενέργειας, χρησιμοποιούνται μηχανικές συσκευές όπως ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας, υπέρηχοι, μικρορευστοποιητές και ομογενοποιητές υψηλής πίεσης, τα οποία παράγουν γαλακτώματα με μικρό μέγεθος σταγονιδίων.

### 1.8.2.1 Ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας

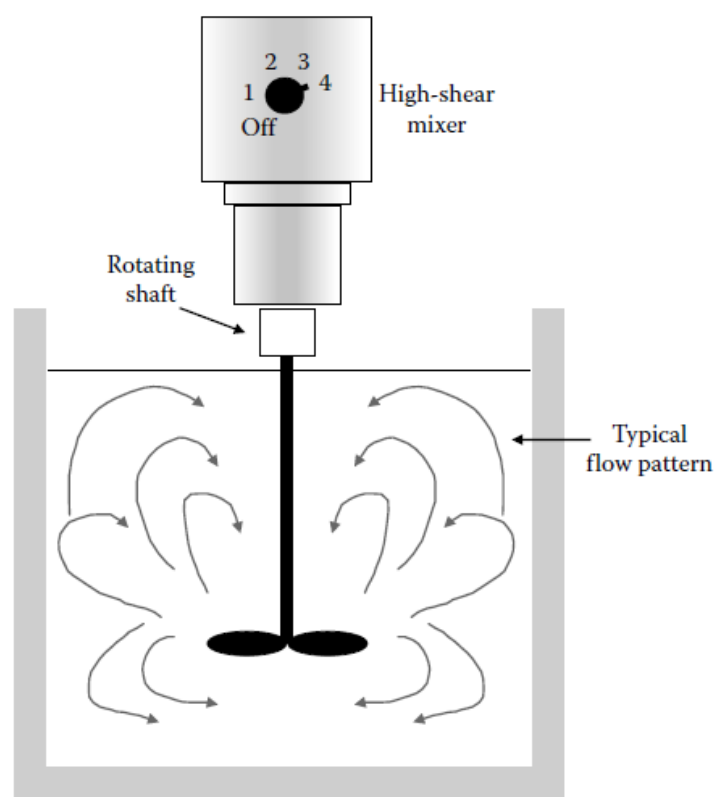
---

Μίξερ υψηλής διάτμησης ή αλλιώς ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την άμεση ομογενοποίηση του ελαίου και της υδατικής φάσης στη βιομηχανία τροφίμων (Urban et al. 2006, Hall et al. 2011, Singh and Heldman 2013). Αποτελεί μια ασυνεχή διεργασία ομογενοποίησης όπου το έλαιο, το νερό και άλλα συστατικά που πρέπει να ομογενοποιηθούν, τοποθετούνται σε ένα κατάλληλο δοχείο, το οποίο μπορεί να είναι χωρητικότητας από μερικά cm<sup>3</sup> (για εργαστηριακή χρήση) ή μέχρι αρκετά m<sup>3</sup> (για βιομηχανική χρήση). Στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύονται με μία κεφαλή ανάμιξης η οποία περιστρέφεται σε υψηλή ταχύτητα (τυπικά έως 3600 rpm). Υπάρχουν δύο τρόποι προσθήκης των συστατικών, είτε όλα μαζί κατά την έναρξη της διαδικασίας, είτε διαδοχικά για τη βελτίωση της διασποράς, αλλά και τη μείωση του χρόνου ομογενοποίησης. Η ταχεία περιστροφή της κεφαλής ανάμιξης παράγει ένα συνδυασμό από επιμήκεις, περιστροφικές και ακτινωτές κλίσεις ταχύτητας στα υγρά, οι οποίες διαταράσσουν τη διεπαφή μεταξύ του ελαίου και του νερού και διασπούν τα μεγαλύτερα σταγονίδια σε μικρότερα.

Η αποδοτική ομογενοποίηση επιτυγχάνεται, όταν το μίγμα είναι ομοιόμορφο σε όλο το δοχείο, και η διαδικασία αυτή μπορεί να διευκολυνθεί έχοντας διαφράγματα στερεωμένα στα εσωτερικά τοιχώματα του δοχείου. Η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης επίσης, εξαρτάται από το σχεδιασμό της κεφαλής ανάμιξης. Είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών τύπων αναδευτήρων, ανάλογα με τη διεργασία, όπως για παράδειγμα, πτερύγια, έλικες, και στρόβιλοι. Η αποτελεσματικότητα της ομογενοποίησης μπορεί επίσης να αυξηθεί με τη χρήση ενός δοχείου που περιστρέφεται σε μία κατεύθυνση και μίας κεφαλής ανάμιξης που περιστρέφεται σε αντίθετη κατεύθυνση.

Σε βιομηχανική κλίμακα, πολλές συσκευές ανάμιξης υψηλής διάτμησης είναι ικανές να λειτουργούν σε σειρά, έτσι ώστε να παράγεται συνεχώς προϊόν. Η τυπική απόδοση για τις συσκευές σε σειρά κυμαίνεται από μερικά λίτρα, έως μερικές εκατοντάδες L/h. Η ανάμιξη γενικά οδηγεί σε ελαφρά αύξηση της θερμοκρασίας του γαλακτώματος, διότι μέρος της μηχανικής ενέργειας μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω της ιξώδους διάχυσης. Εάν κάποιο από τα συστατικά στο γαλακτώμα είναι ευαίσθητο στη θερμότητα, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της θερμοκρασίας του δοχείου κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης.

Οι ομογενοποιητές υψηλής ταχύτητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την παρασκευή γαλακτωμάτων με χαμηλό ή μέτριο ιξώδες. Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται συνήθως, όταν ο χρόνος ομογενοποίησης ή η ταχύτητα περιστροφής της κεφαλής ανάμιξης αυξάνεται, έως ότου φτάσει σε ένα κατώτερο όριο το οποίο εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση των συστατικών που χρησιμοποιούνται και την πυκνότητα ισχύος του ομογενοποιητή. Τυπικά, τα σταγονίδια που παράγονται από έναν αναμικτήρα υψηλής ταχύτητας σε σειρά, έχουν διάμετρο μεταξύ 2-10 μm. Οι βιομηχανικοί ομογενοποιητές συχνά σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφεύγεται η υπερβολική ενσωμάτωση φυσαλίδων αέρα κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Ο εγκλωβισμός των φυσαλίδων αέρα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις σχετικά με την επεξεργασία και τις ιδιότητες πολλών γαλακτωμάτων.



**Εικόνα 8. Αναδευτήρες υψηλής ταχύτητας συχνά χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για να ομογενοποιούν απευθείας έλαια και υδατικές φάσεις**

#### *1.8.2.2 Ομογενοποιητές υψηλής πίεσης*

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων χρησιμοποιώντας διάφορες δυνάμεις, όπως η υδραυλική διάτμηση, ο έντονος στροβιλισμός και η σπηλαιώση. Σε αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιείται ομογενοποιητής υψηλής πίεσης και τα δύο υγρά μαζί με τους γαλακτωματοποιητές αναγκάζονται να περάσουν μέσα από ένα μικρό στόμιο σε υψηλή πίεση (500-5000 psi) για να παραχθεί το νανογαλάκτωμα. Αρχικά, το γαλάκτωμα σχηματίζεται με μεγάλο κλάσμα

όγκου διεσπαρμένης φάσης, το οποίο όμως μπορεί να αραιωθεί αργότερα. Το πρόβλημα της συνένωσης μπορεί να μειωθεί με την προσθήκη γαλακτωματοποιητών σε περίσσεια ποσότητα.

Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μία πολύ αποτελεσματική μέθοδος, που διατίθεται τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Το μειονέκτημά της είναι ότι καταναλώνει μεγάλη ποσότητα ενέργειας και θερμοκρασίας, που συνήθως αυξάνεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, με αποτέλεσμα την ενδεχόμενη αλλοίωση των συστατικών.

### 1.8.2.3 Μικρορευστοποίηση<sup>1,23</sup>

Η μικρορευστοποίηση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη και άκρως αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή νανογαλακτωμάτων (Lee & Norton, 2013; McClements, 2011). Οι συμβατικοί μικρορευστοποιητές συνήθως χρησιμοποιούν μία διαδικασία δύο σταδίων για την παραγωγή των νανογαλακτωμάτων:

- (i) αρχικά δημιουργείται ένα γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας ένα μίξερ υψηλής διάτμησης
- (ii) το γαλάκτωμα αυτό περνά μέσα από μικρορευστοποιητή για να μειωθεί το μέγεθος των σωματιδίων (Galooyak & Dabir, 2015; Håkansson et al., 2011; Mahdi Jafari, He, & Bhandari, 2006; McClements, 2015; Schultz, Wagner, Urban, & Ulrich, 2004).

Αυτό το είδος της ομογενοποίησης περιλαμβάνει μία είσοδο του ρευστού, αντλία πίεσης και ένα θάλαμο που περιέχει δύο κανάλια μέσω των οποίων τα υγρά ρέουν και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Τα υγρά εισάγονται στον ομογενοποιητή, επιταχύνονται εντός των καναλιών μέσω της αντλίας και προσκρούουν το ένα με το άλλο σε μία στερεή επιφάνεια. Όταν τα δύο ρεύματα ρευστών συγκρούονται μεταξύ τους δημιουργούνται έντονες διατμητικές δυνάμεις, οι οποίες προκαλούν την κατάτμηση των μεγαλύτερων σωματιδίων. Σε γενικές γραμμές, οι δυνάμεις αδράνειας σε τυρβώδη ροή, μαζί με το φαινόμενο της σπηλαιώσης είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για τη διάσπαση των σταγονιδίων στις συσκευές μικρορευστοποίησης. Η διάσπαση των σταγονιδίων σε στρωτή ροή είναι επίσης δυνατή, ειδικά όταν το γαλάκτωμα έχει υψηλό ιξώδες.

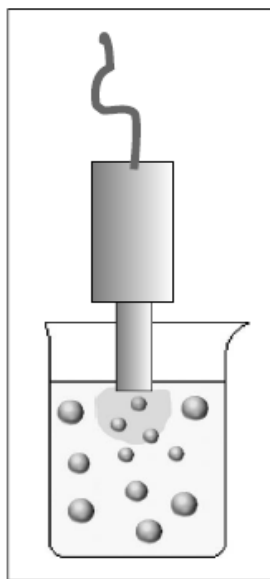
Οι συσκευές μικρορευστοποίησης είναι διαθέσιμες με μονή ή με διπλή είσοδο. Οι μικρορευστοποιητές με μονή είσοδο χρησιμοποιούνται για να μειώσουν το μέγεθος των σταγονιδίων σε ένα προϋπάρχον γαλάκτωμα, προκαλώντας διαφορετικές ποσότητες αυτού του γαλακτώματος να ρέουν μέσα από τα δύο διαφορετικά κανάλια. Οι μικρορευστοποιητές με διπλή είσοδο μπορούν να δημιουργήσουν

γαλακτώματα αναμιγνύοντας απευθείας την υδατική και τη λιπαρή φάση. (Panagiotou and Fisher 2008, Panagiotou et al. 2008, 2009).

Ο μικρορευστοποιητής είναι διαθέσιμος τόσο για μικρής κλίμακας εργαστηριακές εφαρμογές όσο και εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας. Ο ελάχιστος όγκος που μπορεί να παραχθεί με τη χρήση εργαστηριακής κλίμακας μικρορευστοποιητή είναι περίπου 10 mL, που είναι βολικός για την παρασκευή γαλακτωμάτων που χρησιμοποιούν συστατικά δαπανηρά ή που σπανίζουν. Ένας βιομηχανικής κλίμακας μικρορευστοποιητής λειτουργεί σε πιέσεις που ανέρχονται έως 275 MPa και μπορεί να παράγει έως 12.000 L/h γαλακτώματος. Παρόμοια μέγιστη πίεση λειτουργίας μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση εργαστηριακών μοντέλων, τα οποία να παράγουν γαλακτώματα με πολύ μικρά σταγονίδια, δηλαδή, μικρότερα από 0,1  $\mu\text{m}$ .

#### *1.8.2.4 Ομογενοποιητές υπερήχων*

Η εφαρμογή υπερήχων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παράγει κινητικά σταθερά νανογαλακτώματα. Η προετοιμασία των νανογαλακτωμάτων γίνεται με κοινές τεχνικές ανάμιξης, ώστε να είναι καθορισμένη η σύνθεση του γαλακτώματος. Με τη μέθοδο των υπερήχων, μία δονούμενη στερεή επιφάνεια (probe) αναδύει το νανογαλάκτωμα που έχει προετοιμαστεί, σε υψηλές συχνότητες, μεγαλύτερες από 18 KHz, με υψηλή ισχύ, προκαλώντας φαινόμενα έντονης διάτμησης στα σταγονίδια. Το κύριο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία αυτή είναι η σπηλαιώση. Τα έντονα κρουστικά κύματα που παράγονται στο περιβάλλον υγρό από τις καταρρέουσες φουσαλίδες, με την τοπική πίεση να αυξάνεται σε επίπεδα μέχρι 1.350 bar (Maa and Hsu. 1999), είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση των σταγονιδίων. Δεδομένου ότι το εκπεμπόμενο πεδίο ήχου είναι τυπικά ανομοιογενές, στα περισσότερα συστήματα, είναι αναγκαίο να επανακυκλοφορεί το γαλάκτωμα διαμέσου της περιοχής της υψηλής ισχύος, έτσι ώστε όλα τα σταγονίδια να υποστούν τον υψηλότερο ρυθμό διάτμησης. Επομένως ομοιόμορφες κατανομές μεγέθους των σταγονιδίων μπορούν να επιτευχθούν σε αραιές συγκεντρώσεις, εφόσον το γαλάκτωμα επανακυκλοφορεί πολλές φορές μέσα από την περιοχή υψηλής διάτμησης. Αυτή η μέθοδος παραγωγής γαλακτώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παρασκευή νανογαλακτωμάτων σε μικρή κλίμακα, αφού έχει μικρό κόστος, ωστόσο σε βιομηχανική κλίμακα οι εφαρμογές περιορίζονται σοβαρά από προβλήματα σχετικά με το θάλαμο επεξεργασίας και τις συσκευές υπερήχων.



**Εικόνα 9. Ομογενοποιητής υπερήχων**

#### *1.8.2.5 Μέθοδος αντικατάστασης διαλύματος (Solvent displacement method)*

Σε αυτή τη μέθοδο τα νανογαλακτώματα παράγονται σε θερμοκρασία δωματίου με την έκχυση της οργανικής φάσης που περιέχει έλαιο, διαλυμένο σε έναν διαλύτη όπως η ακετόνη ή η αιθανόλη, στην υδατική φάση που περιέχει γαλακτωματοποιητή. Η γαλακτωματοποίηση συμβαίνει αυθόρμητα με διάχυση του οργανικού διαλύτη, ο οποίος μπορεί να αφαιρεθεί αργότερα υπό εξάτμιση κενού. Μία υψηλή αναλογία του διαλύτη προς έλαιο είναι απαραίτητη για την προετοιμασία μικρού μεγέθους σταγονιδίων. Η μέθοδος αυτή περιέχει ένα παραπάνω στάδιο, αυτό που αφορά την απομάκρυνση του διαλύτη και για αυτό το λόγο κατατάσσεται στις μεθόδους υψηλής ενέργειας.

#### *1.8.2.6 Κολλοειδείς μύλοι*

Οι κολλοειδείς μύλοι χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για την ομογενοποίηση υγρών μεσαίου και υψηλού ιξώδους (Walstra 1983, Schubert 1997, Urban et al. 2006). Ένας κολλοειδής μύλος περιέχει συνήθως δύο δίσκους: ένα περιστρεφόμενο και ένα στατικό. Τα υγρά που πρέπει να ομογενοποιηθούν, συνήθως τροφοδοτούνται στο κέντρο του κολλοειδούς μύλου με τη μορφή ενός πρώιμου γαλακτώματος και όχι ως ξεχωριστές φάσεις, έλαιο και νερό, διότι η συσκευή είναι πολύ πιο αποτελεσματική σε μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων σε ένα προ-υπάρχον γαλάκτωμα (δευτεροβάθμια ομογενοποίηση), από ότι σε ομογενοποίηση δύο ξεχωριστών φάσεων (πρωτοβάθμια ομογενοποίηση). Το αρχικό γαλάκτωμα συνήθως παρασκευάζεται απευθείας από το έλαιο, το νερό και άλλα συστατικά χρησιμοποιώντας έναν αναδευτήρα. Η ταχεία περιστροφή του ρότορα μέσα στο μύλο κολλοειδούς παράγει μία διατμητική τάση στο διάκενο που προκαλεί τα μεγαλύτερα σταγονίδια να κατανέμονται σε μικρότερα, και δημιουργεί μία

φυγόκεντρο δύναμη, που προκαλεί το υγρό να κινηθεί από το κέντρο προς την περιφέρεια των δίσκων, όπου είτε συλλέγεται είτε διέρχεται μέσω ενός σωλήνα σε μία άλλη μονάδα.

Η διάσπαση των σταγονιδίων σε μικρότερα μπορεί επίσης να ενισχυθεί με την αύξηση του χρόνου που το γαλάκτωμα παραμένει στον κολλοειδή μύλο, ή με μείωση του ρυθμού ροής ή με το πέρασμα του γαλακτώματος αρκετές φορές μέσα από τη συσκευή. Τυπικά, ο ρυθμός ροής μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ περίπου 4 και 20 000 L/h, ανάλογα με τη μηχανική διάταξη που χρησιμοποιείται και τις συνθήκες λειτουργίας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί από τους παράγοντες που αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της μείωσης μεγέθους των σταγονιδίων, μπορούν να αυξήσουν το κόστος παραγωγής. Συνήθως είναι απαραίτητο να υπάρχει και κάποια μορφή συσκευής ψύξης, ως μέρος του κολλοειδούς μύλου.

Οι κολλοειδείς μύλοι είναι πιο κατάλληλοι για την ομογενοποίηση γαλακτωμάτων που θα έχουν από μέτριες μέχρι υψηλές τιμές ιξώδους (όπως το φυσικοβούτυρο, ψάρι, ή πάστες κρέατος) από βαλβίδα υψηλής πίεσης ή ομογενοποιητές υπερήχων. Τυπικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή γαλακτωμάτων με διάμετρο σταγονιδίων περίπου 1 και 5  $\mu\text{m}$ .

#### *1.8.2.7 Μεμβράνες (Membrane emulsification)*

---

Οι μεμβράνες γαλακτωματοποίησης βασίζονται στην ικανότητα της διεσπαρμένης φάσης να διεισδύει μέσα στη συνεχή φάση μέσω μίας μεμβράνης, η οποία έχει ομοιόμορφους πόρους με συγκεκριμένη κατανομή μεγέθους. Η διεσπαρμένη φάση πιέζεται κάθετα προς τη μεμβράνη, ενώ η συνεχής φάση ρέει εφαπτομενικά στη μεμβράνη (Calderon et al. 2007).

Οι μεμβράνες γαλακτωματοποίησης εξαρτώνται κυρίως από τις ιδιότητες της μεμβράνης (τη ροή και τη σύνθεση). Προκειμένου να ληφθεί ένα γαλάκτωμα μονοδιασποράς, οι πόροι της μεμβράνης θα πρέπει να έχουν στενή κατανομή μεγέθους. Στα περισσότερα συστήματα, το μέγεθος των σταγονιδίων είναι ανάλογο με το μέγεθος των πόρων. Ωστόσο, αν το μέγεθος των πόρων είναι πολύ μεγάλο, είναι πολύ πιθανό να προκύψει συνένωση των σταγόνων, αυξάνοντας έτσι την πολυδιασπορά του γαλακτώματος. Αντίθετα, αν το μέγεθος των πόρων είναι πολύ χαμηλό, ο ρυθμός παραγωγής του γαλακτώματος είναι ανεπαρκής (Calderon et al. 2007). Η ικανότητα γαλακτωματοποίησης των συστημάτων μεμβρανών εξαρτάται από την ταχύτητα φάσης και τη διεπιφανειακή τάση. Μικρότερα σταγονίδια θα προκύψουν εφαρμόζοντας υψηλή ταχύτητα στη συνεχή φάση και ταυτόχρονα πετυχαίνοντας χαμηλή διεπιφανειακή τάση (Calderon et al. 2007). Η αναγκαία πίεση που πρέπει να εφαρμοστεί στη διεσπαρμένη φάση εξαρτάται τόσο από τη διεπιφανειακή τάση όσο και από το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης (Calderon et al. 2007).

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο αξιοποιούνται οι μεμβράνες στην παραγωγή του γαλακτώματος, είναι με την παραγωγή ενός πρώιμου γαλακτώματος (π.χ., με απλή ανάδευση) και στη συνέχεια, για να μειωθεί το μέγεθος των σταγονιδίων του, περνά μέσω της μεμβράνης. Τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της προσέγγισης είναι ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες ροές και παράγονται πιο εύκολα γαλακτώματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις σταγονιδίων.

### 1.8.2.8 Ομογενοποιητές με μικροκανάλια

---

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ίδια λογική με τις μεμβράνες, με διαφορά ότι η διάσπαρτη φάση ωθείται μέσω μικροκαναλιών (καθορισμένης γεωμετρίας) για το σχηματισμό των σταγονιδίων (Neethirajan et al. 2011, Vladisavljevic et al. 2012). Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την παρασκευή γαλακτώματος, όπου τα σταγονίδια παρουσιάζουν στενή κατανομή μεγέθους σωματιδίων. Χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή μονοδιασπαρμένων ο/ω και w/o γαλακτωμάτων, αλλά και για την παραγωγή πολλαπλού τύπου γαλακτωμάτων (ο/w/o ή w/o/w) με ελεγχόμενο αριθμό των σταγονιδίων. Συνήθως για τα διπλά γαλακτώματα χρησιμοποιούνται ομοαξονικά, ομόκεντρα μικροκανάλια, για να ελέγχονται οι σχετικοί ρυθμοί ροής των διαφορετικών ρευστών που τα αποτελούν. Εντούτοις, ως διαδικασία κρίνεται ακατάλληλη για μεγάλης κλίμακας εμπορικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, επειδή είναι πολύ δαπανηρή και χρονοβόρα. Είναι κατάλληλη για πολύ εξειδικευμένες εμπορικές εφαρμογές ή για ερευνητικούς σκοπούς. Γαλακτώματα με μέσες διαμέτρους σταγονιδίων, τόσο χαμηλές όσο τα 300 nm, μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας αυτούς τους τύπους ομογενοποιητών, αλλά η μέθοδος αυτή κρίνεται πιο κατάλληλη για την παραγωγή μεγαλύτερων σταγονιδίων (1-100 μm).

### 1.8.3 Επιλογή κατάλληλης διαδικασίας<sup>1,15</sup>

---

Η αποδοτικότητα της ομογενοποίησης στο γαλάκτωμα μπορεί συχνά να βελτιωθεί με την αύξηση του κλάσματος όγκου της φάσης διασποράς του γαλακτώματος και στη συνέχεια αραιώση στην επιθυμητή συγκέντρωση σταγονιδίων. Αυτή η προσέγγιση είναι αποτελεσματική, επειδή το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που χάνεται κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης είναι λόγω της τριβής, η οποία είναι ανάλογη με το συνολικό όγκο του γαλακτώματος. Πειράματα έχουν δείξει ότι η ίδια διάμετρος σταγονιδίων μπορεί να επιτευχθεί με ένα ομογενοποιητή, εάν η αναλογία φάσης του γαλακτώματος και οι συνθήκες ομογενοποίησης διατηρούνται σταθερές. Ως εκ τούτου, η αύξηση του κλάσματος όγκου της φάσης διασποράς μειώνει τις συνολικές απώλειες τριβής που απαιτούνται για να παραχθεί το ίδιο μέγεθος σταγονιδίων.

Ακολούθως, η αποδοτικότητα μπορεί να βελτιωθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή, δεδομένου ότι αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση της

διεπιφανειακής τάσης και ταχύτερη προσρόφηση του γαλακτωματοποιητή. Έτσι διευκολύνεται η διάσπαση των σταγονιδίων και επιβραδύνεται η συνένωσή τους.

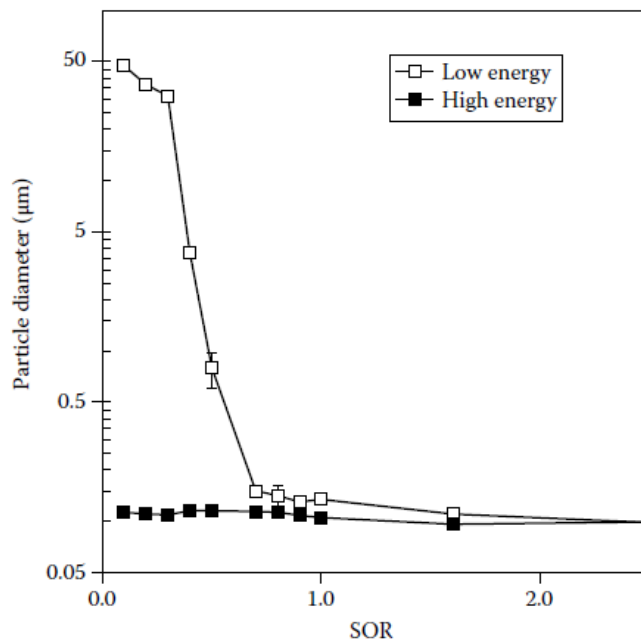
Τέλος η χρήση ενός συνδυασμού των διαφορετικών τεχνικών, ή χρησιμοποιώντας μία τεχνική σε διάφορες συνθήκες λειτουργίας οδηγεί σε αύξηση της αποδοτικότητας της ομογενοποίησης. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο ότι τα διαφορετικά είδη ροής, είναι περισσότερο ή λιγότερο αποδοτικά στη διάσπαση διαφορετικών μεγεθών σταγονιδίων. Για παράδειγμα, η παρασκευή ενός αρχικού γαλακτώματος χρησιμοποιώντας έναν αναμικτήρα υψηλής ταχύτητας και στη συνέχεια ομογενοποιητή υψηλής πίεσης είναι πιο ενεργειακά αποδοτικό και μειώνει αρκετά το μέγεθος των σταγονιδίων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μετά από αρκετές δοκιμές, οι κατάλληλες μέθοδοι για την παρασκευή των γαλακτωμάτων κρίθηκαν ο ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας και οι υπέρηχοι.

#### 1.8.4 Σύγκριση μεθόδων υψηλής και χαμηλής ενέργειας <sup>1,15</sup>

---

Τα κύρια πλεονεκτήματα των μεθόδων ομογενοποίησης χαμηλής ενέργειας είναι ότι είναι πολύ απλές στην εφαρμογή τους, δεν απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και μπορούν να παράγουν πολύ μικρά σταγονίδια γαλακτώματος (συχνά τόσο μικρά, όπου το γαλάκτωμα προκύπτει διαυγές). Τα κύρια μειονεκτήματα είναι ότι απαιτούν σχετικά υψηλές αναλογίες γαλακτωματοποιητή προς έλαιο και μπορούν προς το παρόν να χρησιμοποιηθούν μόνο με συνθετικούς γαλακτωματοποιητές και ορισμένους τύπους ελαίων (Kotaiiko και McClements 2015). Μία σύγκριση της επίδρασης του λόγου επιφανειοδραστικού προς έλαιο από το μέγεθος των σταγονιδίων που παράγονται με υψηλής ενέργειας (μικρορευστοποιητή) και χαμηλής ενέργειας (γαλάκτωμα αναστροφή φάσης) μεθόδους παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.





**Εικόνα 10.** Σύγκριση της επίδρασης της αναλογίας γαλακτωματοποιητή προς έλαιο από το μέγεθος των σταγονιδίων σε γαλακτώματα ο/ω που παράγονται από μέθοδο υψηλής ενέργειας (μικρορευστοποιητή) και μέθοδο χαμηλής ενέργειας (EPI, emulsion inversion point), χρησιμοποιώντας ένα μη ιοντικό γαλακτωματοποιητή. Η ελαιώδης φάση αποτελείται από MCT και βιταμίνης E οξικό οξύ (2: 8), και ο γαλακτωματοποιητής ήταν Tween 80.

SOR: surfactant-to-oil ratio

Και οι δύο μέθοδοι είναι ικανές να παράγουν πολύ μικρά σταγονίδια σε υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή, όμως μόνο η μέθοδος υψηλής ενέργειας είναι σε θέση να παράγει πολύ μικρά σταγονίδια σε χαμηλά επίπεδα γαλακτωματοποιητή.

### 1.9 Σταθερότητα-Αποσταθεροποίηση <sup>16,18</sup>

Δεδομένου ότι οι ξεχωριστές φάσεις ελαίου και νερού έχουν χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια από το γαλακτωματοποιημένο σύστημα, τα νανογαλακτώματα δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερά. Ωστόσο έχουν υψηλή κινητική σταθερότητα. Τα νανογαλακτώματα σε σχέση με τα γαλακτώματα είναι πιο ανθεκτικά στο βαρυτικό διαχωρισμό, στην κροκίδωση και στη συνένωση.

Το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων συμβάλλει σημαντικά στην σταθερότητά τους κατά των βαρυτικών φαινομένων διαχωρισμού. Αυτό συμβαίνει καθώς τα φαινόμενα κίνησης Brown (η τυχαία κίνηση των σωματιδίων, τα οποία αιωρούνται μέσα σε ένα ρευστό και συγκρούονται με τα άτομα ή μόρια που κινούνται γρήγορα στο ρευστό) τείνουν να κυριαρχήσουν έναντι των βαρυτικών δυνάμεων. Επιπλέον, στα νανογαλακτώματα τα σταγονίδια εμφανίζουν μικρότερη τάση συσσωμάτωσης από αυτά των γαλακτωμάτων, καθώς οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των σταγονιδίων είναι πιο ασθενείς. (McClements και Rao. 2011).

Επομένως, η υψηλή σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων στο διαχωρισμό λόγω της βαρύτητας μπορεί να αποδοθεί σε δύο λόγους:

- (i) στην ταχύτητα της δημιουργίας ιζήματος ή κρέμας που είναι ανάλογη με το τετράγωνο του μεγέθους των σωματιδίων
- (ii) στην κίνηση Brown που κυριαρχεί των βαρυτικών δυνάμεων για τα μικρά σταγονίδια.

Ωστόσο, η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων επηρεάζεται σοβαρά από τα φαινόμενα συνένωσης που οφείλονται στην ωρίμανση κατά Ostwald. Αυτό προκύπτει όταν στην παραγωγή του νανογαλακτώματος, ως φάση διασποράς, χρησιμοποιείται έλαιο με υψηλή διαλυτότητα στο νερό. Η ωρίμανση κατά Ostwald είναι η διεργασία μέσω της οποίας ένα σύνολο κρυστάλλων ή σταγονιδίων διαφόρων μεγεθών, μέσα σε ένα διάλυμα, καταλήγει στην κατάσταση όπου υπάρχουν πλέον μόνο κρύσταλλοι ενός συγκεκριμένου μεγέθους. Οι κρύσταλλοι μικρότερου μεγέθους διαλύονται, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση του διαλύματος, ενώ οι μεγαλύτεροι κρύσταλλοι με τη σειρά τους διευρύνουν το μέγεθός τους. Ωρίμανση Ostwald σε ο/ω νανογαλάκτωμα περιλαμβάνει τη διάχυση της ελαιώδους φάσης από μικρά σταγονίδια σε μεγαλύτερα, με αποτέλεσμα την αύξηση του μέσου μεγέθους των σταγονιδίων. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να μειωθεί αν επιλεγθεί έλαιο με μεγάλο γραμμομοριακό όγκο, αποτελούμενο από μακράς αλύσου τριγλυκερίδια. Η αύξηση του γραμμομοριακού όγκου ενός ελαίου οδηγεί σε γραμμική μείωση της διαλυτότητάς του σε νερό.

### 1.9.1 Προσδιορισμός της σταθερότητας των γαλακτωμάτων <sup>24,25</sup>

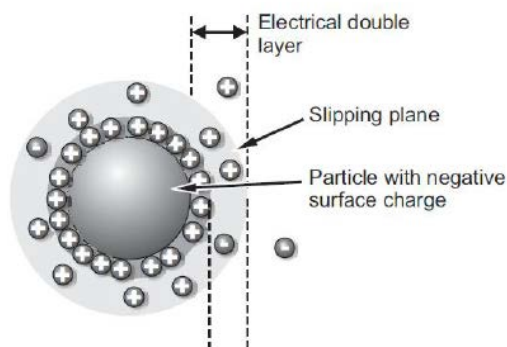
---

Εφόσον αναλύθηκε η σημαντικότητα της σταθερότητας στο νανογαλάκτωμα, θα πρέπει να γίνει αναφορά στις αναλύσεις που την προσδιορίζουν. Μερικές από αυτές αναφέρονται παρακάτω.

#### 1.9.1.1 *ζ-δυναμικό (Zeta-potential)*

---

Η μέτρηση του ζ-potential είναι μια τεχνική για τον προσδιορισμό του φορτίου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων σε κολλοειδή συστήματα. Τα νανοσωματίδια έχουν ένα επιφανειακό φορτίο, που προσελκύει ένα λεπτό στρώμα ιόντων αντίθετου φορτίου στην επιφάνειά τους. Αυτό το διπλό στρώμα ιόντων μεταφέρεται με το νανοσωματίδιο, καθώς αυτό διαχέεται σε όλο το διάλυμα. Το ηλεκτρικό δυναμικό στο όριο της διπλής στρώσης είναι γνωστό ως ζήτα δυναμικό των σωματιδίων και έχει τιμές που κυμαίνονται συνήθως από 100 mV έως -100 mV. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το διπλό στρώμα ιόντων που σχηματίζεται στο νανοσωματίδιο.



**Εικόνα 11. Διπλό στρώμα ιόντων γύρω από το νανοσωματίδιο**

Το μέγεθος του δυναμικού ζήτα είναι ενδεικτικό της σταθερότητας του γαλακτώματος. Νανοσωματίδια με τιμές ζήτα δυναμικού μεγαλύτερες από 25 mV ή μικρότερες από -25 mV, τυπικά έχουν υψηλή σταθερότητα.

#### *1.9.1.2 Μέση διάμετρος σωματιδίων και δείκτης πολυδιασποράς*

Η μέση διάμετρος των σωματιδίων χαρακτηρίζει το γαλάκτωμα ως προς την κατηγορία που ανήκει και είναι ενδεικτική της σταθερότητας του γαλακτώματος. Όσο πιο μικρή η διάμετρος του σωματιδίου, τόσο πιο σταθερό είναι και το γαλάκτωμα.

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα σταγονίδια διασπείρονται στη συνεχή φάση. Η τιμή του κυμαίνεται από 0-1. Χαμηλές τιμές του δείκτη PDI σημαίνει ότι το γαλάκτωμα είναι μονοδιασπαρμένο, άρα θα παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα, ενώ υψηλές τιμές PDI χαρακτηρίζουν τα πολυδιασπαρμένα νανογαλακτώματα με χαμηλή σταθερότητα αντίστοιχα.

Οι δύο αυτοί δείκτες προσδιορίζονται με κατάλληλο εξοπλισμό. Μηχανήματα που υπολογίζουν τη διάμετρο είναι το SEM, TEM

#### *1.9.1.3 Δείκτης ESI (emulsion stability index)*

Ο δείκτης αυτός μπορεί να προσδιοριστεί ογκομετρικά, μέσω οπτικής παρατήρησης του διαχωρισμού των φάσεων που συμβαίνει στα o/w και w/o γαλακτώματα (που βρίσκονται σε ογκομετρικούς σωλήνες) και υπολογίζεται από κατάλληλες σχέσεις ανάλογα τον τύπο του γαλακτώματος. Βασίζεται στην αποκορύφωση των λιπαρών (σχηματισμός κρέμας) που πραγματοποιείται κατά την αποθήκευση ενός γαλακτώματος. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τις εκατό και όσο πιο υψηλό είναι το ποσοστό αυτό, τόσο πιο υψηλή σταθερότητα έχει το γαλάκτωμα.

#### *1.9.1.4 Περαιτέρω αναλύσεις*

Υπάρχουν και άλλες αναλύσεις που είναι ενδεικτικές της σταθερότητας των γαλακτωμάτων, όπως το ιξώδες και το χρώμα. Οι ρεολογικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων γενικά καθορίζονται από τη μεταβολή του κλάσματος του όγκου των

δισπαρμμένων σταγονιδίων, την κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων και τις ενδοσταγονιδιακές δυνάμεις των πρόσθετων ουσιών. Η μελέτη του χρώματος των γαλακτωμάτων βοηθά στην κατανόηση της μικροδομής τους. Οι σχετικές αναλογίες του φωτός που μεταδίδονται και αντανακλώνται σε διαφορετικά μήκη κύματος εξαρτώνται από τη σκέδαση και την απορρόφησή του από το γαλάκτωμα. Η σκέδαση και η απορρόφηση του φωτός εξαρτάται από το μέγεθος, τη συγκέντρωση, το δείκτη διάθλασης και την κατανομή των σταγονιδίων.

Τέλος, σημαντική είναι και η μέτρηση της θολότητας των γαλακτωμάτων, η οποία όταν το γαλάκτωμα «σπάει» αυξάνεται. Ιδιαίτερα όταν ένα γαλάκτωμα είναι εξαρχής διαυγές, όπως το νανογαλάκτωμα, η παρατήρηση αυτή είναι εμφανής. Όσο μικρότερη είναι η θολότητα, τόσο μικρότερος είναι και ο δείκτης πολυδιασποράς, άρα το γαλάκτωμα εμφανίζει υψηλή σταθερότητα.

## Κεφάλαιο 2: Έλαια, βιοδραστικά συστατικά και ενσωμάτωσή τους

---

### 2.1 Ηλιέλαιο

---

#### 2.1.1 Εισαγωγή <sup>26</sup>

---

Το ηλιέλαιο είναι ένα από τα πιο δημοφιλή φυτικά έλαια και σε ορισμένες χώρες το προτιμούν από το σογιέλαιο, το βαμβακέλαιο και το φοινικέλαιο. Είναι ένα εδώδιμο έλαιο που παράγεται από τους σπόρους του φυτού ηλίανθος και πιο συγκεκριμένα της ποικιλίας *Helianthus annuus*. Δυστυχώς, καλλιεργείται μόνο σε περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές λόγω του εδάφους και των κλιματικών απαιτήσεων. Το ηλιέλαιο που προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο υφίσταται κατάλληλη επεξεργασία, έτσι ώστε να προκύψει ένα υψηλής ποιότητας προϊόν, διαυγές, με ξανθωπό χρώμα και ελαφρά γλυκιά γεύση, πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ελεύθερο από τοξικές ουσίες.



Εικόνα 12. Ηλίανθος και ηλιέλαιο

Είναι η τέταρτη μεγαλύτερη πηγή ελαίου στον κόσμο, μετά το σογιέλαιο, το φοινικέλαιο, και το έλαιο canola. Η ζήτηση για το ηλιέλαιο αυξήθηκε απότομα στα μέσα της δεκαετίας του 1980, όταν η μαργαρίνη με υψηλά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) θεωρήθηκε η καλύτερη μαργαρίνη για λόγους υγείας. Η ζήτηση για αυτό το αγαθό έχει μειωθεί από τότε και το ηλιέλαιο σήμερα αντιμετωπίζει σκληρό ανταγωνισμό, λόγω της μείωσης της τιμής του και του ανταγωνισμού από άλλες καλλιέργειες, όπως της σόγιας. Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί ηλιέλαιου παγκοσμίως σήμερα είναι η Ουκρανία, η Ρωσία και η Αργεντινή. Η Κεντρική Ευρώπη και οι χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης υποφέρουν από την έλλειψη χρηματοδότησης που θα τις βοηθούσε να δημιουργήσουν κατάλληλες γεωργικές συνθήκες και την κατάλληλη υποδομή για την ανάπτυξη του ηλίανθου. Το ηλιέλαιο που παράγεται σε αυτές τις περιοχές δεν έχει καλή απόδοση και είναι κατώτερης ποιότητας. Πρόσφατη έρευνα

στις ΗΠΑ έδειξε ότι μπορούν να παραχθούν συμβατικά βελτιωμένες ποικιλίες ηλιάνθου, που είναι ανθεκτικές σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη υβριδικών ηλιοτροπίων με σκοπό την αύξηση της παραγωγής του ηλιέλαιου.

### 2.1.2 Συστατικά <sup>12,26,27,28,29</sup>

Το παραδοσιακό ηλιέλαιο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ και χαμηλή σε ελαϊκό. Η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ ποικίλει σε ποσοστά περίπου 65-70%. Ακολούθως, υπάρχει ποικιλία ηλιέλαιου με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (μεγαλύτερη του 80% σε ελαϊκό και μόνο 5-9% σε λινελαϊκό οξύ) και ποικιλία με μέσες περιεκτικότητες σε ελαϊκό (55-75% ελαϊκό οξύ και 15-35% λινελαϊκό οξύ). Ο πίνακας 6 δείχνει την τυπική σύσταση των λιπαρών οξέων στους τρεις αυτούς τύπους ηλιέλαιου. Η οξειδωτική σταθερότητα, έχει μετρηθεί μέσω της μεθόδου ενεργού οξυγόνου (AOM) και οι τιμές της για τα δύο ηλιέλαια με μέση και υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ είναι υψηλότερες από την αντίστοιχη του εξευγενισμένου παραδοσιακού ηλιέλαιου.

**Πίνακας 6. Τυπική σύνθεση σε λιπαρά οξέα τριών τύπων του ηλιέλαιου (%)**

Fatty acid	Traditional	High-oleic	Mid-oleic
Total saturates	11–13	9–10	< 10
Oleic acid	20–30	80–90	55–75
Linoleic acid	60–70	5–9	15–35
Linolenic acid	< 1	< 1	< 1
AOM (h)	10–12	40–50	25–35
Approximate iodine value	128	79	108

Επιπρόσθετα, το ηλιέλαιο περιέχει μία σειρά από μικρο-συστατικά. Σε αυτά περιλαμβάνονται τοκοφερόλες, στερόλες και εστέρες στερολών, κηροί, φωσφολιπίδια, καροτενοειδή, χλωροφύλλη και ίχνη μετάλλων. Οι τοκοφερόλες είναι φυσικά αντιοξειδωτικά. Το ηλιέλαιο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε α-τοκοφερόλη, γεγονός που το καθιστά ανθεκτικό στη φωτο-οξείδωση. Αντίθετα, η γ-τοκοφερόλη, η οποία παρέχει οξειδωτική σταθερότητα έναντι της αυτο-οξείδωσης, βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Το παραδοσιακό ηλιέλαιο δεν είναι κατάλληλο για τηγάνισμα τροφίμων, διότι κατά τη διαδικασία του τηγανίσματος υφίσταται έντονη αυτοοξείδωση.

Οι στερόλες και εστέρες στερολών είναι επίσης φυσικά αντιοξειδωτικά. Η αντιοξειδωτική τους δράση είναι αποδεδειγμένη στον τομέα της ανθρώπινης διατροφής. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ιδιότητα στο έλαιο θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες.

Τα φωσφολιπίδια (επίσης γνωστά και ως φωσφατίδια) υπάρχουν σε όλους τους ελαιούχους σπόρους. Όπως οι τοκοφερόλες και οι εστέρες στερολών, οι ενώσεις αυτές είναι λιποδιαλυτές και βρίσκονται στο έλαιο μετά την εκχύλιση των σπόρων. Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι φωσφολιπιδίων:

- φωσφατιδυλοχολίνες
- φωσφατιδυλαιθανολαμίνες
- φωσφατιδυλινοσιτόλες
- φωσφατιδικά οξέα

Η βιομηχανία επεξεργασίας ελαίου χρησιμοποιεί φωσφόρο για τη μέτρηση των φωσφολιπιδίων, λόγω της ειδικής μοριακής σχέσης μεταξύ φωσφόρου και φωσφολιπιδίων. Προκειμένου να μειωθεί η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια του ηλιέλαιου χρησιμοποιούνται χημικές και φυσικές διεργασίες εξευγενισμού.

Οι κηροί βρίσκονται στους σπόρους του ηλιάνθου. Ο ρόλος τους είναι η προστασία της επιφάνειας των σπόρων από την αφυδάτωση και τις μολύνσεις από μικροοργανισμούς. Οι κηροί αφαιρούνται μαζί με τα έλαια, με εκχύλιση των μη αποφλοιωμένων σπόρων. Είναι λιποδιαλυτοί σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά κρυσταλλώνουν σε θερμοκρασία δωματίου, με συνέπεια να προκαλούν ανεπιθύμητο θόλωμα στο έλαιο. Συγκεκριμένα, κατά την εκχύλιση του ηλιέλαιου απομακρύνεται από το κέλυφος των σπόρων, σερυλο κεροτικός εστέρας (σερυλο αλκοόλη που εστεροποιείται με το κεροτικό οξύ,  $C_{25}H_{51}COOH$ ). Η περιεκτικότητα στους κηρούς μειώνεται με μετέπειτα εξειδικευμένη επεξεργασία, που ονομάζεται αποκήρωση.

Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά και προσδίδουν μία κοκκινωπή απόχρωση στο έλαιο, όμως το επίπεδό τους μειώνεται αισθητά στα στάδια του αποχρωματισμού και της απόσμησης κατά τη διαδικασία του εξευγενισμού.

Η χλωροφύλλη δεν αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στην καλλιέργεια ηλιάνθου, εκτός και αν γίνει συγκομιδή της καλλιέργειας πριν φτάσει σε πλήρως ώριμο στάδιο. Η χλωροφύλλη προσδίδει ένα αισθητά πράσινο χρώμα στο έλαιο, αν και αυτό απαλείφεται στη διαδικασία λεύκανσης.

Υπάρχουν κάποια ίχνη μετάλλων που απαντώνται εκ φύσεως στα περισσότερα φυτικά έλαια, όμως το ηλιέλαιο παραλαμβάνει επιπλέον σίδηρο κατά τη σύνθλιψη, λόγω της αντίδρασης μεταξύ του λιπαρού οξέος και του εξοπλισμού επεξεργασίας. Όλα τα ίχνη μετάλλων στο έλαιο μειώνονται με τη διαδικασία της λεύκανσης.

## 2.1.3 Χρήσεις

---

### 2.1.3.1 Γενικά <sup>30,31,32,33</sup>

---

Το ηλιέλαιο χρησιμοποιείται ωμό σε σαλάτες, σε σάλτσες για σαλάτες, στην παρασκευή μαγιονέζας και στην παρασκευή μαργαρίνης. Στη μαγειρική και στο τηγάνισμα χρησιμοποιείται το ηλιέλαιο που περιέχει υψηλά ποσοστά ελαϊκού οξέος, λόγω των λιγότερων πολικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά το τηγάνισμα. Μελέτες σχετικά με το σχηματισμό των πολικών ενώσεων στις θερμοκρασίες τηγανίσματος, έδειξαν ότι η παρουσία λινελαϊκού οξέος αυθόρμητα εμπλέκεται στο σχηματισμό των πολυμερών TAG (τριακυλογλυκερολών). Η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ εμποδίζει το σχηματισμό των πολικών ενώσεων, αρκεί το λινελαϊκό οξύ να βρίσκεται σε χαμηλά ποσοστά.

Τέλος το ηλιέλαιο έχει σημαντική χρήση και στη βιομηχανία για την παραγωγή χρωμάτων, πλαστικών και βερνικιών. Εφαρμογές του ηλιέλαιου υπάρχουν και στη σαπωνοποιία, αλλά και στη χρήση του ως λιπαντικό μέσο. Το χρησιμοποιημένο ηλιέλαιο (από τηγάνισμα), όπως και όλα τα χρησιμοποιούμενα σπορέλαια, ι μετά από κατάλληλη επεξεργασία αξιοποιούνται ως καύσιμο βιοντίζελ σε πετρελαιοκινητήρες εσωτερικής καύσης με σημαντικές προοπτικές εκτεταμένης χρήσης του στο μέλλον.

### 2.1.3.2 Στα γαλακτώματα <sup>34</sup>

---

Το ηλιέλαιο χρησιμοποιείται στα γαλακτώματα, όπως και κάθε άλλο έλαιο, για τη διαλυτοποίηση συγκεκριμένων γαλακτωματοποιητών, αλλά και την ενσωμάτωση λιποδιαλυτών ουσιών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία στόχος ήταν ο έλεγχος της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας του ηλιέλαιου και η δυνατότητα της ενσωμάτωσης σε αυτό ενός συγκεκριμένου ποσοστού λυκοπενίου. Το ηλιέλαιο περιέχει συστατικά που από μόνα τους μπορούν να λειτουργήσουν ως γαλακτωματοποιητές, όμως τις περισσότερες φορές κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη ενός σύνθετου γαλακτωματοποιητή, κυρίως στα ο/w γαλακτώματα, που η λιπαρή φάση βρίσκεται σε μικρό ποσοστό.

Τα σταγονίδια στα περισσότερα γαλακτώματα τροφίμων έχουν ηλεκτρικό φορτίο και συνεπώς, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της συνολικής σταθερότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Οι σταγόνες ελαίου σε ο/w γαλακτώματα που δεν περιέχουν γαλακτωματοποιητή, έχει αποδειχθεί ότι έχουν ένα ηλεκτρικό φορτίο που εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ. Εφαρμογές του ηλιέλαιου στα γαλακτώματα έχουν δείξει πως η τιμή του ζ-potential των σταγονιδίων του ελαίου, διεσπαρμένων σε υδατική φάση, ξεκινώντας από θετικές τιμές σε μικρό pH (<5), μειώνεται σε αρνητικές τιμές σε υψηλότερο pH (Hsu and Nacu 2003). Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στην



επιλεκτική προσρόφηση είτε του  $H_3O^+$  (για χαμηλά pH), είτε του  $OH^-$  (για υψηλά pH), από το νερό πάνω στις επιφάνειες σταγονιδίων.

Θεωρητικά, η προσθήκη ενός μη ιοντικού γαλακτωματοποιητή, θα αναμενόταν να μην εμφάνιζε ηλεκτρικό φορτίο στα σταγονίδια ελαίου. Σε αντίθεση με τις προσδοκίες, τα σταγονίδια ηλιέλαιου των γαλακτωμάτων που σταθεροποιούνται με μη ιοντικούς γαλακτωματοποιητές μπορούν να έχουν ηλεκτρικό φορτίο. Για παράδειγμα, σε γαλακτώματα ηλιέλαιου που έχουν σταθεροποιηθεί με γαλακτωματοποιητές Tween έχει αποδειχθεί ότι τα σταγονίδια έχουν θετικό φορτίο σε χαμηλό pH (<4) και αρνητικό φορτίο σε υψηλότερο pH (Hsu και Nacu 2003). Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι ακολουθούνται παρόμοιες τάσεις με αυτές του ηλεκτρικού φορτίου σταγονιδίων χωρίς γαλακτωματοποιητές. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι ότι στο ίδιο pH, το ηλεκτρικό φορτίο παρουσία μη ιοντικών γαλακτωματοποιητών τείνει να είναι πιο αρνητικό.

## 2.2 Πυρηνέλαιο

---

### 2.2.1 Εισαγωγή <sup>35,36,37,38,39</sup>

---

Το πυρηνέλαιο είναι έλαιο που προέρχεται από την επεξεργασία του. Τα απομένοντα υπολείμματα, μετά την παραλαβή του ελαίου από τον ελαιόκαρπο με συμπίεση ή με άλλο μηχανικό τρόπο, αποτελούν την πρώτη ύλη για τη παραλαβή του πυρηνέλαιου. Στα ελαιοτριβεία δεν είναι δυνατό να αφαιρεθεί το σύνολο του ελαιόλαδου που περιέχει η ελιά, για αυτό το λόγο ακολουθούνται άλλες τεχνικές για την ολοκληρωτική απομάκρυνση του ελαιόλαδου. Η διάθεση των παραπροϊόντων, χωρίς καμία επεξεργασία προκαλεί σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα και αυτός είναι ένας παραπάνω λόγος για την ανάγκη ανάκτησης του πυρηνέλαιου. Βέβαια, στην απόφαση αυτή οδηγούν και οικονομικοί λόγοι που σχετίζονται με την ποσότητα του ελαίου που περιέχεται στους ελαιόκαρπους.

Η περιεκτικότητα του ελαιοπυρήνα σε έλαιο εξαρτάται από την ποιότητα της πρώτης ύλης και την απόδοση της μεθόδου εξαγωγής του ελαίου.

Ο όρος πυρηνέλαιο δεν είναι απόλυτα ακριβής, διότι το έλαιο που λαμβάνεται από τους ελαιοπυρήνες αποτελείται κύρια από εκείνο που απομένει στο σαρκώδες μέρος της ελιάς και κατά ελάχιστα ποσά από αυτό που περιέχεται στον πυρήνα.



**Εικόνα 13. Πυρηνέλαιο**

Το πυρηνέλαιο είναι ένα έλαιο ελαφρύ, εύπεπτο και αγνό, κατάλληλο για μαγείρεμα, τηγάνισμα ή ωμό σε φρέσκιες σαλάτες.

Η ποιότητά του διαφοροποιείται από τα σπορέλαια, διότι διατηρεί τα βασικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα, η χημική του σύσταση το καθιστά πιο ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες τηγανίσματος σε σχέση με τα σπορέλαια.

Περίπου 35-40g/100 g επεξεργασμένων ελιών, απελευθερώνονται ως στερεά απόβλητα από τη βιομηχανία επεξεργασίας ελαιόλαδου. Η σύσταση αυτών των αποβλήτων είναι:

- Νερό
- Έλαιο
- Φλοιός ελιάς
- Πολτός ελιάς
- Πυρήνες ελιών (Akay, Kazan, Celiktas, & Yesil-Celiktas, 2015).

Η υπολειπόμενη περιεκτικότητα σε έλαιο του ελαιοπυρήνα είναι περίπου 4-15 g/100 g ξηρού βάρους, ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας της ελιάς και τη μέθοδο εξαγωγής (Akay, Kazan, Celiktas, & Yesil-Celiktas, 2015). Η περιεκτικότητα σε υγρασία του πυρηνέλαιου που εκχυλίζεται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το αν το σύστημα εκχύλισης που χρησιμοποιείται είναι δύο ή τριών φάσεων. Ωστόσο, η ξήρανση είναι απαραίτητη και στις δύο περιπτώσεις, επειδή γενικά το ακατέργαστο πυρηνέλαιο ανακτάται με εκχύλιση με διαλύτη μέσω της συμβατικής μεθόδου βιομηχανικής εξαγωγής ελαίου.

## 2.2.2 Χαρακτηριστικά και συστατικά <sup>35,40</sup>

Οι φυσικές σταθερές και η χημική σύσταση του πυρηνέλαιου δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτές του ελαιόλαδου, αρκεί το πυρηνέλαιο να έχει ληφθεί από πρόσφατους ελαιοπυρήνες.

Πίνακας 7. Φυσικές σταθερές και χημική σύσταση ελαιόλαδου και πυρηνέλαιου

Χαρακτηριστικά	Ελαιόλαδο	Πυρηνέλαιο
Ειδικό βάρος (15°C)	0,912-0,916	0,910-0,930
Δείκτης διάθλασης (40°C)	1,4605-1,4630	1,4636-1,4747
Αριθμός ιωδίου	80-88	77-90
Αριθμός σαπωνοποίησης	188-196	186-196
Τίτλος, °C	17-26	16-26
Ασαπωνοποίητο υλικό	Μέχρι 1,8	Μέχρι 2,3

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για το πυρηνέλαιο οφείλεται στα εν γένει βιοενεργά δευτερεύοντα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των ασαπωνοποίητων συστατικών (USM). Το ασαπωνοποίητο μέρος περιέχει σημαντικές ποσότητες από στερόλες, λιπαρές αλκοόλες, τοκοφερόλες, τριτερπενικές αλκοόλες και σκουαλένιο. Επιπλέον, δεδομένου ότι το ελαιόλαδο περιέχει μόνο το 2% του συνολικού περιεχόμενου σε φαινολικά του καρπού της ελιάς, ενώ το 98% παραμένει στο στερεό υπόλειμμα, το πυρηνέλαιο θεωρείται πλούσια πηγή φαινολικών ενώσεων. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις έχουν ένα ευρύ φάσμα από ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως βιοδραστικότητα και θρεπτικότητα. Επιπρόσθετα προτείνονται για τις λειτουργικές τους ιδιότητες, δηλαδή για την αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιελκώδη δράση και για τη δραστηριότητά τους έναντι της καταπολέμησης των όγκων (Aludatt, Alli, Ereifej, Alhamad, Al-Tawaha, & Rababah, 2010). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το πυρηνέλαιο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασαπωνοποίητα συστατικά από το ελαιόλαδο (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012) και είναι επίσης πιο πλούσιο σε μεμονωμένες στερόλες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό οξύ (Rodríguez, Lama, Rodríguez, Jimenez, Guillen, & Fernandez-Bolanos, 2008).

## 2.2.3 Εφαρμογές <sup>40,41</sup>

Το πυρηνέλαιο αποτελεί ένα φθινό έλαιο, που αν και θεωρείται υποδεέστερης ποιότητας από το ελαιόλαδο, διαθέτει ποικίλα θρεπτικά συστατικά. Σήμερα, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάκτηση πολύτιμων ενώσεων από το πυρηνέλαιο, όπως στερόλες, τοκοφερόλες, σκουαλένιο και την περαιτέρω χρήση τους ως πρόσθετα σε νέα προϊόντα για τα τρόφιμα και διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα.

Μία σημαντική εφαρμογή του πυρηνέλαιου είναι στην παραγωγή βιοντίζελ. Ειδικότερα στις χώρες της Μεσογείου, η ανανεώσιμη πρώτη ύλη και μία από τις

πιθανές πηγές για την παραγωγή βιοντίζελ, μπορεί να είναι το πυρηνέλαιο που εξάγεται από τα στερεά απόβλητα των ελαιοβιομηχανιών.

### 2.3 Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών στα νανογαλακτώματα <sup>42,43,44,45,46,47</sup>

---

Τα νανογαλακτώματα έχουν χρησιμοποιηθεί στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, ως συστήματα παροχής για την ενσωμάτωση, την προστασία και τον έλεγχο της απελευθέρωσης μεγάλης ποικιλίας βιοδραστικών συστατικών. Το μικρό μέγεθος των σωματιδίων παρέχει τόσο οφέλη όσο και προκλήσεις για τα νανογαλακτώματα.

Η βιοδιαθεσιμότητα των βιοενεργών συστατικών εγκλεισμένων σε μικρά σωματίδια είναι συνήθως μεγαλύτερη από εκείνη των μεγαλύτερων σωματιδίων και μπορεί να οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς. Τα μικρότερα σωματίδια έχουν μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια, που επιτρέπει την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού και ως εκ τούτου, την ταχύτερη πέψη των λιπιδίων. Τα μικρότερα σωματίδια μπορούν επίσης να διεισδύσουν στο στρώμα βλέννας που επικαλύπτει τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, αυξάνοντας έτσι το χρόνο για την πέψη και την απορρόφηση των λιπιδίων. (McClements and Li. 2010). Τέλος, τα μικρότερα μεγέθη σωματιδίων αυξάνουν τη διαλυτότητα των ενσωματωμένων λιπόφιλων συστατικών στην υδατική φάση.

Όλα τα παραπάνω αφορούν την ενσωμάτωση λιπόφιλων συστατικών. Οι μελέτες γύρω από την ενσωμάτωσή τους τελευταία έχουν αυξηθεί, γιατί είναι επιθυμητό η διάδοση των λιπόφιλων βιοδραστικών συστατικών να γίνεται σε μία πιο βρώσιμη μορφή. Αυτά τα λιπόφιλα συστατικά μπορεί να περιλαμβάνουν μία ποικιλία ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των βιοδραστικών λιπιδίων, αρωμάτων, αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών συστατικών και των φαρμάκων (du Plessis et al., 2014). Είναι καλύτερο για τα βιοδραστικά λιπίδια να γίνεται ο εγκλεισμός τους σε υγρή μορφή, γιατί έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη γευστικότητα και τη βιοδραστικότητά τους λόγω των διαφορετικών μοριακών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων (McClements et al., 2007).

Συνεπώς, οι διαφορετικές ιδιότητες του κάθε βιοδραστικού λιπιδίου θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για να παραχθεί το βέλτιστο προϊόν και αποτέλεσμα. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα λιπόφιλα βιοδραστικά συστατικά, όπως έχει πρόσφατα ερευνηθεί, είναι τα λιπαρά οξέα ( $\omega$ -3 λιπαρά οξέα, συζευγμένο λινελαϊκό οξύ, βουτυρικό οξύ), καροτενοειδή ( $\beta$ -καροτένιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη), αντιοξειδωτικά (τοκοφερόλες, φλαβονοειδή, πολυφαινόλες) και φυτοστερόλες (στιγμαστερόλη,  $\beta$ -σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη) (Bassaganya-Riera and Hontecillas, 2010, Puri et al., 2009, Pol and Patravale, 2009, Song et al., Leong et al., 2011).

## 2.3.1 Καροτενοειδή

### 2.3.1.1 Εισαγωγή <sup>48,49,50,51</sup>

Περισσότερα από 600 καροτενοειδή βρίσκονται στη φύση, περίπου 40 από αυτά υπάρχουν στη διατροφή του ανθρώπου, ενώ περίπου 20 έχουν ταυτοποιηθεί στο αίμα και τους ιστούς του ανθρώπου (Agarwal and Rao, 2000). Τα κυριότερα καροτενοειδή στη διατροφή και στο ανθρώπινο σώμα είναι το β-καροτένιο, α-καροτένιο, λυκοπένιο, α-κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, τα οποία αντιπροσωπεύουν πάνω από το 90% του συνόλου των καροτενοειδών (Gerster, 1997).



**Εικόνα 14. Το χρώμα πολλών λαχανικών, καρπών και φρούτων οφείλεται στη σχετικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε καροτενοειδείς ενώσεις.**

Τα καροτενοειδή είναι μία κατηγορία φυσικών χρωστικών, που είναι ευρέως γνωστά λόγω του πορτοκαλί-κόκκινου χρώματος που έχουν τρόφιμα όπως τα πορτοκάλια, οι ντομάτες και τα καρότα και το κίτρινο χρώμα πολλών λουλουδιών. Έχουν μελετηθεί για αρκετά χρόνια, λόγω των διαφορετικών ρόλων τους στη φωτοβιολογία, φωτοχημεία και φωτοθεραπείες. Οι ουσίες αυτές προστίθενται επίσης ως χρωστικές σε πολλά τρόφιμα, ποτά, και ζωοτροφές, είτε με τη μορφή φυσικών εκχυλισμάτων (π.χ. πάπρικα ή εκχυλίσματα κατιφέ), είτε ως καθαρές ενώσεις που παράγονται με χημική σύνθεση. (Kioikias *et al.*, 2009). Τα καροτενοειδή συχνά περιγράφονται ως προβιταμίνες Α, αφού αυτή η βιταμίνη είναι ένα προϊόν μεταβολισμού των καροτενοειδών. Η κατανομή των καροτενοειδών ανάμεσα στα διάφορα φυτά είναι τυχαία. Το β-καροτένιο είναι το πιο άφθονο σε φυλλώδη λαχανικά, αν και το χρώμα του καλύπτεται λόγω της συνύπαρξής του με τη χλωροφύλλη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το β-καροτένιο έχει την υψηλότερη δραστηριότητα βιταμίνης Α. Επίσης, παρούσες είναι ουσίες όπως η ζεαξανθίνη, το α-καροτένιο και άλλες, αλλά σε μικρές ποσότητες. Στην τομάτα, το λυκοπένιο είναι το κύριο καροτενοειδές, ενώ τα φρούτα περιέχουν διάφορες αναλογίες κρυπτοξανθίνης και λουτεΐνης. Επιπλέον, ορισμένα ζώα οφείλουν το χρώμα τους σε καροτενοειδή, ιδιαίτερα τα πουλιά (κίτρινα και κόκκινα φτερά) και τα ψάρια (σολομός), ενώ ο σχηματισμός συμπλέγματος με πρωτεΐνη μπορεί να τροποποιήσει το χρώμα τους σε μπλε ή πράσινο (Ribayamerchado *et al.*,

2000). Η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή διαφορετικών τροφίμων δίνεται στον πίνακα 8 (Kiokias, 2002).

**Πίνακας 8.** Carotenoid content of selected foods and vegetables (mg/100g) (Kiokias et al., 2002)

Food item	b-carotene	a-carotene	lutein	b-cryptoxanthin
Mustard greens, ckd	2.7	0	9900	0
Spinach, ckd	5500	0	12600	0
Broccoli, ckd	1300	1	1800	0
Carrots, ckd	9800	3700	260	0
Corn, yellow	51	50	780	0
Acorn squash	2400	110	1300	0
Mangoes, raw	1300	0	0	54
Papaya, raw	99	0	0	470
Cantaloupe raw	3000	35	0	0

ckd=cooked

### 2.3.1.2 Οφέλη στην υγεία <sup>52</sup>

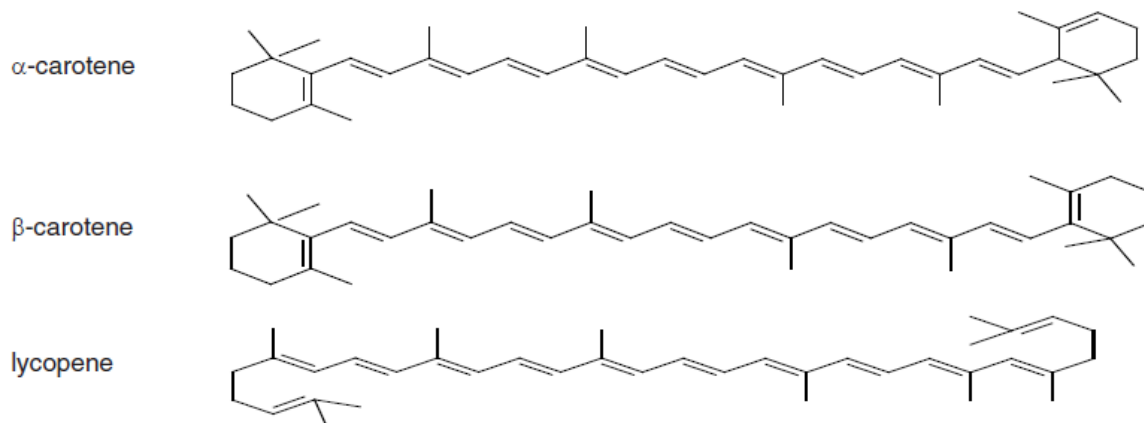
Τα καροτενοειδή εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση, τη θεμελιώδη αντίδραση της ζωής στον πλανήτη (Kritchevsky 1999; Kiokias et al., 2008<sup>a</sup>). Επιπλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι ορισμένα φυσικά καροτενοειδή (π.χ. λυκοπένιο, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη κτλ) έχουν αντιοξειδωτικές λειτουργίες που εμφανίζονται στη δράση κατά της οξείδωσης των λιπιδίων και στον προστατευτικό ρόλο απέναντι στην καθυστέρηση εκδήλωσης μίας χρόνιας νόσου (Krinsky 2001; Mares-Perlman et al., 2002).

Τα οφέλη των καροτενοειδών στη διατροφή έχουν εγείρει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την ενσωμάτωσή τους σε λειτουργικά τρόφιμα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η πρόληψη ενός αριθμού σοβαρών διαταραχών της υγείας όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και ο καταρράκτης (Kiokias & Gordon, 2004, Bowen et al., 2015; Bermudez et al., 2005; Pantavos et al., 2015).

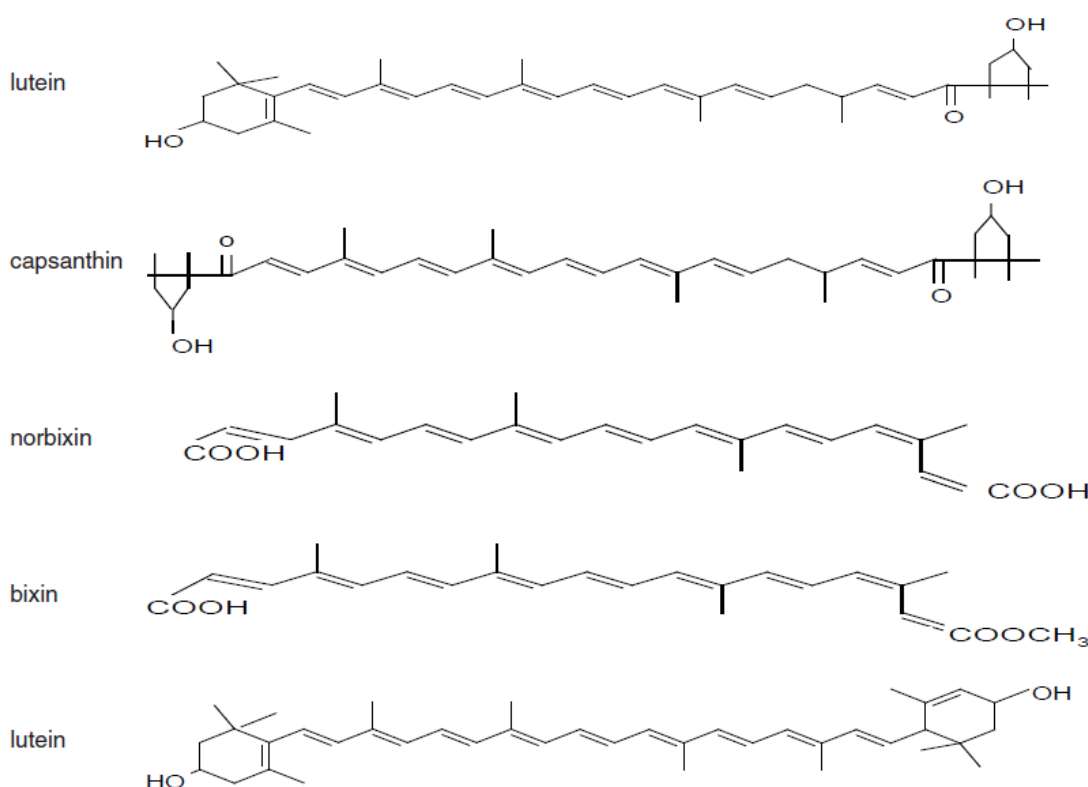
### 2.3.1.3 Δομή <sup>50,53</sup>

Τα περισσότερα καροτενοειδή είναι τερπενοειδή με 40 άτομα άνθρακα που έχουν ως βασική δομική μονάδα τους το ισοπρένιο (Khachik et al., 1997). Μία γενική υποδιαίρεση είναι σε:

- I. "Καροτένια", που είναι μόνο υδρογονάνθρακες (α- και β-καροτένιο, λυκοπένιο)
- II. "Ξανθοφύλλες" (λουτεΐνη, μπιξίνη, καψανθίνη κτλ), τα οποία περιέχουν πολικές ομάδες στα άκρα τους, που υποδηλώνει ένα οξειδωτικό βήμα κατά το σχηματισμό τους (Bohm et al., 1999).



Εικόνα 15. Καροτένια (υδρόφοβα καροτενοειδή), (Κιοκίας & Ορεοπουλου, 2006)



Εικόνα 16. Ξανθοφύλλες (πολικά καροτενοειδή), (Κιοκίας & Ορεοπουλου, 2006)

#### 2.3.1.4 Βιοδιαθεσιμότητα και απορρόφηση των καροτενοειδών μέσω της διατροφής<sup>50,54,55,56</sup>

Η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο κλάσμα των καροτενοειδών που έχει ληφθεί και είναι διαθέσιμο προς χρήση στις λειτουργίες ή προς αποθήκευση στον ανθρώπινο οργανισμό. Η απορρόφηση των καροτενοειδών προϋποθέτει τη διάσπαση της μήτρας του τροφίμου και την απελευθέρωσή τους. Ακολουθεί η διασπορά σε σωματίδια λιπιδίων γαλακτώματος, η διαλυτοποίηση σε μικτά μικκύλια χολικών αλάτων και η κίνησή τους κατά μήκος του μη αναδευόμενου στρώματος νερού δίπλα στις μικρολάχνες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η πρόσληψη των καροτενοειδών από κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και η ενσωμάτωσή τους

στις λεμφικές λιποπρωτεΐνες. Επομένως, για να λάβει χώρα η βέλτιστη απορρόφηση των καροτενοειδών θα πρέπει να πληρούνται τα εξής:

- i) επαρκής πέψη της μήτρας του τροφίμου για να απελευθερωθούν τα καροτενοειδή
- ii) σχηματισμός λιπιδικών μικκυλίων στο λεπτό έντερο
- iii) πρόσληψη των καροτενοειδών από κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου,
- iv) μεταφορά των καροτενοειδών ή των μεταβολικών προϊόντων τους στο λεμφικό σύστημα (Berni et al., 2015).

Η απορρόφηση πραγματοποιείται μέσω παθητικής διάχυσης και τα καροτενοειδή ακολουθούν το μεταβολισμό των χυλομικρών. Παραλαμβάνονται από το ήπαρ και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος σε λιποπρωτεΐνες (Faure et al., 1999).

Οι μελέτες της βιοδιαθεσιμότητας που χρησιμοποιούν ως μοντέλο τον ανθρώπινο οργανισμό (in vivo) είναι ιδιαίτερα δύσκολες και πολύπλοκες, χρονοβόρες και αρκετά δαπανηρές. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί in vitro μέθοδοι για την έρευνα της σχετικής βιοδιαθεσιμότητας των καροτενοειδών, λόγω της καλής επαναληψιμότητας που παρουσιάζουν, του χαμηλού κόστους, της γρήγορης εκτέλεσης και απλής διαδικασίας. Η αναλογία που δείχνει τα καροτενοειδή που πέρασαν από την τροφή στο μικκύλιο, έχει θεωρηθεί ως ένας από τις πιο βασικούς δείκτες της βιοδιαθεσιμότητας των καροτενοειδών στις in vitro μελέτες. (Ο' Sullivan, Ryan, Aherme, & OBrien, 2008).

Η βιοδιαθεσιμότητα των καροτενοειδών επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους που έχουν να κάνουν με τη δομή των καροτενοειδών, τη φύση της μήτρας του τροφίμου, την ενδοκυτταρική θέση του καροτενοειδούς, το μέγεθος των σωματιδίων του τροφίμου, τη μέθοδο παρασκευής ή μεταποίησης του τροφίμου, την αλληλεπίδραση με άλλα καροτενοειδή και την πρόσληψη άλλων συστατικών του τροφίμου (Yeum & Russell, 2002; Yonekura & Nagao, 2007; Zariqheh & Erdman, 2002). Έχει διαπιστωθεί ότι ο συνδυασμός της εκτεταμένης ομογενοποίησης και της θερμικής επεξεργασίας μπορεί να αυξήσει τη βιοδιαθεσιμότητα των καροτενοειδών (Svelander, Tibäck, et al., 2009).

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα των καροτενοειδών αυξάνεται κατά την ενσωμάτωσή τους σε νανογαλακτώματα, τα οποία με τη σειρά τους θα χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή ενός τροφίμου, είτε θα ενσωματωθούν σε αυτό. Εκεί η πορεία τους μετράται μέσω της οξειδωσής τους με το χρόνο ή με άλλες μεθόδους που αναλύονται στην επόμενη ενότητα.



### 2.3.1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού <sup>50,51,57,58,59,60</sup>

Παλαιότερα, η κλασική μέθοδος ανάλυσης των καροτενοειδών χρωστικών περιλάμβανε τη χρωματογραφία στήλης, χρωματογραφία χάρτου και TLC (Philip & Chen, 1988). Τα εκχυλίσματα καροτενοειδών από φυσικές πηγές, συνήθως σαπωνοποιούνται για την απομάκρυνση χλωροφυλλών και ανεπιθύμητων λιπιδίων και για την υδρόλυση εστέρων καροτένιου (Khachik & Beecher, 1988). Οι οργανικοί διαλύτες εκχυλίζουν τα καροτενοειδή, ενώ τα λιπαρά οξέα που καθιζάνουν ως σάπωνες και η γλυκερόλη διατηρούνται στην υδατική φάση.

Πλέον, η αναλυτική μέθοδος για την επιλογή του διαχωρισμού, της ποσοτικοποίησης και του δομικού χαρακτηρισμού των φυσικά απαντώμενων και συνθετικών καροτενοειδών, καθώς και για τα πιο σημαντικά μεταβολικά προϊόντα τους, είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Rodriguez-Amaya, 2015). Ορισμένες έρευνες (Kiokias & Gordon 2003; Kiokias & Oreopoulou 2006) επικεντρώθηκαν στην ανάλυση των φυσικών εκχυλισμάτων, μέσω Reversed Phase HPLC για τον προσδιορισμό των περιεχόμενων χρωστικών ουσιών.

Στα τρόφιμα εφαρμόζεται ευρέως η ανάλυση φασματομετρίας για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των καροτενοειδών, μετά την απομάκρυνση των ουσιών που παρεμβάλλονται στην υγρή χρωματογραφία. Η συνολική περιεκτικότητα των καροτενοειδών συγκεκριμένων φυσικών εκχυλισμάτων (πάπρικα, annatto, κατιφέ κτλ) έχει προσδιοριστεί με φασματοσκοπία ορατού, μετρώντας τη συνολική απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Οι τιμές της απορρόφησης αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Kiokias et al., 2009). Οι τιμές  $L_{max}$  των κύριων φυσικών καροτενοειδών (σε η-εξάνιο, διαλύτη), με τις απορροφήσεις τους επισυνάπτονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Κοινά φυσικά εκχυλίσματα καροτενοειδών (Kiokias, 2002)

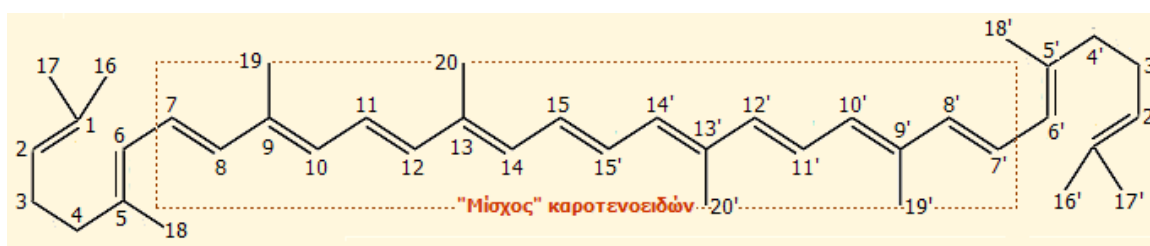
Natural extract	Natural plant source	Main carotenoids ( $L_{max}$ values in nm)
Carotenes	Carrot root, palm oil	a-b, Carotenes (446-450)
Lycopene extract	Tomatoes	Lycopene (472), a,b-carotene
Xanthophylls	Marigold flowers ( <i>Tagetes Erecta</i> )	Lutein, lutein esters and Zeaxanthin (450)
Paprika extract	<i>Capsicum annum</i>	Capsanthin (450), capsorubin (445)
Annatto	<i>Bixa Orellana</i>	Norbixin, Bixin (456)

### 2.3.1.6 Λυκοπένιο <sup>49,50,61,62</sup>

Το απλούστερο καροτένιο είναι το λυκοπένιο, από το οποίο προέρχονται μέσω κυκλοποίησης στο τέλος της αλυσίδας, το α και β-καροτένιο (Faure et al., 1999).

Το λυκοπένιο είναι μία φυσική χρωστική ουσία που συντίθεται από τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, για να απορροφούν το φως κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης και να προστατεύονται από τη φωτοευαισθησία. Είναι ένα μη κυκλικό καροτενοειδές που έχει μοριακό τύπο  $C_{40}H_{56}$  και μοριακό βάρος 536,85 daltons. Αποτελεί μία κόκκινη χρωστική ουσία που απορροφά φως στο ορατό φάσμα και ένα διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα-λυκοπένιου έχει  $L_{max}$  στα 472 nm. (Rao and Agarwal, 1999).

Στο μόριο του λυκοπένιου υπάρχουν 13 διπλοί δεσμοί από τους οποίους οι 11 είναι συζυγισμένοι και 2 μη-συζυγισμένοι, σε γραμμική διάταξη. Για το λόγο αυτό το λυκοπένιο παρουσιάζει το πλέον έντονο (βαθύ ερυθρό) χρώμα σε σχέση με τα άλλα καροτένια και καροτενοειδή, γενικότερα.



Εικόνα 17. Δομή λυκοπένιου

Στην εικόνα 17 φαίνεται αναλυτικά η δομή του λυκοπένιου. Όλοι οι συζυγισμένοι διπλοί δεσμοί βρίσκονται σε γεωμετρική διάταξη *trans*, γεγονός που του προσδίδει μία γραμμική διάταξη. Οι τρεις απλοί δεσμοί σε κάθε άκρο του ( $C2-C3$ ,  $C3-C4$ ,  $C4-C5$  και  $C5'-C4'$ ,  $C4'-C3'$ ,  $C3'-C2'$ ) παρέχουν τη δυνατότητα καμπύλωσης των άκρων του μορίου, όπως π.χ. φαίνεται παραπάνω στην τρισδιάστατη απεικόνισή του, όπου το μόριο απεικονίζεται στην ενεργειακά σταθερότερη διαμόρφωσή του.

Το μόριο ενός *cis*-λυκοπένιου θα προκύψει, όπως είναι γνωστό, εάν τμήμα του μορίου του λυκοπένιου περιστραφεί κατά  $180^\circ$  γύρω από ένα συζυγισμένο διπλό δεσμό. Όπως και σε άλλα καροτενοειδή, οι διπλοί δεσμοί στο λυκοπένιο μπορούν να υποστούν ισομερισμό από *trans* *cis* ισομερή από το φως, τη θερμική ενέργεια και τις χημικές αντιδράσεις (επίδραση οξέων, μικρές ποσότητες ιωδίου). Οι συνηθέστερες ισομερείς μορφές του λυκοπένιου που έχουν προσδιοριστεί είναι οι 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*, και 15-*cis*.

Δεδομένου ότι το λυκοπένιο δεν έχει δακτύλιους ανάλογους με εκείνους των καροτένιων, δεν διαθέτει ιδιότητες προβιταμίνης A, σε αντίθεση για παράδειγμα με το β-καροτένιο. Η βιολογική δράση του λυκοπένιου πιστεύεται ότι οφείλεται κυρίως στις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.

Αν και τα φρούτα και τα λαχανικά, κόκκινου χρώματος, είναι οι πιο κοινές πηγές του λυκοπένιου, δεν περιέχουν όλα τα φυτά κόκκινου χρώματος λυκοπένιο. Κοινές πηγές τροφίμων του λυκοπένιου είναι οι τομάτες, τα επεξεργασμένα προϊόντα τομάτας, τα

καρπούζια, τα ροζ γκρέιπφρουτ, η παπάγια και τα βερίκοκα. Η περιεκτικότητα σε λυκοπένιο σε αυτά τα τρόφιμα φαίνεται στους πίνακες 10 και 11.

**Πίνακας 10. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο κοινών φρούτων και λαχανικών**

Fruits and vegetables	Lycopene (µg/g wet weight)
Tomatoes	8.8–42.0
Watermelon	23.0–72.0
Pink guava	54.0
Pink grapefruit	33.6
Papaya	20.0–53.0
Apricot	<0.1

**Πίνακας 11. Περιεκτικότητα σε λυκοπένιο τροφίμων με βάση την τομάτα**

Tomato products	Lycopene (µg/g weight)
Fresh tomatoes	8.8–42.0
Cooked tomatoes	37.0
Tomato sauce	62.0
Tomato paste	54.0–1500.0
Tomato soup (condensed)	79.9
Tomato powder	1126.3–1264.9
Tomato juice	50.0–116.0
Pizza sauce	127.1
Ketchup	99.0–134.4

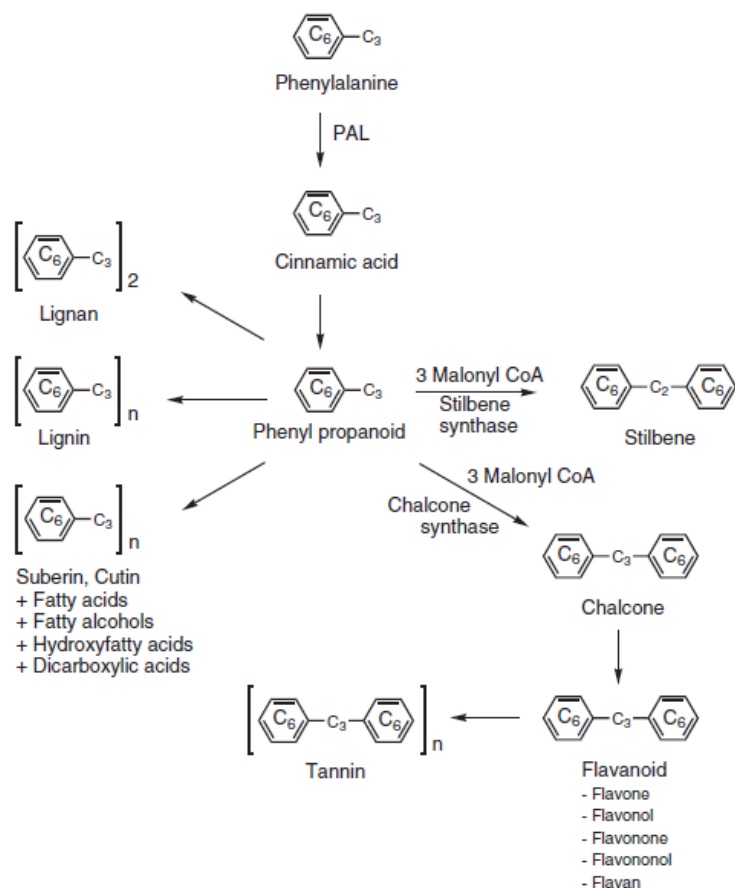
Food Research International. 1999, σελ. 737-741, Elsevier.

## 2.3.2 Φαινολικές ενώσεις

### 2.3.2.1 Γενικά <sup>12,63,64,65,66,67</sup>

Ο όρος φαινολικά συστατικά ή πολυφαινόλες χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για εκείνες τις αρωματικές ενώσεις και τα παράγωγά τους (π.χ. γλυκοζίτες) που έχουν στο βενζολικό δακτύλιο τουλάχιστον ένα υδροξύλιο. Εντούτοις, κάποια συστατικά όπως το κινναμωμικό οξύ αναφέρονται ως φαινολικά συστατικά, αν και δεν περιέχουν υδροξυλομάδα σε βενζολικό δακτύλιο. Οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ δραστικές, λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων.

Περίπου 8000 πολυφαινόλες έχουν περιγραφεί και μπορούν να χωριστούν σε διάφορες υπο-ομάδες που κυμαίνονται από απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, μέχρι πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι τανίνες (Muchuweti et al., 2007)



Εικόνα 18. Παραγωγή φαιυλοπροπανοειδών, στιλβενίων, λιγνάνων, λιγνινών, φλαβονοειδών και τανινών από φαιυλαλανίνη. PAL (phenylalanine ammonia lyase).

Οι ομάδες των φαινολικών επισυνάπτονται στον πίνακα 12:

Πίνακας 12. Ομάδες φαινολικών ενώσεων, Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC PRESS, 2004.

Ομάδα φαινολικών	Σκελετός
Απλές φαινόλες	C <sub>6</sub>
Βενζοϊκά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Φαυουλοξικά οξέα	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Υδροξυκιναμμωμικά οξέα, Φαιυλοπροπένια,	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Κουμαρίνες, Χρωμόνες	
Ναφθοκινόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Ξανθόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Στιλβένια, Ανθρακινόνες	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Φλαβονοειδή, φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόνες,	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
ανθοκυάνες, φλαβανόλες, χαλκόνες	
Λιγνάνες	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Διφλαβονοειδή	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Λιγνίνες	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Πολυμερή φλαβονοειδή	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Αυτές οι ενώσεις απαντώνται στα περισσότερα φρούτα, ενώ οι περισσότερες από αυτές συμβάλλουν στο χρώμα και στη γεύση των προϊόντων. Κατά την επεξεργασία των φρούτων μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με μέταλλα, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του πολτού του φρούτου.

Γενικά, στα τρόφιμα οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητα, στο χρώμα, στην οσμή και στην πικρή ή στυφή γεύση. Οι πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και μπορούν να δράσουν κατά του έλκους. (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014; Muchuweti et al, 2007).

Τα τελευταία χρόνια μελετώνται οι τυχόν ευεργετικές δράσεις των φαινολικών συστατικών στον οργανισμό, δεδομένων των ιδιοτήτων που αναφέρθηκαν, αλλά και της δυνατότητας συντήρησης των υποστρωμάτων (κυρίως λιπαρών ουσιών) στα οποία προστίθενται. Τα οφέλη των φαινολικών συστατικών έχουν αποκτήσει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, καθώς ενισχύουν τη σταθερότητα των λιπιδίων που περιέχονται στα τρόφιμα και επιδρούν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου.

Στα γαλακτώματα τροφίμων είναι αναγκαία η επίτευξη οξειδωτικής και φυσικής σταθερότητας κατά την αποθήκευσή τους. Η προσθήκη των αντιοξειδωτικών είναι μία από τις στρατηγικές που εφαρμόζονται προκειμένου να καθυστερήσουν οι αντιδράσεις οξείδωσης των λιπιδίων, με την προϋπόθεση ότι δεν λαμβάνει χώρα καμία τροποποίηση στις συνολικές ιδιότητες του γαλακτώματος. Τα αντιοξειδωτικά ωστόσο, δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει την οξείδωση των λιπιδίων στα γαλακτώματα, δεδομένου ότι η χημική σταθερότητα της λιπαρής φάσης σχετίζεται αυστηρά με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και την παρουσία προ-οξειδωτικών και καταλυτών οξείδωσης. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών εξαρτάται από τη θέση και το βαθμό υδροξυλίωσης του μορίου τους (Robards, 2003).

### *2.3.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών συστατικών <sup>81,82</sup>*

Η περιεκτικότητα των φαινολικών στα τρόφιμα παρέχει πολλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Για το λόγο αυτό, στη βιομηχανία τροφίμων υπάρχουν και πολλά συμπληρώματα διατροφής πλούσια σε φαινολικά. Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν κυρίως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Λόγω των προαναφερθεισών ιδιοτήτων, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούν την κατανόηση του πραγματικού τρόπου δράσης των φαινολικών ενώσεων. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών είναι η πιο ευρέως μελετημένη ιδιότητα. Μάλιστα, η ανακάλυψη αντιγηραντικών ουσιών και η μελέτη τους έχει αποδείξει ότι η δράση τους βασίζεται στην παρουσία φαινολικών ενώσεων και στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

Γενικά, η βιοδιαθεσιμότητα σχετίζεται με τη συγκέντρωση μίας ένωσης ή και των συγγενικών της μεταβολιτών, που απορροφάται και ενεργοποιείται από το όργανο-στόχο ή σύστημα. Οι *in vitro* μελέτες είναι πιο διαδεδομένες από τις *in vivo* για τη μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών, αλλά και της κάθε ιδιότητάς τους ξεχωριστά. Ωστόσο, το γεγονός ότι πολλές φαινολικές ενώσεις ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται κατά το μεταβολισμό τους, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις *in vitro* μελέτες μπορεί να είναι ψευδή ή να μην ανταποκρίνονται στις πραγματικές συνθήκες. (Fardet et al, 2008; Fernandez-Pancho, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008). Για το λόγο αυτό, μελέτες που σχετίζονται με την κατανάλωση ορισμένων τροφίμων ή ακόμα και μεμονωμένων ενώσεων είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό της πραγματικής αποτελεσματικότητας των βιοδραστικών φαινολικών ενώσεων. Κατά το μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιούνται πολλές αντιδράσεις, που οδηγούν στο σχηματισμό πολλαπλών μεταβολιτών, από τους οποίους μερικοί είναι ανενεργοί, ενώ άλλοι μετασχηματίζονται σε βιολογικά ενεργές μορφές (Fardet et al., 2008).

Κατά την ενσωμάτωση των φαινολικών σε γαλακτώματα ή σε άλλα συμπληρώματα, λόγω της σημαντικότητας των ιδιοτήτων τους, κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος της σταθερότητάς τους. Κάποιες από τις μεθόδους προσδιορισμού τους είναι μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, ή μέσω HPLC. Εάν οι ενώσεις αυτές έχουν ενσωματωθεί σε έλαια, τότε προηγείται η εξαγωγή της λιπαρής φάσης. Η διαδικασία αυτή αναλύεται στην επόμενη ενότητα.

### *2.3.2.3 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου σε έλαια* <sup>68,69,70</sup>

Πρωταρχικό βήμα στην ποσοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών είναι η εξαγωγή και παραλαβή τους από το έλαιο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από τα τρόφιμα είναι:

- η χημική δομή των φαινολικών ενώσεων
- η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται
- η σύνθεση του τροφίμου

Οι περισσότερες από τις διαδικασίες εκχύλισης των πολυφαινολών βασίζονται σε ένα διαλύτη εκχύλισης, γιατί οι διαλύτες αυτοί είναι εύκολοι στη χρήση, αποτελεσματικοί και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή (Dai & Mumper, 2010). Ακολούθως, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που με τη σειρά τους επηρεάζουν την εκχύλιση με διαλύτη, όπως:

- η πολικότητα του διαλύτη
- ο χρόνος

- η θερμοκρασία
- η αναλογία του δείγματος προς το διαλύτη

Μίγματα που χρησιμοποιούνται συχνά για τη διεξαγωγή της εκχύλισης είναι μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη (Roby et al., 2013). Αρκετοί συγγραφείς αναφέρουν επίσης μελέτες που συγκρίνουν διαφορετικούς διαλύτες (Roby et al, 2013; Vagi et al., 2005). Για παράδειγμα, σε πειράματα που έγιναν για τη σύγκριση της αποδοτικότητας στην εκχύλιση με μεθανόλη, αιθανόλη, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η μεθανόλη ήταν ο καλύτερος διαλύτης για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από θυμάρι, φασκόμηλο και μαντζουράνα (Roby et al. 2013). Γενικά, οι διαλύτες με τη μεγαλύτερη πολικότητα αποτελούν πιο αποτελεσματικά μέσα για τη δέσμευση ριζών (Roby et al. 2013). Η εκχύλιση συχνά πραγματοποιείται με ανάδευση, ανακίνηση ή σε λουτρό υπερήχων με ρύθμιση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης. Ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται και βιβλιογραφικά έχει βρεθεί από 30 s (Bandoniene, Murkovic, & Venskutonis, 2005) μέχρι και 72 h (Roby et al., 2013).

Εκτός από τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης για την παραλαβή των φαινολικών, έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι με στόχο την ανάκτηση πολύτιμων ενώσεων από φυσικές πρώτες ύλες. Ορισμένες από αυτές είναι η υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (microwave-assisted extraction, MAE) και η υποβοηθούμενη από ένζυμα εκχύλιση (Enzyme-assisted extraction, EAE).

Μετά την εκχύλιση των φαινολικών ακολουθεί ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητάς τους, μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μέθοδοι όπως DPPH και HPLC.

#### 2.3.2.4 Εφαρμογές <sup>68,72,73,74,75,76,77,78,79,80</sup>

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα φαινολικά συστατικά ενσωματώνονται σε γαλακτώματα τροφίμων με στόχο τον εμπλουτισμό του τελικού τροφίμου. Οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου είναι ένα πολύπλοκο μίγμα ενώσεων με διαφορετικές χημικές δομές, που προέρχονται από τη διαδικασία εξαγωγής του ελαίου. Τα τελευταία χρόνια, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη χρησιμότητα των πολυφαινολικών συστατικών ελαιόλαδου σε τρόφιμα που περιέχουν γαλακτώματα. Παραδείγματος χάρη, πολυφαινολικές ενώσεις με αμφιφιλική δομή, όπως η ελευρωπαΐνη, πράγματι έχει αποδειχθεί ότι ασκούν κάποια επιφανειακή δραστηριότητα και επηρεάζουν τη διαδικασία γαλακτωματοποίησης, τόσο σε μοντελοποιημένα συστήματα (di Mattia, Sacchetti, & Pittia, 2011; di Mattia et al, 2014; Souilem, Kobayashi, Neves, Jlaiel et al, 2014; Souilem, Kobayashi, Neves, Sayadi et al, 2014), όσο και σε πραγματικές συνθήκες (di. Mattia et al., 2015). Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι όταν εξαιρετικά παρθένο

ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή μαγιονέζας, ο βαθμός διασποράς και οι φυσικές ιδιότητες των δειγμάτων μαγιονέζας επηρεάστηκαν κατά πολύ και ο βαθμός αποσταθεροποίησης αποδόθηκε, μεταξύ άλλων παραγόντων, στη συγκέντρωση των πολυφαινολών στα έλαια (Di Mattia et al., 2015).

Εκτός από την ενσωμάτωση των πολυφαινολών ελαιόλαδου, περιγράφεται στη βιβλιογραφία ότι στη βιομηχανία τροφίμων αξιοποιείται και η ενσωμάτωση αρωματικών ελαίων και εκχυλισμάτων. Το 2012 σε πειράματα από τους Badee et al., διαπιστώθηκε ότι η ενθυλάκωση ελαίου μέντας σε αραβικό κόμμα σε σύγκριση με άλλα μέσα, διατηρούσε περισσότερο τη γεύση. Ο προσδιορισμός των φαινολικών σε αρωματικά φυτά έχει μελετηθεί ευρέως. Τα αρωματικά φυτά είναι αρκετά πολύπλοκα σε ότι αφορά τη σύνθεσή τους σε φαινολικές ενώσεις.

Τέλος, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην οξειδωτική αλλοίωση που υφίστανται οι πολυφαινόλες όταν εκτίθενται στο οξυγόνο, το φως, την υγρασία και σε υψηλές θερμοκρασίες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στους ακόρεστους δεσμούς στη μοριακή τους δομή. Η οξείδωση των πολυφαινολών οδηγεί σε δυσάρεστες γεύσεις, επηρεάζοντας έτσι την ποιότητα και περιορίζοντας το χρόνο ζωής των προϊόντων στα οποία ενσωματώνονται (Chranioti, Tzia, 2014). Λόγω των ανωτέρω, οι πολυφαινόλες πρέπει να επικαλύπτονται πριν την ενσωμάτωση σε προϊόντα τροφίμων και επομένως η μικροενθυλάκωση θεωρείται ως μία σχετικά κατάλληλη για το σκοπό αυτό τεχνική.



## Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος

---

### 3.1 Σκοπός

---

Στόχος των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παρασκευή ο/ω νανογαλακτωμάτων, χρησιμοποιώντας τη μικρότερη δυνατή περιεκτικότητα σε συνθετικό γαλακτωματοποιητή. Ακολούθως, ζητούμενο ήταν η μελέτη των συστημάτων νανογαλακτωμάτων με ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά. Τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ηλιέλαιο και το ραφινέ πυρηνέλαιο, ενώ οι μη-ιοντικοί γαλακτωματοποιητές ήταν οι Tween 20 και Tween 40. Τα βιοδραστικά συστατικά που ενσωματώθηκαν στη λιπαρή φάση ήταν το λυκοπένιο στο ηλιέλαιο και φαινολικά συστατικά στο πυρηνέλαιο, αντίστοιχα.

Τα πειράματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων παρασκευάστηκαν τα διαγράμματα φάσης, που στόχο είχαν τον προσδιορισμό της μέγιστης δυνατής αναλογίας νερού-ελαίου, ώστε να προκύψουν σταθερά νανογαλακτώματα. Το δεύτερο μέρος αφορούσε την παρασκευή και μελέτη των εν λόγω γαλακτωμάτων, στις αναλογίες που προέκυψαν από το πρώτο μέρος, με ενσωματωμένα ή μη βιοδραστικά συστατικά.

*A' μέρος: κατάστρωση διαγραμμάτων φάσης*

Παρασκευή νανογαλακτωμάτων με προκαθορισμένη αναλογία ελαίου-γαλακτωματοποιητή-νερού και προσδιορισμός των ιδιοτήτων τους.

*B' μέρος: παρασκευή των νανογαλακτωμάτων*

Πειράματα προσθήκης μίγματος ελαίου με ή χωρίς βιοδραστικά συστατικά, σε καθορισμένες αναλογίες νερού-γαλακτωματοποιητή, μέχρι σχηματισμού του νανογαλακτώματος. Μελέτη των ιδιοτήτων των νανογαλακτωμάτων και της σταθερότητάς τους.

Τα γαλακτώματα τα οποία παρασκευάστηκαν εξετάστηκαν ως προς το χρώμα, τη θολότητα, το ιξώδες, το δείκτη διάθλασης, το δείκτη πολυδιασποράς (PDI), τη μέση διάμετρο σταγονιδίων (MD), το δείκτη σταθερότητας γαλακτώματος (ESI) και την επιφανειακή και διεπιφανειακή τους τάση. Επιπλέον, μελετήθηκε και η διατηρησιμότητά τους σε χρονικό διάστημα ενός μήνα. Οι παραπάνω μετρήσεις που ελήφθησαν παρέχουν πληροφορίες για τις φυσικές ιδιότητες καθώς και για την αντοχή των γαλακτωμάτων στο χρόνο. Η επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση μετρήθηκε στα έλαια, στα γαλακτώματα και σε διαλύματα που περιείχαν νερό και γαλακτωματοποιητή στις αναλογίες που τελικά χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των γαλακτωμάτων. Στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ελέγχθηκε η

διατηρησιμότητα των βιοδραστικών συστατικών που είχαν ενσωματωθεί επίσης για χρονικό διάστημα ενός μήνα.

## 3.2 Υλικά και Μέθοδοι

---

### 3.2.1 Α' ύλες-αντιδραστήρια

---

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των πειραμάτων που αφορούσαν την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων ήταν:

- Ηλιέλαιο
- Πυρηνέλαιο ραφινέ
- Γαλακτωματοποιητές που προμηθεύτηκαν από την Across Organics (New Jersey, USA) και την Chembiotin A.E. :
  - ο Tween 20 (μονολαυρική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη)
  - ο Tween 40 (μονοπαλμιτική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη)
- Βιοδραστικά συστατικά:
  - ο Λυκοπένιο10% από την Roche (Basel, Switzerland)
  - ο Φαινολικά συστατικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα και εκχύλιση φύλλων ελιάς
- Καθαρό νερό που χρησιμοποιείται σε αναλύσεις HPLC και απιονισμένο.

### 3.2.2 Εξοπλισμός

---

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπόνησης των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν:

- Υδατόλουτρο (Köttermann Labortechnik, type 3047 West Germany)
- Ομογενοποιητής υψηλής ταχύτητας (CAT Unidrive 1000 Homogenizer, CAT Scientific, Ca., USA)
- Ιξωδόμετρο (Brookfield DV-II Pro Viscometer, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA)
- Χρωματομέτρο Minolta CR 200, με διάμετρο οπής 8mm (Minolta Company, Chuo -Ku)
- Αναλυτής σκέδασης φωτός (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd, UK)

- Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE)
- Τασιόμετρο Wilhelmy plate (WI=39,28 mm, (Sigma702, Biolin Scientific, Finland)
- Συσκευή υπερήχων, (High intensity ultrasonic processor, Microprocessor controlled, 400W)
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V)
- Υάλινα σκεύη (Ποτήρια ζέσεως, Δοκιμαστικοί σωλήνες 20 mL)
- Φυγόκεντρος (Heraeus™ Megafuge™ 16 Centrifuge Series)
- Vortex mixer (Velp Scientifica).

### 3.2.3 Πειραματική Διαδικασία-Επεξεργασία των δειγμάτων

Για την περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας είναι σημαντικό να αναλυθούν τα επιμέρους μέρη (Α' και Β') που αναφέρθηκαν παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα:

#### Α' ΜΕΡΟΣ: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΦΑΣΗΣ

Για την κατασκευή των διαγραμμάτων φάσης παρασκευάστηκαν γαλακτώματα σε τελικό όγκο των 100 g. Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Ορίστηκαν οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή-νερού που θα μελετούνταν. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν μίγματα με: 0%-2%, 4%-6% και 8-10% γαλακτωματοποιητή κ.β τελικού μίγματος.
2. Ποσότητες γαλακτωματοποιητή που αντιστοιχούν στις ανωτέρω αναλογίες προστέθηκαν σε συγκεκριμένη ποσότητα νερού και ακολούθησε ανάδευση υπό θέρμανση (40°C), μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους.
3. Ακολούθως τα υδατικά αυτά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 40°C και ξεκίνησε η ομογενοποίησή τους στις 9.000 στροφές (rpm).
4. Ταυτόχρονα με την ομογενοποίηση ξεκίνησε η προσθήκη του εκάστοτε ελαίου, εμπλουτισμένου ή μη, σε βιοδραστικά συστατικά. Στόχος ήταν η προσθήκη του ελαίου να γίνει μέχρι το μίγμα να παύσει να είναι διαυγές και να μην αφομοιώνεται το έλαιο πλέον από το διάλυμα νερού-γαλακτωματοποιητή.
5. Τέλος το γαλάκτωμα που έχει σχηματιστεί υποβάλλεται σε υπέρηχους για 10 λεπτά χρησιμοποιώντας συσκευή υπερήχων High intensity ultrasonic processor με μέγιστη ισχύ 400 W. Οι υπέρηχοι ορίστηκαν σε ένταση ποσοστού 60% της συνολικής διαθέσιμης από τη συσκευή.

#### Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ

Με βάση τα διαγράμματα φάσης επιλέχθηκε να παρασκευαστούν νανογαλακτώματα με αναλογίες γαλακτωματοποιητή 2%, 4% και 6% κ.β. του τελικού μίγματος. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται πιο

πάνω στην κατάστρωση των διαγραμμάτων φάσης. Τα μίγματα είχαν τελικό βάρος 80g. Η ποσότητα του ελαίου που τοποθετείτο στα διαλύματα πρώτα ζυγίζόταν σε ποτήρι ζέσεως στην ακριβή επιθυμητή ποσότητα. Η ποσότητα αυτή ισοδυναμούσε με ποσοστό 2% κ.β. του τελικού μίγματος. Αυτό προέκυψε από τα διαγράμματα φάσης και τις αναλογίες που παρατηρήθηκε ότι προέκυπταν νανογαλακτώματα της κλίμακας των 100 nm (κατά προσέγγιση). Αντίστοιχα, από τα διαγράμματα φάσης των εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά γαλακτωμάτων προέκυψε η ίδια αναλογία τόσο για το ηλιέλαιο με λυκοπένιο όσο και για το πυρηνέλαιο με τα φαινολικά συστατικά.

Σε βαθμονομημένους σωλήνες των 20mL μεταφέρθηκε ποσότητα όλων των νανογαλακτωμάτων για τον έλεγχο της σταθερότητάς τους (δείκτης ESI). Σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε αρκετή ποσότητα από τα παρασκευασμένα νανογαλακτώματα, ώστε να πραγματοποιηθούν οι υπόλοιπες μετρήσεις που αφορούν τον έλεγχο της διατηρησιμότητάς τους.

### 3.2.3.4 Αναλύσεις

---

#### 3.2.3.4.1 Ιξώδες

---

Το ιξώδες των γαλακτωμάτων μετρείται με το ιξωδόμετρο Brookfield. Σε ειδικό δοχείο σε θερμοκρασία 25°C προστίθενται 60 mL από το γαλακτώμα προς μέτρηση.

Επιλέγεται το στέλεχος S61 και ορίζεται η ταχύτητα στα 50 rpm. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 25°C. Η τιμή που προκύπτει από το όργανο αρκεί για τον προσδιορισμό των ρεολογικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων, εφόσον τα συγκεκριμένα γαλακτώματα είναι νευτωνικά ρευστά.

#### Εξοπλισμός:

1. Ιξωδόμετρο Brookfield με χρήση στελέχους S61
2. Ογκομετρικός σωλήνας για τοποθέτηση δείγματος.



Εικόνα 19. Ιξωδόμετρο Brookfield

#### Διαδικασία:

1. Τίθεται σε λειτουργία το ιξωδόμετρο και γίνεται αυτόματη βαθμονόμηση (calibration) του οργάνου.
2. Τοποθετείται το στέλεχος.
3. Επιλέγεται από την οθόνη του οργάνου η ρύθμιση για το στέλεχος S61, όπως επίσης και για τον αριθμό των στροφών ανά min (50 rpm).
4. Μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητα γαλακτώματος σε ογκομετρικό κύλινδρο.
5. Ακολουθεί εμφύσηση του στελέχους στο γαλάκτωμα και λήψη της μέτρησης σε cP.

#### 3.2.3.4.2 Θολότητα

Για τη μέτρηση της θολότητας των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V). Ορίζεται η μέτρηση να πραγματοποιηθεί στα 600 nm. Η θερμοκρασία των δειγμάτων ήταν σταθερή δωματίου 25°C.



Εικόνα 20. Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V)

#### 3.2.3.4.3 Χρώμα

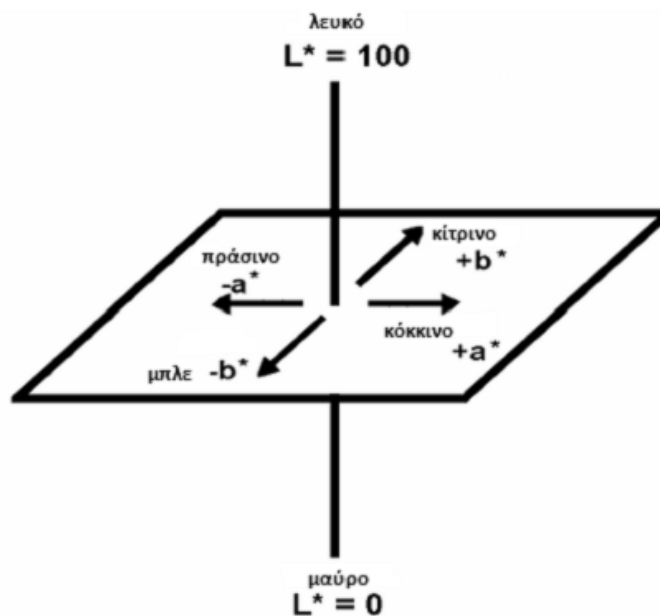
Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μετρείται το χρώμα των λιπαρών υλών με το χρωματόμετρο MinoltaCR 200.

- Αρχικά βαθμονομείται το όργανο με τη βοήθεια μίας λευκής πλάκας στην οποία γίνεται μία μέτρηση με σκοπό το μηδενισμό του οργάνου.
- Το δείγμα, το οποίο βρίσκεται σε ρευστή μορφή εισέρχεται σε ένα ειδικό τρυβλίο και καλύπτεται με διαφανές κάλυμμα.
- Πραγματοποιείται η μέτρηση.
- Οι μετρήσεις λαμβάνονται από το καταγραφικό. Για κάθε δείγμα εμφανίζονται τρεις παράμετροι: το L το οποίο αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα του

δείγματος, το  $a$  το οποίο αντιπροσωπεύει το κόκκινο - πράσινο χρώμα και το  $b$  το οποίο αντιπροσωπεύει το κίτρινο - μπλε χρώμα.

Το  $L^*$  εκφράζει τη φωτεινότητα του χρώματος. Οι τιμές των  $a^*$ ,  $b^*$  είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος. Αν ένα δείγμα έχει μηδενική τιμή για τα  $a^*$ ,  $b^*$ , πρέπει να βρίσκεται πάνω στον άξονα μαύρου-λευκού. Οι τιμές  $a^*$  και  $b^*$  είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος (συντά ονομάζονται χρωματικότητα) πάνω στο επίπεδο διατομής του χρώματος, κάθετα στον άξονα μαύρου-λευκού. Η θετική τιμή για το  $a^*$  υποδεικνύει κόκκινο χρώμα, ενώ η αρνητική τιμή πράσινο χρώμα. Η θετική τιμή για το  $b^*$  υποδεικνύει κίτρινο χρώμα, ενώ η αρνητική τιμή μπλε χρώμα. Το συνολικό χρώμα  $E$ , σύμφωνα με τη μέθοδο CIELAB, παριστάνεται σε τρισδιάστατο σύστημα με συνιστώσες  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2}$$



Εικόνα 21. Ανάλυση χρωματικών παραμέτρων CIELAB



Εικόνα 22. Χρωματόμετρο

#### 3.2.3.4.4 Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης των γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με χρήση διαθλασίμετρου (B&C 32400 ABBE) σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου 25°C.

#### Διαδικασία:

1. Άνοιγμα του οργάνου
2. Τοποθέτηση σταγόνας δείγματος στην ειδική πλάκα
3. Λήψη μέτρησης.



Εικόνα 23. Διαθλασίμετρο (B&C 32400 ABBE)

#### 3.2.3.4.5 Μέση Διάμετρος (Mean Diameter) σταγονιδίων και Δείκτης πολυδιασποράς PDI (Polydispersity Index)

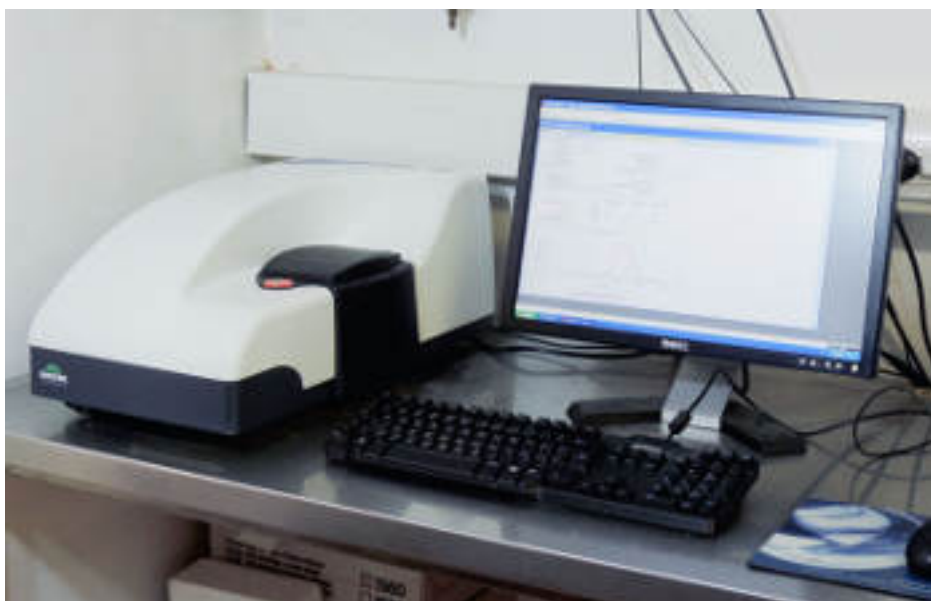
Το μέγεθος των σταγονιδίων και η κατανομή του μεγέθους τους προσδιορίστηκαν με Δυναμική Σκέδαση Φωτός - Dynamic Light Scattering DLS (Zetasizer nano-zs 2000, Malvern Instruments Ltd, UK). Οι μετρήσεις έγιναν στους 25°C. Τα δεδομένα διορθώθηκαν μέσω του ιξώδους, του δείκτη διάθλασης και της διηλεκτρικής σταθεράς του δείγματος.

##### Εξοπλισμός:

1. Όργανο Zetasizer nano-zs 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK).
2. Ειδικές κυψελίδες τοποθέτησης δείγματος.
3. Ειδικά πανάκια καθαρισμού των κυψελίδων.
4. Software οργάνου.

##### Διαδικασία:

1. Εκκίνηση προγράμματος (Software) και κατόπιν άνοιγμα οργάνου.
2. Ορισμός ονομάτων δειγμάτων και κωδικοποίησή τους.
3. Λήψη μετρήσεων και αποθήκευσή τους σε ειδικό spreadsheet του Software.



Εικόνα 24. Zetasizer Nano-zs 2000

#### 3.2.3.4.6 Ζήτα-δυναμικό ( $\zeta$ )

Το ηλεκτρικό δυναμικό στο επίπεδο διάτμησης, αναφέρεται ως ζήτα-δυναμικό ( $\zeta$ ). Μετρείται μέσω του Zetasizer Nano-ZS 2000 και οι μονάδες μέτρησής του είναι σε mV. Ποσότητα 3 mL από τα νανογαλακτώματα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και ακολούθησε η μέτρηση.



#### 3.2.3.4.7 Δείκτης σταθερότητας γαλακτωμάτων

---

Η σταθερότητα των γαλακτωμάτων προσδιορίστηκε βάσει του διαχωρισμού φάσης λόγω διαφοράς ειδικού βάρους. Ποσότητα 20 mL των παρασκευαζόμενων γαλακτωμάτων μεταφέρθηκε σε γυάλινους βαθμονομημένους σωλήνες των 20 mL και αποθηκεύτηκε για 4 εβδομάδες (1 μήνας) στους 25°C. Στα ο/w νανογαλακτώματα η αποκορύφωση των λιπαρών και η δημιουργία ιζήματος/κρέμας πάνω, ενώ ορού από κάτω προσδιορίζεται από την αναλογία του όγκου του ορού επί του συνολικού όγκου του γαλακτώματος.

Μετρήθηκε το συνολικό ύψος των γαλακτωμάτων (HE) και το ύψος του στρώματος του ορού (HS). Ο Δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI) υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$ESI (\%) = 100 * \left( \frac{HS}{HE} \right)$$

Όπου: (HS) είναι το ύψος του ορού

(HE) είναι το αρχικό ύψος γαλακτώματος.

#### Εξοπλισμός:

Γυάλινοι βαθμονομημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20 mL.

#### Διαδικασία:

1. Μεταφορά 20 mL από καθένα από τα παρασκευασθέντα δείγματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες.
2. Αποθήκευσή τους για διάστημα 4 εβδομάδων στους 25°C.
3. Παρακολούθηση ανά εβδομάδα και καταγραφή της στάθμης των φάσεων.
4. Λήψη τελικών αποτελεσμάτων μετά το πέρας των 4 εβδομάδων και υπολογισμός των λόγων ESI.

#### 3.2.3.4.8 Επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση

---

Προκειμένου να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός για τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος, είναι χρήσιμο να μετρηθεί η επιφανειακή τάση των ελαίων και των διαλυμάτων νερού-γαλακτωματοποιητή. Η μέτρηση της επιφανειακής τάσης του νερού/αέρα, των ελαίων/αέρα και της διεπιφανειακής τάσης ελαίου/νερού διεξήχθη στους 25°C, με τη χρήση τασιόμετρου Wilhelmy plate (WI=39,28 mm) (Sigma702, Biolin Scientific, Finland). Ο χρόνος εξισορρόπησης ήταν 15 min ο οποίος επιλεγόταν ασυμπτωτικά με τη χρήση παλιότερων πειραμάτων για αραιά και συμπυκνωμένα διαλύματα. Πιο αναλυτικά όλα τα δείγματα αναφέρονται στην ενότητα με τα αποτελέσματα.

### Εξοπλισμός/ Αντιδραστήρια:

1. Sigma702, Biolin Scientific, Finland
2. Γαλακτωματοποιητές: Tween 20, Tween 40 σε αναλογίες 2,4 και 6%, διαλυτοποιημένοι σε απιονισμένο νερό
3. Ηλιέλαιο
4. Πυρηνέλαιο
5. Ηλιέλαιο+0,05% κ.β. λυκοπένιο
6. Πυρηνέλαιο+0,05 κ.β. εκχυλίσματα φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα και φύλλα ελιάς.

### Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων:

Μετρήθηκε η επιφανειακή τάση των ελαίων εμπλουτισμένων ή μη, των διαλυμάτων των γαλακτωματοποιητών με νερό και των γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν σε όλες τις αναλογίες γαλακτωματοποιητή, με τα απλά έλαια και τα εμπλουτισμένα. Για τη μέτρηση της διεπιφανειακής τάσης χρειάστηκαν τα διαλύματα γαλακτωματοποιητών-νερού και όλα τα έλαια.

### Διαδικασία:

1. Άνοιγμα του οργάνου
2. Τοποθέτηση διαλύματος στη ειδικό ποτήρι
3. Επιλογή και τοποθέτηση του επιθυμητού στελέχους
4. Λήψη μετρήσεων και αποθήκευσή τους σε ειδικό spreadsheet του προγράμματος.



Εικόνα 25. Sigma 702

#### 3.2.3.4.9 Ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά (TPC)-Μέτρηση Folin Ciocalteu

Η μέτρηση αυτή πραγματοποιήθηκε στα γαλακτώματα του πυρηνέλαιου που είχαν ενσωματωθεί φαινολικά συστατικά. Αυτή η μέτρηση είχε ως στόχο τον υπολογισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου στα γαλακτώματα, ώστε να μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα, ως προς τη χρησιμότητα και τη διατηρησιμότητα των ενσωματωμένων συστατικών. Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται από τον Waterhouse (2002), χρησιμοποιώντας γαλλικό οξύ ως πρότυπο. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ως mg γαλλικού οξέος (GA)/g πυρηνελαίου.

Εκτός από τα γαλακτώματα, το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά μετρήθηκε στο απλό πυρηνέλαιο, στο πυρηνέλαιο με τα δύο εμπλουτισμένα φαινολικά συστατικά.

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) βασίζεται σε μία χημική αναγωγή του αντιδραστηρίου, ενός μίγματος οξειδίων βολφραμίου και μολυβδαινίου. Τα προϊόντα της αναγωγής των οξειδίων του μετάλλου έχουν ένα μπλε χρώμα, που έχει η μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm. Η ένταση του φωτός απορρόφησης σε εκείνο το μήκος κύματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών. Μέσω της έντασης απορρόφησης γίνεται αναγωγή σε φαινολικά.

#### Εξοπλισμός/ Αντιδραστήρια:

- Δείγματα νανογαλακτωμάτων και το πυρηνέλαιο με τα ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά
- Γαλλικό οξύ

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC)(Sigma; also Singleton and Rossi, 1965), αποθηκευμένο σε σκοτεινό μέρος
- Κορεσμένο ανθρακικό νάτριο  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 765 nm
- Κυψελίδα χαλαζία.

#### Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων:

##### Στα γαλακτώματα:

Σε 0,1 mL των γαλακτωμάτων προστέθηκαν 7,9 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και το μίγμα αναδεύτηκε. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1,5 mL υπερκορεσμένου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , το μίγμα αναδεύτηκε εκ νέου και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C, στο σκοτάδι, για ½ h. Η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε στη συνέχεια χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V) στα 765 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) ανά g ξηρού βάρους των πρώτων υλών (mg GAE/g πρώτης ύλης (dw)), με βάση πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος που είχε δημιουργηθεί για 0,1mL διαλύματος στη μέθοδο Folin. Από τη στιγμή που προστέθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, μέχρι την τοποθέτηση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο, δεν έπρεπε να περάσει διάστημα μεγαλύτερο των 10 min, καθώς το αντιδραστήριο αυτό οξειδώνεται (από κίτρινο γίνεται πράσινο) και δεν είναι έγκυρη η μέτρηση.

##### Στα έλαια:

Ποσότητα 10 g του πυρηνέλαιου διαλύθηκε σε 5 mL εξανίου. Το στρώμα εξανίου εκχυλίστηκε διαδοχικά με 10 mL 60% μεθανόλης (τρεις έως τέσσερις φορές). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα αναμίχθηκαν και εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα για να απομακρυνθεί ο διαλύτης. Το υπόλειμμα στη συνέχεια διαλύθηκε σε μεθανόλη (2 mL). Η προετοιμασία των φαινολικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και κάθε εκχύλισμα αναλύθηκε για το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά όπως έχει αναφερθεί.

#### Διαδικασία:

1. Άνοιγμα του οργάνου
2. Τοποθέτηση διαλύματος στην κυψελίδα
3. Επιλογή μήκους κύματος στα 765 nm
4. Λήψη μετρήσεων.

#### 3.2.3.4.10 Οξείδωση του λυκοπένιου

---

Η οξείδωση του λυκοπένιου είναι σημαντική για τη σταθερότητα των γαλακτωμάτων της δεύτερης σειράς. Για να μετρηθεί έπρεπε αρχικά να απομονωθεί η ελαιώδης φάση από το νανογαλάκτωμα ηλιέλαιου εμπλουτισμένου με λυκοπένιο. Η φάση αυτή περιείχε και διαλύτη ισοοκτανίου/ισοπροπανόλης. Ακολουθώντας, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση αυτής της φάσης στο  $L_{\max}=472$  nm, που είναι και το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης, όπως επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά.

#### Εξοπλισμός/ Αντιδραστήρια:

- Δείγματα των νανογαλακτωμάτων ηλιέλαιου με λυκοπένιο
- Διάλυμα ισοοκτανίου και ισοπροπανόλης
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Vortex mixer (Velp Scientifica)
- Φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V).

#### Διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων προς μέτρηση:

Αρχικά παρασκευάστηκε το μίγμα διαλυτών ισοοκτανίου/ισοπροπανόλης σε αναλογία 3:1. Σε κυψελίδες που τοποθετούνται στη φυγόκεντρο προστέθηκαν 8 mL νανογαλακτώματος και 40 mL διαλύτη. Ακολούθησε ανάδευση και έπειτα φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 2 min. Με χρήση των πιπετών συλλέχθηκε η άνω φάση που περιείχε το έλαιο και φωτομετρήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία. Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα ισοοκτανίου/ισοπροπανόλης.

### 3.3 Σχεδιασμός πειραμάτων

---

Συνοπτικά στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή και νερού που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων και τα ποσοστά ενσωμάτωσης των βιοδραστικών συστατικών. Τα φαινολικά συστατικά που ενσωματώθηκαν στο πυρηνέλαιο προέρχονταν από εκχύλιση ελαιοπυρήνα και εκχύλιση φύλλων ελιάς.

Πίνακας 13. Αναλογίες για τους εμπλουτισμούς των ελαίων σε βιοδραστικά συστατικά

Περιεκτικότητα % κ.β. σε λυκοπένιο		
Σε 100g ηλιέλαιο	0,05	
	Περιεκτικότητα % κ.β. σε φαινολικά συστατικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα	Περιεκτικότητα % κ.β. σε φαινολικά συστατικά από εκχύλιση φύλλων ελιάς
Σε 100g πυρηνέλαιο	0,05	0,05

Α' μέρος: διαγράμματα φάσης/τελικό βάρος 100 g

Πίνακας 14. Αναλογίες γαλακτωματοποιητών-νερού που χρησιμοποιήθηκαν στα μη εμπλουτισμένα έλαια

Έλαια	Γαλακτωματοποιητές	%κ.β. γαλακτωματοποιητής	% κ.β. νερό
Ηλιέλαιο, Πυρηνέλαιο	Tween 20, Tween 40	0	100
		1	99
		2	98
		4	96
		5	95
		6	94
		8	92
		10	90

Πίνακας 15. Αναλογίες γαλακτωματοποιητών-νερού που χρησιμοποιήθηκαν στα εμπλουτισμένα έλαια

Έλαια	Γαλακτωματοποιητές	%κ.β. γαλακτωματοποιητής	% κ.β. νερό
Ηλιέλαιο+0,05% κ.β. λυκοπένιο, Πυρηνέλαιο+0,05% κ.β. φαινολικά συστατικά	Tween 20, Tween 40	0	100
		1	99
		2	98
		4	96
		5	95
		6	94
		8	92
		10	90

### B' μέρος: παρασκευή των γαλακτωμάτων/τελικό βάρος 80g

Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων επιλέχθηκαν οι αναλογίες σε γαλακτωματοποιητή 2%, 4% και 6% κ.β. επί του τελικού μίγματος. Το τυφλό γαλάκτωμα (0% κ.β. γαλακτωματοποιητής) δεν σχημάτιζε νανογαλάκτωμα και για το λόγο αυτό δεν μελετήθηκε ως προς τις ιδιότητές του. Όλα τα γαλακτώματα παρασκευάστηκαν και με τους δύο γαλακτωματοποιητές. Ως προς τον έλεγχο της διατηρησιμότητας, στην περίπτωση της ενσωμάτωσης των φαινολικών, τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή Tween 40 δεν μελετήθηκαν. Στην πορεία των πειραμάτων, παρατηρήθηκε ότι ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 είχε καλύτερα αποτελέσματα σε αντίθεση με το Tween 40, καθώς ο δεύτερος δεν έδειξε την ίδια γαλακτωματοποιητική ικανότητα με τον Tween 20 και δεν παρείχε πλήρη κάλυψη των σταγονιδίων ελαίου, με αποτέλεσμα να μην γίνεται η πλήρης ομογενοποίηση του ελαίου.

Τέλος, από τα διαγράμματα φάσης η καλύτερη ποσότητα ελαίου που προέκυψε ότι παρέχει νανογαλάκτωμα ήταν εκείνη που αντιστοιχεί σε 2% κ.β. τελικού μίγματος. Ακολουθεί συνοπτικός πίνακας με τις τελικές αναλογίες των συστατικών των νανογαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν.

Πίνακας 16. Βασικές αναλογίες των συστατικών των γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν

	Περιεκτικότητα % κ.β. σε γαλακτωματοποιητή	Περιεκτικότητα % κ.β. σε νερό	Περιεκτικότητα % κ.β. σε έλαιο (με ή χωρίς ενσωματωμένα βιοδραστικά συστατικά)
<b>Δείγμα 1</b>	2	96	2
<b>Δείγμα 2</b>	4	94	2
<b>Δείγμα 3</b>	6	92	2

Τέλος, το B' μέρος χωρίστηκε σε επιμέρους τρεις σειρές πειραμάτων:

- 1<sup>η</sup> Σειρά: νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση το ηλιέλαιο ή το πυρηνέλαιο (απλά)
- 2<sup>η</sup> Σειρά: εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο με ενσωματωμένο λυκοπένιο
- 3<sup>η</sup> Σειρά: εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση πυρηνέλαιο με ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά προερχόμενα από εκχυλίσματα ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς.

Στο B' μέρος εκτός από τις ιδιότητες των γαλακτωμάτων μελετήθηκε και η σταθερότητά τους, μετρώντας τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων και το δείκτη πολυδιασποράς στα νανογαλακτώματα κάθε εβδομάδα, για χρονικό διάστημα ενός μήνα. Ο δείκτης ESI ήταν η πιο σημαντική ένδειξη για τη σταθερότητα όλων των

νανογαλακτωμάτων. Τέλος, στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με βάση το ηλιέλαιο προσδιορίστηκε η οξείδωση του λυκοπένιου στην πάροδο δύο εβδομάδων και η μεταβολή του χρώματός του στην πάροδο ενός μήνα. Στα νανογαλακτώματα με βάση το πυρηνέλαιο παρακολουθήθηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά που μετρήθηκε την ημέρα παρασκευής των νανογαλακτωμάτων και μετά από ένα μήνα.



## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα-Σχολιασμός

---

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα παρασκευής σταθερών ο/ω νανογαλακτωμάτων με την προσθήκη ή μη βιοδραστικών συστατικών, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να γίνει ο προσδιορισμός και η μελέτη των ιδιοτήτων τους. Για τη διευκόλυνση της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων το πειραματικό μέρος της εργασίας χωρίστηκε σε δύο κύρια μέρη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το μέρος Α που περιλαμβάνει την κατασκευή των διαγραμμάτων φάσης και το μέρος Β που περιλαμβάνει τη μελέτη των ιδιοτήτων των παρασκευασμένων νανογαλακτωμάτων και της διατηρησιμότητάς τους.

Τα διαγράμματα φάσης των γαλακτωμάτων παρασκευάστηκαν με ηλιέλαιο, πυρηνέλαιο, ηλιέλαιο και ενσωμάτωση σε αυτό 0,05% κ.β. λυκοπένιο, όπως και με πυρηνέλαιο με ενσωματωμένα 0,05% κ.β. φαινολικά συστατικά από εκχύλιση φύλλων ελιάς και πυρηνέλαιο με ενσωματωμένα 0,05% κ.β. φαινολικά συστατικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα, σε συνδυασμό με γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40. Η αναλογία του ελαίου στα νανογαλακτώματα ήταν 2% κ.β. τελικού μίγματος, σε όλα τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν. Το μέρος Β χωρίστηκε σε τρεις σειρές πειραμάτων. Στην πρώτη σειρά εξετάζεται η δυνατότητα σχηματισμού των ο/ω νανογαλακτωμάτων και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες με βάση το ηλιέλαιο και το πυρηνέλαιο, χρησιμοποιώντας μη-ιοντικούς γαλακτωματοποιητές (Tween 20 και Tween 40). Στη δεύτερη και τρίτη σειρά μελετάται η επίδραση της συγκέντρωσης των βιοδραστικών συστατικών στις ιδιότητες και τη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων. Τα συστατικά που εξετάστηκαν ήταν το λυκοπένιο και φαινολικά από εκχυλίσματα διαφορετικών υλικών (ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς). Τα νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο και ενσωμάτωση λυκοπένιου αποτελούν τη δεύτερη σειρά και παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40, τόσο για τη μελέτη των ιδιοτήτων τους, όσο και για τη διατηρησιμότητά τους. Αντίστοιχα, τα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο και ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών από ελαιοπυρήνα και φύλλα ελιάς αποτελούν την τρίτη σειρά πειραμάτων και χρησιμοποιήθηκαν γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40 για τη μελέτη των ιδιοτήτων, αλλά μόνο γαλακτωματοποιητής Tween 20 για τη μελέτη της διατηρησιμότητάς τους.

Οι ιδιότητες των γαλακτωμάτων που εξετάστηκαν είναι οι εξής: το χρώμα, η θολότητα, το ιξώδες, ο δείκτης διάθλασης, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), η μέση διάμετρος (MD), ο δείκτης σταθερότητας γαλακτώματος (ESI) και η επιφανειακή τάση των νανογαλακτωμάτων. Επιπλέον, σε όλα τα νανογαλακτώματα πραγματοποιήθηκε σε εβδομαδιαία βάση μέτρηση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων για ένα μήνα. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, μετρήθηκε η οξείδωση του λυκοπένιου και η μεταβολή του χρώματός τους. Στην τρίτη σειρά πειραμάτων

μετρήθηκε το ολικό περιεχόμενο σε φαινολικά στα γαλακτώματα μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu.

Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων από τις μετρήσεις, πέραν από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μέσω των διαγραμμάτων κρίνεται απαραίτητη και η στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA και εφαρμογή της μεθόδου ANOVA ανάλυσης διακύμανσης, καθώς και της μεθόδου PCA (Principal Component Analysis). Οι παράγοντες που εξετάστηκαν ήταν το είδος και η ποσότητα του γαλακτωματοποιητή, το είδος του ελαίου και η προσθήκη βιοδραστικών συστατικών. Συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων αυτών στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων.

### Α' μέρος: Διαγράμματα φάσης

Σε πρώτη φάση παρασκευάστηκαν τα διαγράμματα φάσης των απλών γαλακτωμάτων με τα έλαια χωρίς ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών. Ο σχηματισμός των νανογαλακτωμάτων προσδιορίστηκε με οπτική παρατήρηση, δηλαδή μέχρι το σημείο που φαινόταν ότι αφομοιωνόταν το περισσότερο έλαιο και με μετρήσεις της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων. Η περιοχή κάτω από τη γραμμή τάσης στο διάγραμμα φάσης περιγράφει το πεδίο των αναλογιών των τριών συστατικών που με την ανάμιξή τους μπορούν να αποδώσουν νανογαλάκτωμα.

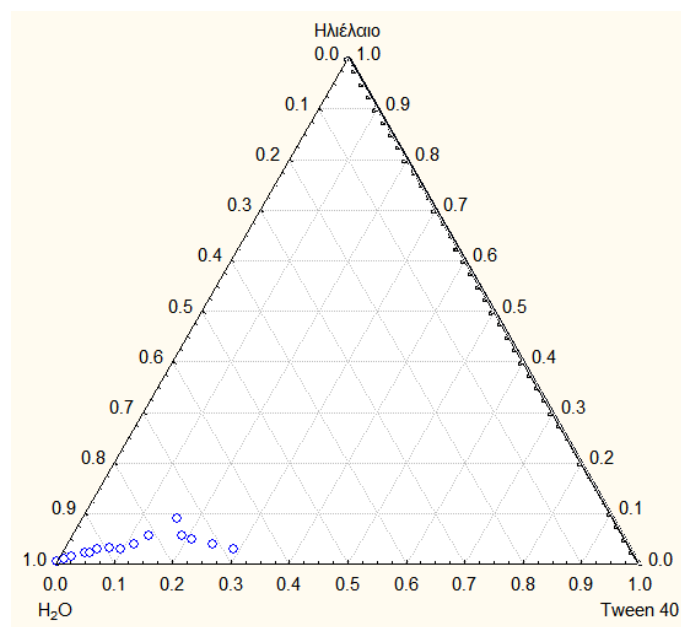
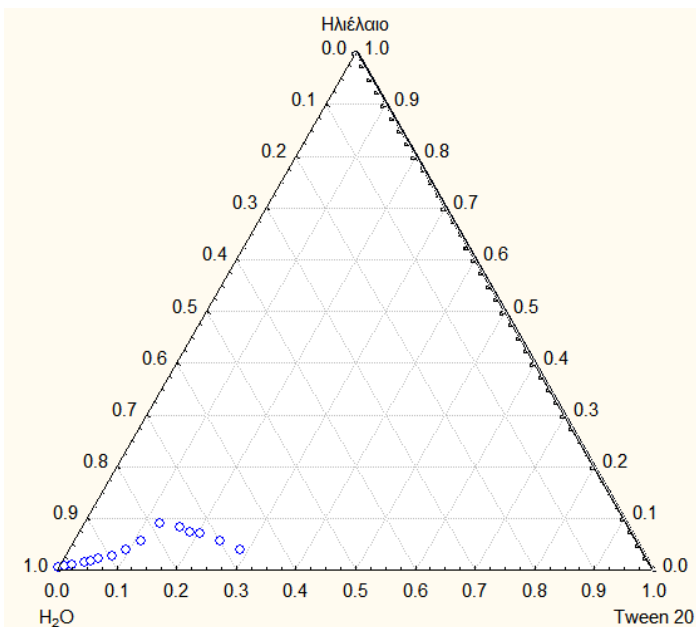


Figure 1a. Διαγράμματα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40

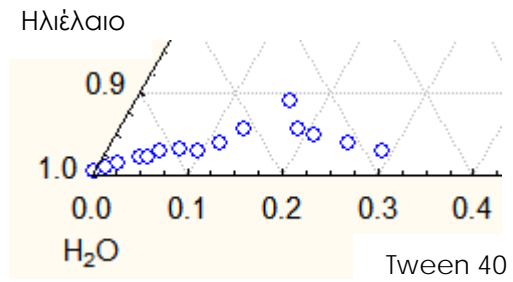
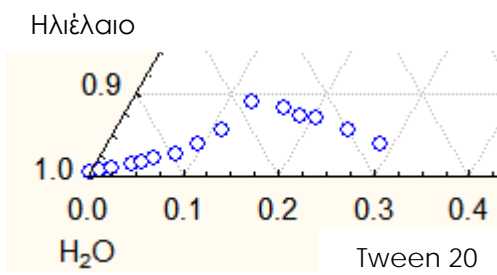


Figure 1b. Διαγράμματα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40 (μεγεθυμένα)

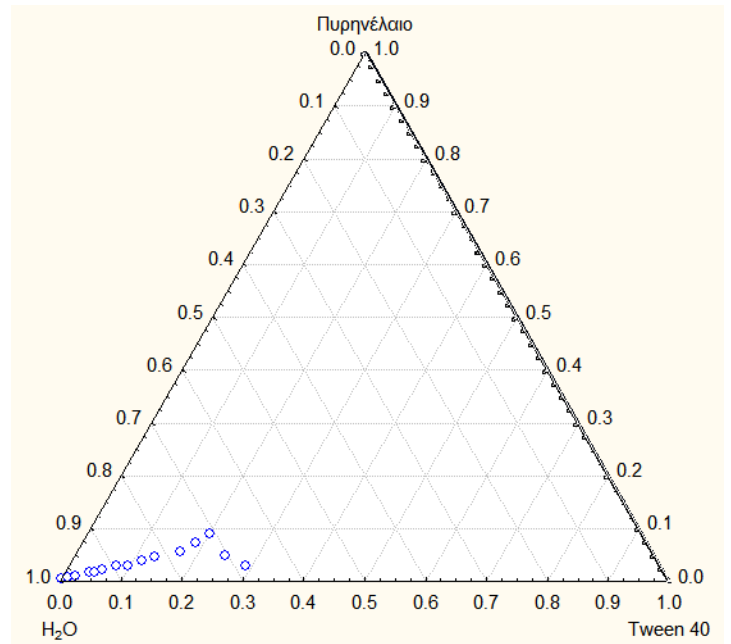
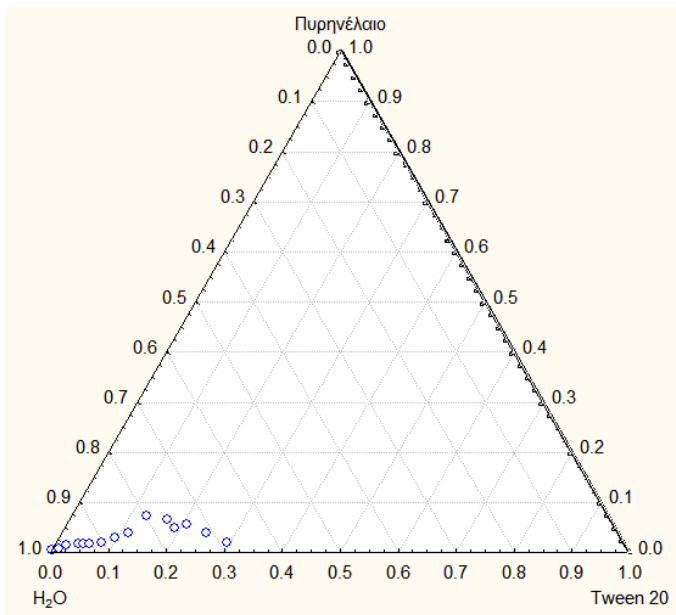


Figure 1c. Διαγράμματα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με πυρηνέλαιο και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40.

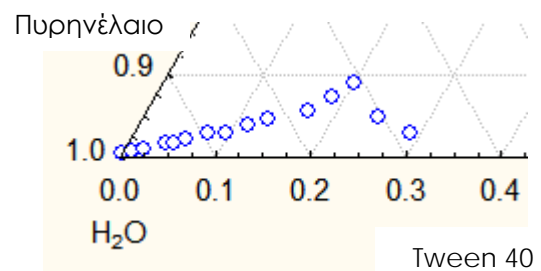
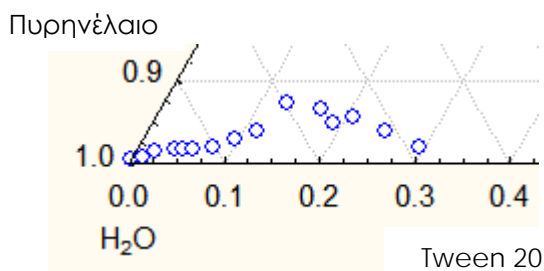


Figure 1d. Διαγράμματα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με πυρηνέλαιο και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40 (μεγεθυμένα).

Σε δεύτερη φάση διαλυτοποιήθηκαν τα λιπόφιλα βιοδραστικά συστατικά (αναλογία 0,05%) στα έλαια μέσω ανάδευσης (stirrer) και υπό ήπια θέρμανση. Ακολουθήθηκε η

ίδια διαδικασία, με τους ίδιους γαλακτωματοποιητές. Προέκυψαν τα εξής διαγράμματα:

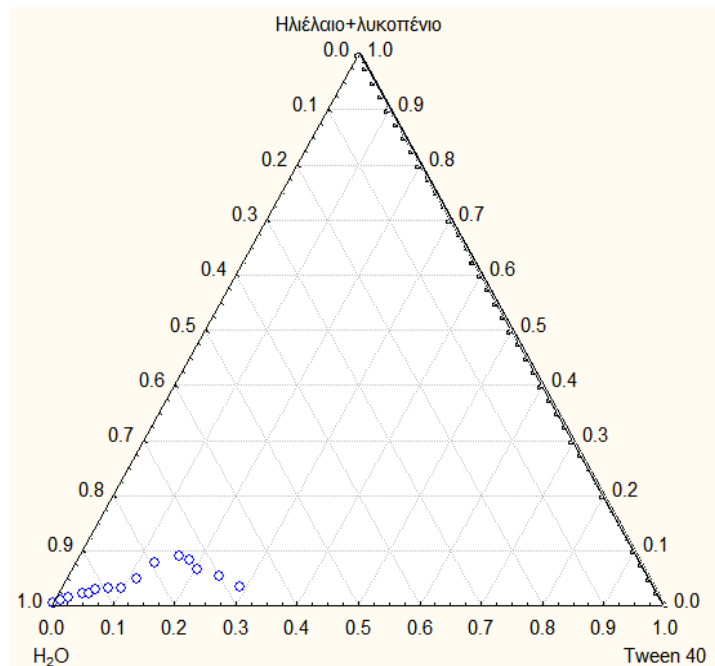
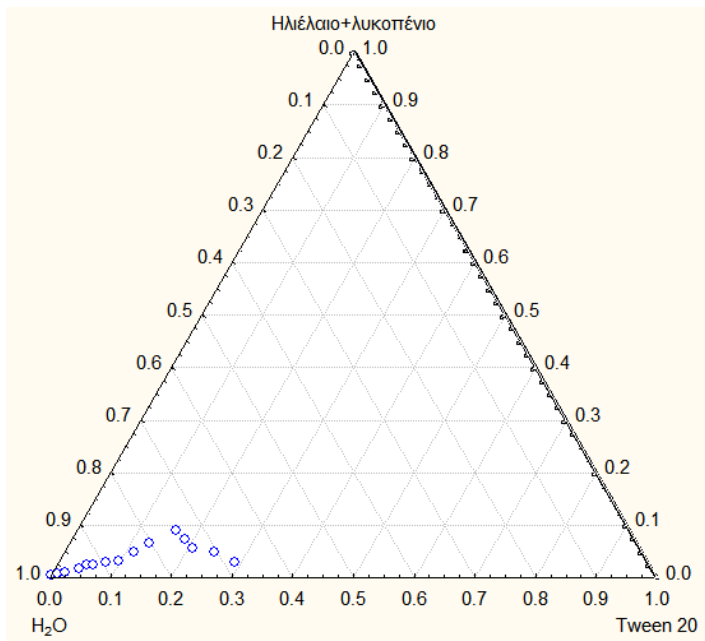


Figure 2a. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το ηλιέλαιο, προσθήκη λυκοπένιου στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40.

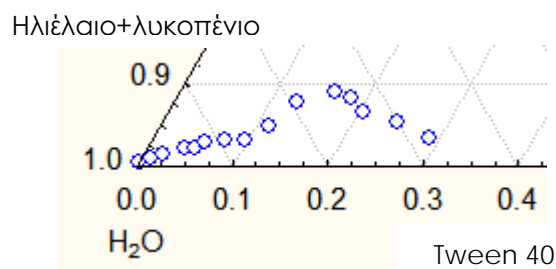
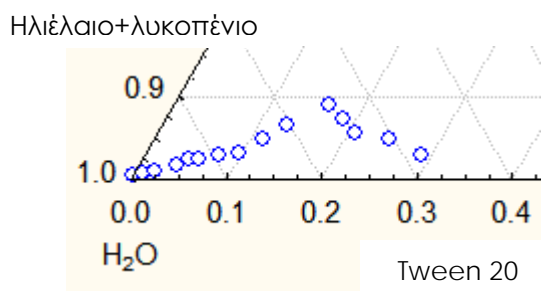


Figure 2b. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το ηλιέλαιο, προσθήκη λυκοπένιου στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40. (μεγεθυμένα).

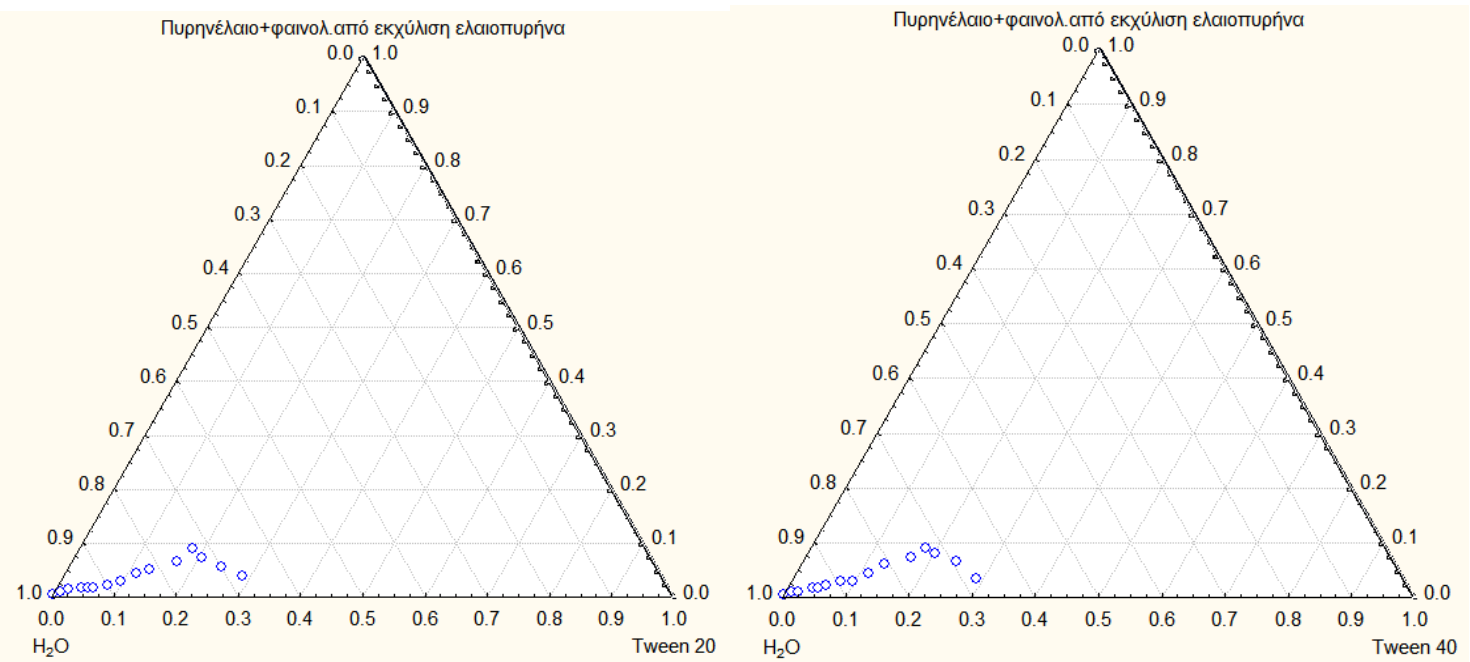


Figure 3a. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το πυρηνέλαιο, προσθήκη φαινολικών συστατικών από εκχύλιση ελαιοπυρήνα στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40.

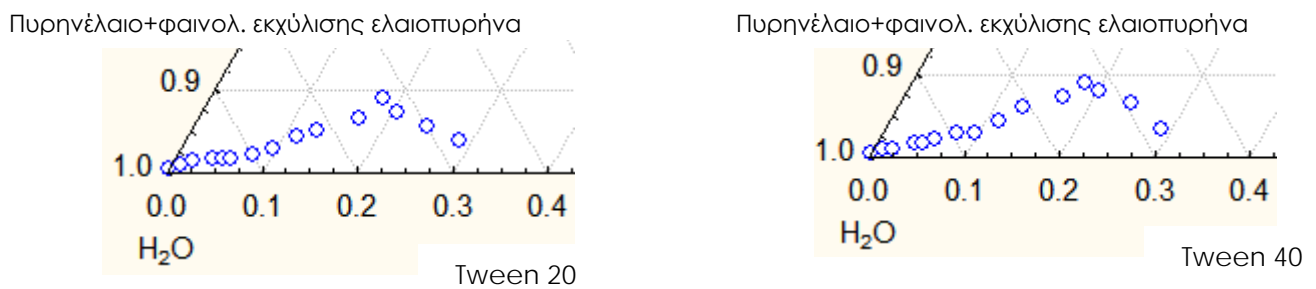


Figure 3b. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το πυρηνέλαιο, προσθήκη φαινολικών συστατικών από εκχύλιση ελαιοπυρήνα στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40 (μεγεθυμένα).

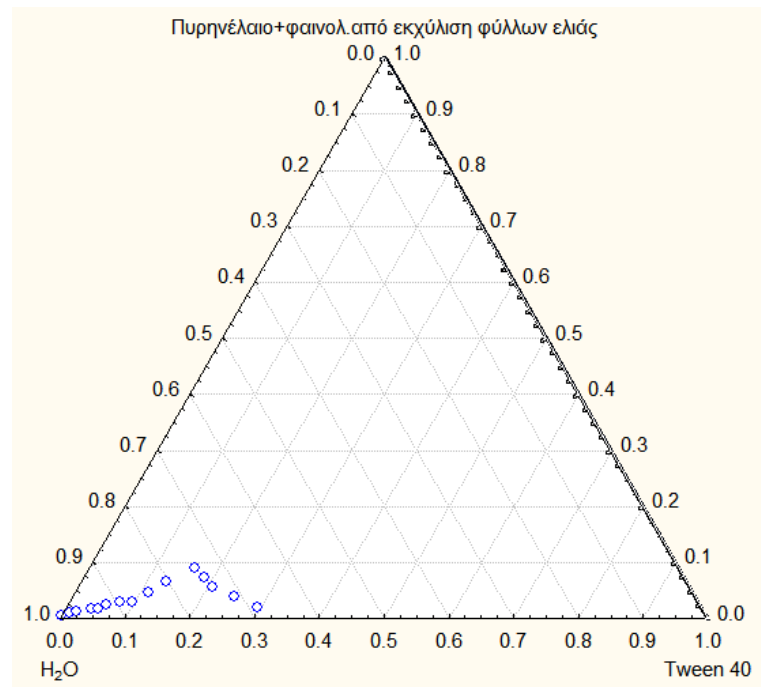
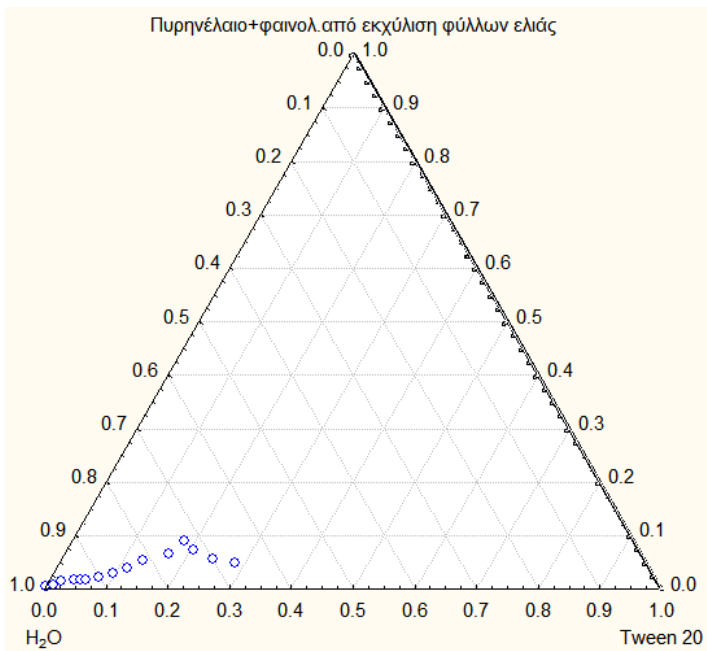


Figure 3c. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το πυρηνέλαιο, προσθήκη φαινολικών συστατικών από εκχύλιση φύλλων ελιάς στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40.

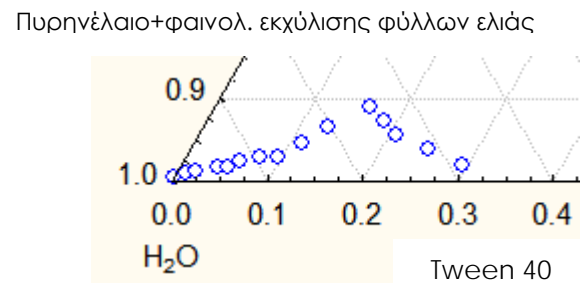
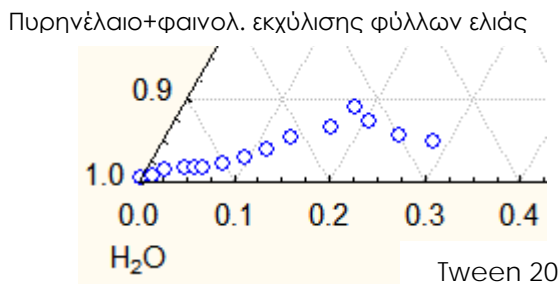


Figure 3d. Διάγραμμα φάσης παρασκευής ο/w νανογαλακτωμάτων με βάση το πυρηνέλαιο, προσθήκη φαινολικών συστατικών από εκχύλιση φύλλων ελιάς στη λιπαρή φάση και γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40 (μεγεθυμένα).

Από τα παραπάνω διαγράμματα προέκυψε αρχικά ότι είναι δυνατή η παρασκευή ο/w νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο και πυρηνέλαιο. Σε όλες τις περιπτώσεις, αύξηση της συγκέντρωσης των γαλακτωματοποιητών μετά από ένα σημείο (πάνω από 12%), οδήγησε σε ένα κορεσμό της ποσότητας ελαίου που αφομοιώνονταν από το σύστημα. Σε ένα σύστημα νανογαλακτώματος, η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή πρέπει γενικώς να είναι υψηλή, ώστε να παρέχεται ο αριθμός των επιφανειοδραστικών μορίων που απαιτούνται για τη σταθεροποίηση των μικροσταγονιδίων που παράγονται κατά την ομογενοποίηση του νανογαλακτώματος. Ωστόσο, η πρόκληση στη παρούσα διπλωματική εργασία ήταν η παρασκευή νανογαλακτωμάτων με τις μικρότερες δυνατές συγκεντρώσεις σε

γαλακτωματοποιητή. Ούτως ή άλλως, στα συστήματα που η συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή είναι μεγαλύτερη από 30% w/w, το γαλάκτωμα έχει τη μορφή ενός παχύρευστου μίγματος και δεν μπορεί να γίνει περαιτέρω διαλυτοποίηση του γαλακτωματοποιητή.

Με βάση τα διαγράμματα φάσης και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από αυτά προσδιορίστηκε το εύρος παρασκευής των νανογαλακτωμάτων. Επιλέχθηκε η αναλογία του ελαίου να είναι σταθερή σε ποσοστό 2% κ.β. τελικού μίγματος. Η αναλογία αυτή προέκυψε με βάση τις μετρήσεις που ελήφθησαν στα γαλακτώματα των διαγραμμάτων φάσης. Μετρήθηκε η διάμετρος των σωματιδίων και έγινε οπτικός έλεγχος της θολότητάς τους. Στις αναλογίες 2%, 4% και 6% κ.β. γαλακτωματοποιητή προέκυψαν νανογαλακτώματα με μικρή μέση διάμετρο σωματιδίων, που ήταν και το ζητούμενο.

Τα νανογαλακτώματα παρασκευάστηκαν εκ νέου και εξετάστηκαν ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη σταθερότητά τους.

### Β' μέρος: Παρασκευή των νανογαλακτωμάτων και μελέτη των ιδιοτήτων τους

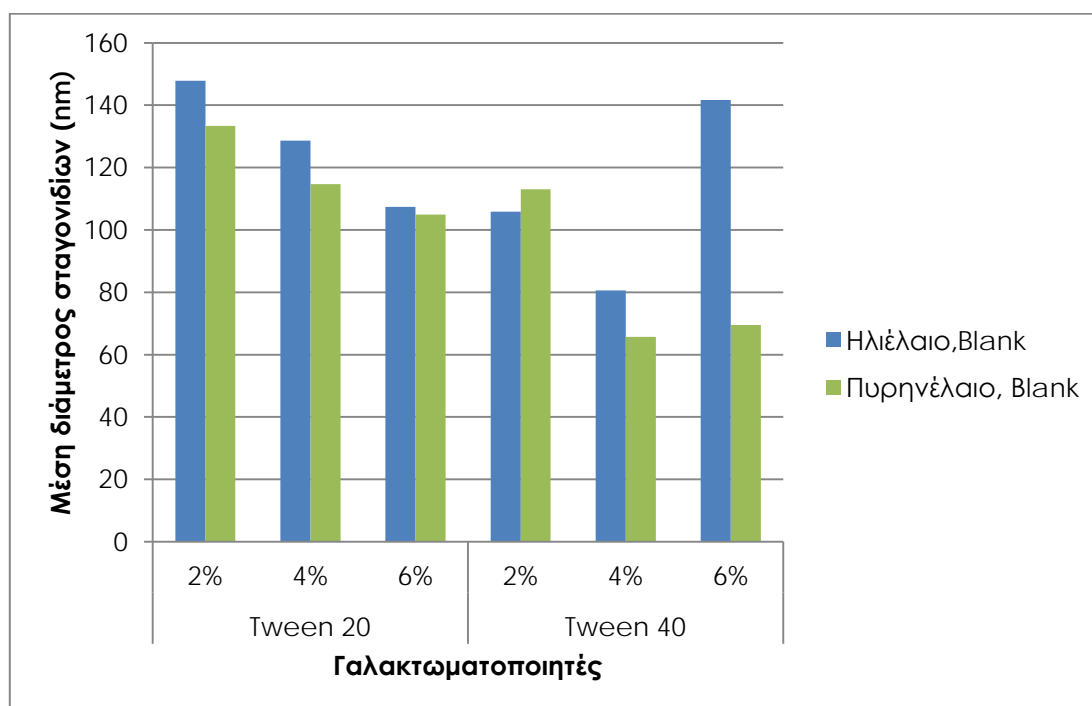
Σύμφωνα με τις αναλογίες που έχουν επιλεγεί από το σχεδιασμό των πειραμάτων (κεφ. 3, πίνακας 16.) θα παρασκευαστούν όλα τα νανογαλακτώματα, εμπλουτισμένα ή μη με βιοδραστικά συστατικά. Ακολουθούν αναλυτικά όλες οι μετρήσεις για τις τρεις σειρές πειραμάτων χωριστά. Στη δεύτερη και τρίτη σειρά στα διαγράμματα των τιμών των ιδιοτήτων των γαλακτωμάτων υπάρχουν και οι αντίστοιχες των μη εμπλουτισμένων ανάλογα το έλαιο που έχει χρησιμοποιηθεί.

Παράλληλα με τις μετρήσεις αναφέρονται και τα αποτελέσματα από τη στατιστική επεξεργασία τους σύμφωνα με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης Anova.

## 4.B.1 Πρώτη Σειρά Πειραμάτων: μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου και πυρηνέλαιου

### 4.B.1.1 Μέση διάμετρος σταγονιδίων (MD)

Αποτελεί τη μέτρηση που χαρακτηρίζει το είδος του γαλακτώματος που έχει προκύψει και αποτελεί σημαντική ένδειξη της σταθερότητάς του. Παρακάτω φαίνεται το μέσο μέγεθος των σωματιδίων των νανογαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν συναρτήσει της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή (% w/w) και του είδους του γαλακτωματοποιητή, για τα δύο έλαια που χρησιμοποιήθηκαν.



**Διάγραμμα 1. Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των ο/w νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο και πυρηνέλαιο ανάλογα με το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή.**

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 1, αυξάνοντας την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, μειώνεται η μέση διάμετρος των σταγονιδίων. Εξαιρέση αποτελεί το νανογαλακτώμα ηλιέλαιου με 6% κ.β. τελικού μίγματος Tween 40.

Τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με πυρηνέλαιο εμφάνισαν μικρότερη μέση διάμετρο από τα νανογαλακτώματα του ηλιέλαιου, σε όλες τις αναλογίες των γαλακτωματοποιητών, εκτός από την αναλογία 2% Tween 40. Στη μία περίπτωση, το νανογαλακτώμα ηλιέλαιου με 2% Tween 40 είχε μέση διάμετρο σωματιδίων 105,9 nm, ενώ το νανογαλακτώμα πυρηνέλαιου 113 nm.

Στα νανογαλακτώματα και των δύο ελαίων, παρατηρώντας τις ίδιες αναλογίες, φαίνεται πως ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 μείωνε τη μέση διάμετρο των σωματιδίων, εκτός από την τιμή 6% Tween 40 του νανογαλακτώματος με ηλιέλαιο.

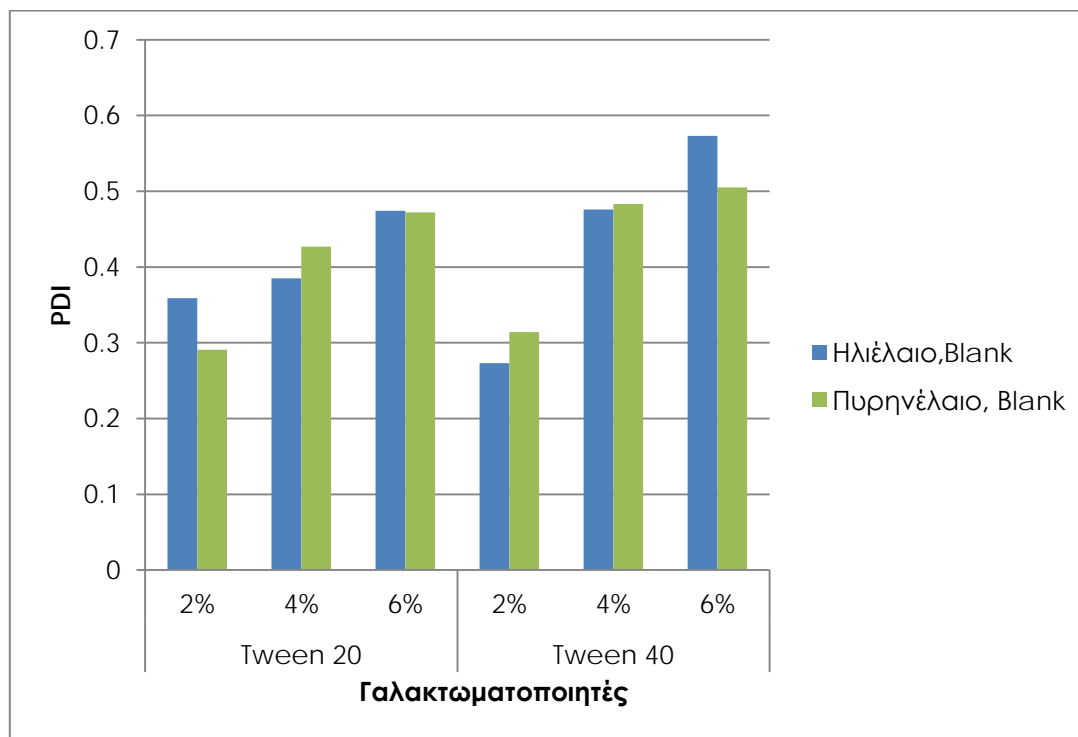


Πιο αναλυτικά, η επίδραση της συγκεκριμένης περιεκτικότητας του Tween 40 στο νανογαλάκτωμα του ηλιέλαιου φαίνεται στο αντίστοιχο διάγραμμα για τη δεύτερη σειρά πειραμάτων.

Φαίνεται πως το είδος του ελαίου δεν επηρέασε σημαντικά το μέγεθος των σταγονιδίων του νανογαλακτώματος, όπως και η επιλογή του γαλακτωματοποιητή και της περιεκτικότητάς του. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τη στατιστική επεξεργασία των παραγόντων που επηρέασαν τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων.

#### 4.B.1.2 Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) υποδεικνύει τον τρόπο με τον οποίο τα σταγονίδια διασπείρονται στη συνεχή φάση. Ζητούμενο είναι ο δείκτης PDI να λάβει χαμηλές τιμές.



**Διάγραμμα 2. Μεταβολή της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) στα ο/w νανογαλακτώματα ηλιέλαιου και πυρηνέλαιου συναρτήσει της αναλογίας και του είδους του γαλακτωματοποιητή.**

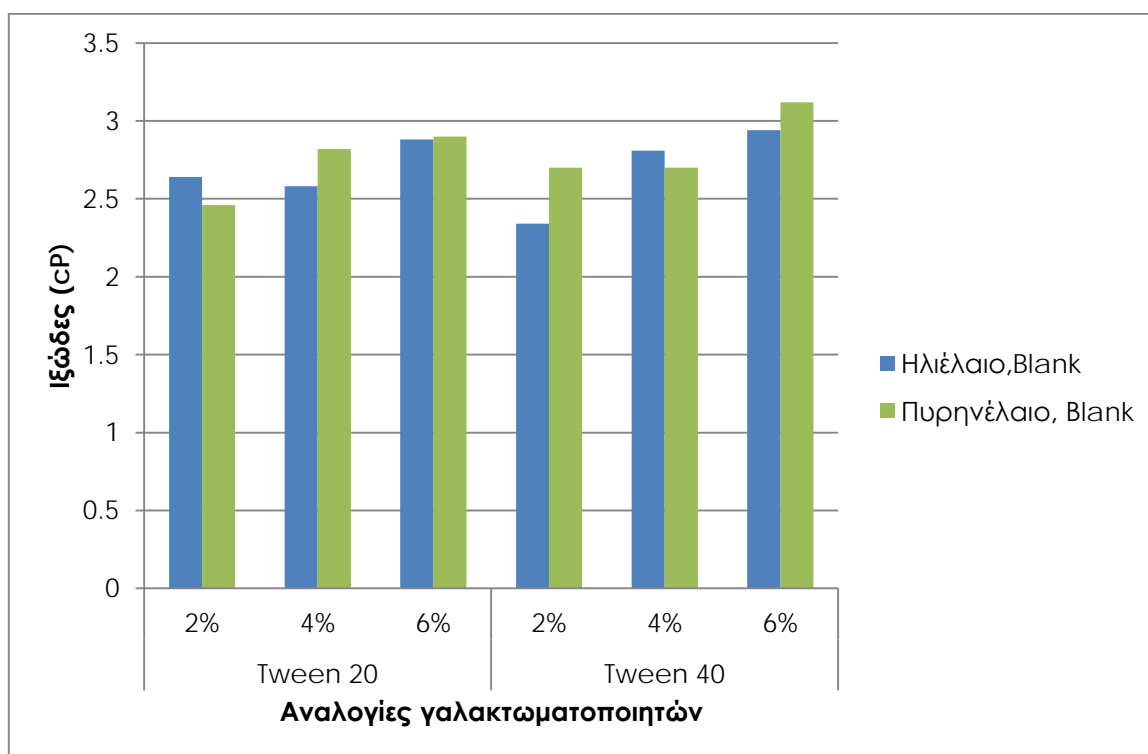
Στα απλά νανογαλακτώματα παρατηρήθηκε πως αυξάνοντας τη συγκέντρωση των γαλακτωματοποιητών ο δείκτης πολυδιασποράς αυξανόταν. Παρά την αύξηση που παρατηρήθηκε οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς παρέμεναν κάτω του 0,5. Στην περίπτωση του γαλακτωματοποιητή Tween 40 (4% και 6%) εμφανίστηκε μεγαλύτερη αύξηση του PDI σε σχέση με τον γαλακτωματοποιητή Tween 20. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι αυτά τα νανογαλακτώματα με το συγκεκριμένο γαλακτωματοποιητή δεν είναι τόσο σταθερά όσο τα νανογαλακτώματα με Tween 20.

Ο δείκτης πολυδιασποράς επηρεάστηκε σημαντικά από την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0.05$ ) και όχι τόσο από το είδος του. Οι τιμές του δείκτη στα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου και ηλιέλαιου δεν επηρεάστηκαν από το είδος του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε.

#### 4.B.1.3 Ιξώδες

Το ιξώδες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του νανογαλακτώματος, τον τύπο και το σχήμα των συσσωματωμάτων, τη συγκέντρωση και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διεσπαρμένων σωματιδίων. Στην παρούσα εργασία τα ο/ω νανογαλακτώματα είναι αναμενόμενο, σύμφωνα με τη μορφή των τελικών διαλυμάτων, να έχουν ιξώδες μεγαλύτερο του νερού, αλλά κοντά στη μονάδα. Η μικρότερη τιμή ιξώδους που παρατηρήθηκε ήταν 2,22 cP, ενώ η μεγαλύτερη 3,54 cP.

Ακολουθεί το διάγραμμα με τη μεταβολή των τιμών του ιξώδους, ανάλογα με το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε και την αναλογία-τύπο του γαλακτωματοποιητή.



**Διάγραμμα 3. Μεταβολή της τιμής του ιξώδους συναρτήσει της αναλογίας και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα.**

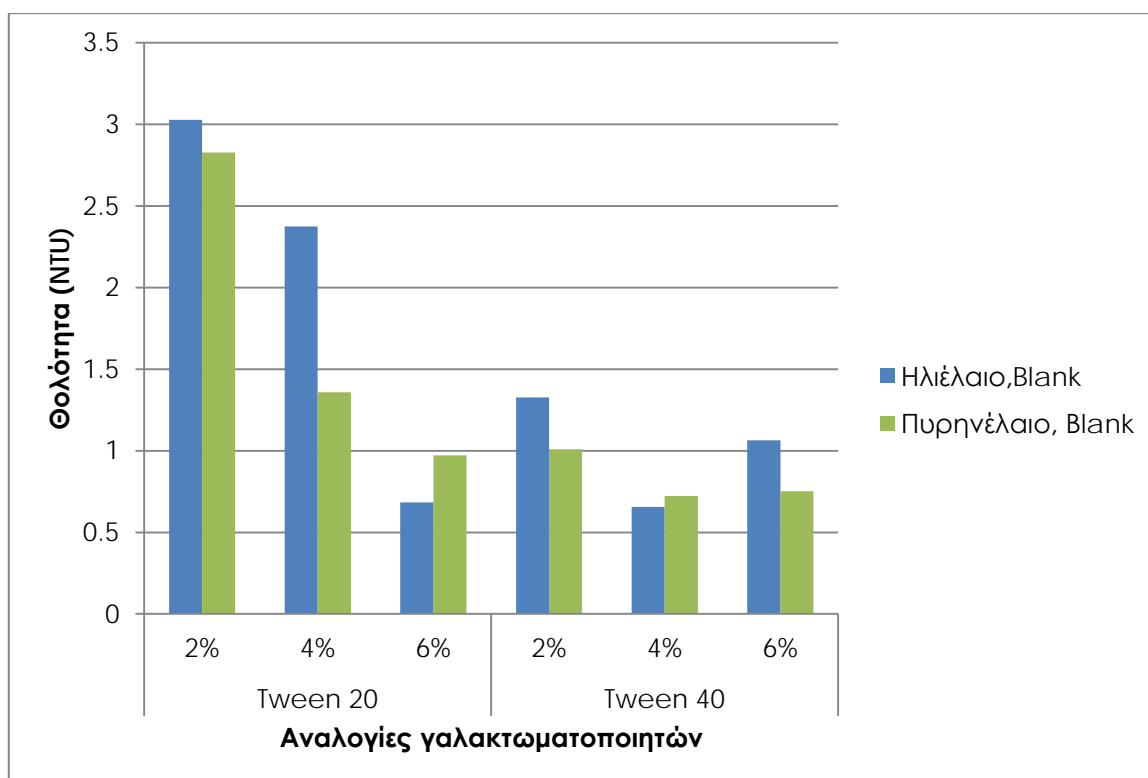
Από το διάγραμμα 3 παρατηρείται πως αυξανόμενης της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή, αυξάνεται και το ιξώδες. Η παρατήρηση αυτή ισχύει για τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με πυρηνέλαιο και ηλιέλαιο. Το είδος του γαλακτωματοποιητή φαίνεται να μην επηρέασε το ιξώδες, καθώς οι τιμές του κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα. Παρατηρείται επίσης ότι αυξανόμενης της

συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή το ιξώδες και για τα δύο είδη γαλακτωματοποιητών αυξανόταν.

Η παρατήρηση αυτή για το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική επεξεργασία, καθώς προέκυψε ότι επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ). Το ιξώδες δε μεταβλήθηκε σημαντικά ούτε από την επιλογή γαλακτωματοποιητή (Tween 20, Tween 40), ούτε από το είδος του ελαίου (ηλιέλαιο ή πυρηνέλαιο).

#### 4.B.1.4 Θολότητα

Τα παρασκευασμένα νανογαλακτώματα αξιολογήθηκαν ως προς τη θολότητά τους, καθώς η θολότητα είναι ένδειξη του μέσου μεγέθους και του βαθμού διασποράς των σταγονιδίων, όπως επίσης ένδειξη και για τη σταθερότητά τους.



**Διάγραμμα 4. Μεταβολή της θολότητας των ο/ω μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων συναρτήσει του είδους και ποσοστού του γαλακτωματοποιητή.**

Όπως φαίνεται από τη μεταβολή των τιμών της θολότητας (0,656-3,026 NTU) στα δύο είδη των νανογαλακτωμάτων, αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε γαλακτωματοποιητή μειώνεται αισθητά η θολότητα. Αυτή η παρατήρηση έγινε αισθητή και οπτικά. Για τις ίδιες αναλογίες γαλακτωματοποιητή παρατηρήθηκε ότι ο Tween 40 στα γαλακτώματα μειώνει αρκετά τη θολότητα, καθιστώντας τα πιο διαυγή. Μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε αναλογία 6% γαλακτωματοποιητή στα

νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο, η θολότητα προέκυψε πιο μεγάλη για την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε Tween 40, από ότι Tween 20. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε γαλακτωματοποιητή στην περίπτωση του Tween 40 (6%) φαίνεται πως πλησίασε τη κρίσιμη συγκέντρωση των μικκυλίων (Critical Micelle Concentration) με αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων που οδηγούν στην αύξηση της θολότητας (Sajbidor 2005). Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων όπου συγκρίνονται τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου με ενσωμάτωση λυκοπένιου και τα απλά, αυτή η αντίθεση φαίνεται πιο έντονα.

Η θολότητα στα απλά νανογαλακτώματα επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0.05$ ). Η χρήση του ηλιέλαιου και πυρηνέλαιου στην παρασκευή των συγκεκριμένων νανογαλακτωμάτων δεν επηρέασε σημαντικά τις τιμές της θολότητάς τους. Τα αποτελέσματα δεν επηρεάστηκαν επίσης από την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή.

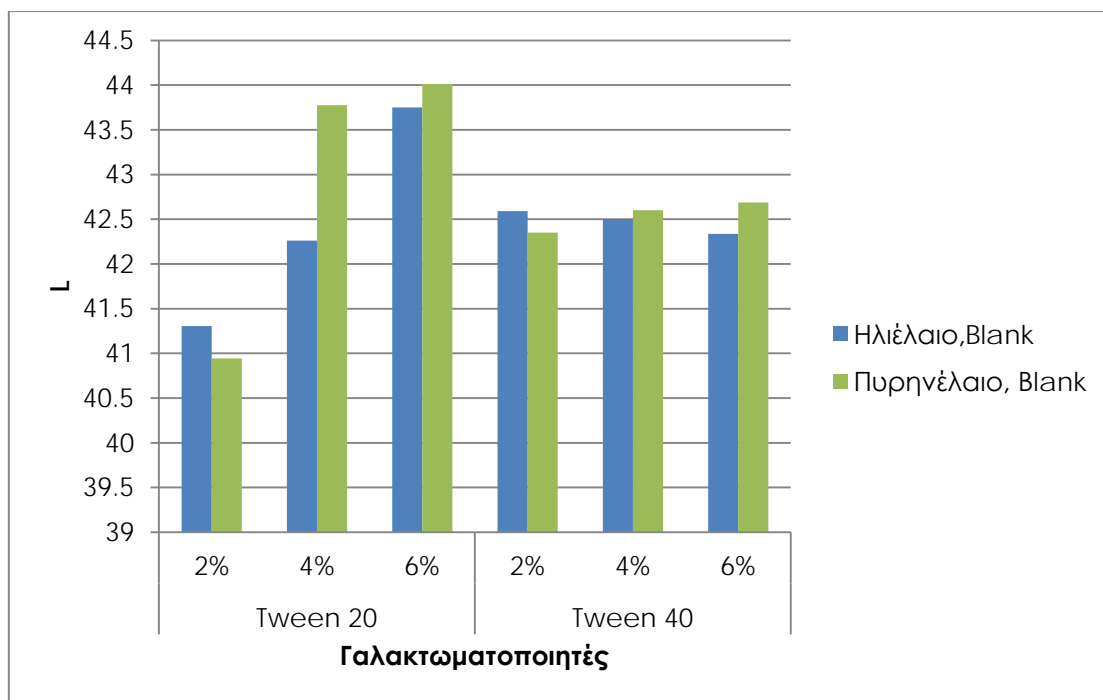
#### 4.B.1.5 Χρώμα

---

Το χρώμα των ουσιών προκύπτει από τον τρόπο της ανάκλασης και μετάδοσης του φωτός. Παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά οι παράμετροι του χρώματος καθώς και το συνολικό χρώμα E που εξετάστηκαν κατά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων.

#### Παράγοντας L

Η μελέτη των πειραματικών δεδομένων του παράγοντα L (δείκτης φωτεινότητας) των γαλακτωμάτων και η περαιτέρω στατιστική επεξεργασία τους (Παράρτημα) έγινε έτσι, ώστε να βρεθεί πώς η φωτεινότητα επηρεάστηκε από τους παράγοντες που εξετάστηκαν.



**Διάγραμμα 5. Μεταβολή της παραμέτρου L ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και το είδος του ελαίου στα μη εμπλουτισμένα γαλακτώματα.**

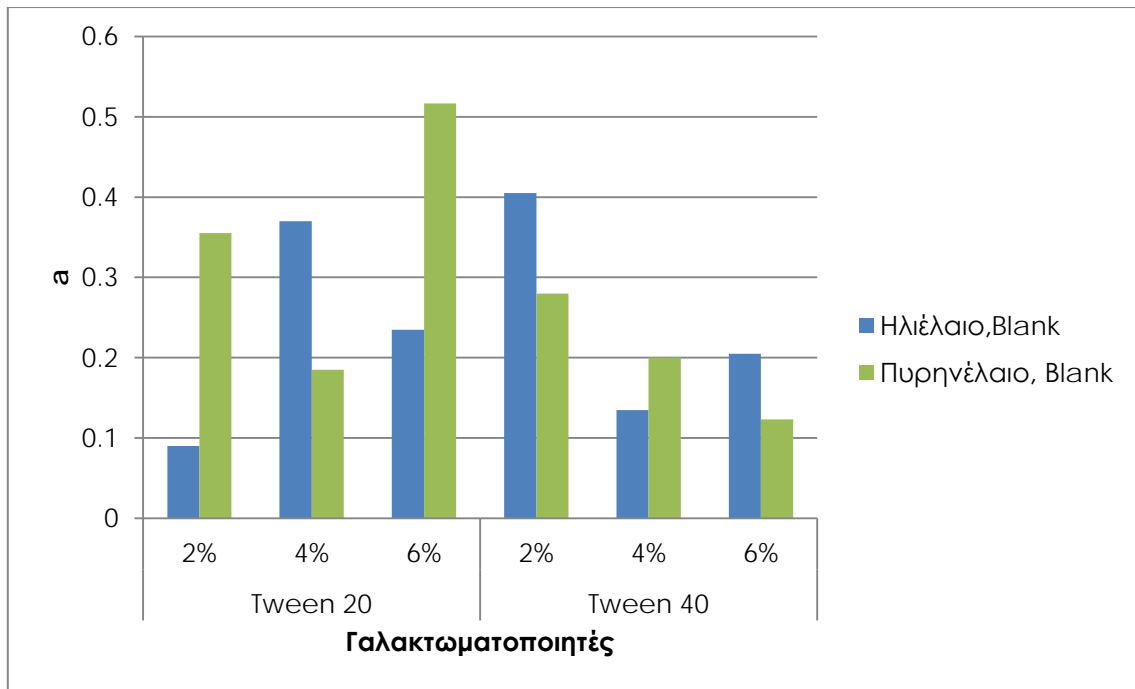
Παρατηρείται πως όσον αφορά το γαλακτωματοποιητή Tween 20, αυξάνοντας την περιεκτικότητά του, αυξανόταν και ο δείκτης φωτεινότητας L του νανογαλακτώματος και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο έλαια (ηλιέλαιο, πυρηνέλαιο) ως λιπαρή φάση. Αντίστοιχα, για το γαλακτωματοποιητή Tween 40 δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα. Σε όλες τις αναλογίες του γαλακτωματοποιητή ο παράγοντας L προέκυψε ότι παρέμεινε στα ίδια επίπεδα.

Το είδος του ελαίου φαίνεται να επηρέασε τα αποτελέσματα, καθώς για το γαλακτωματοποιητή Tween 20, η φωτεινότητα L έλαβε υψηλότερες τιμές στα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο, σχέση με τα απλά νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο.

Στατιστικά η φωτεινότητα των νανογαλακτωμάτων ανεξάρτητα από τη χρήση του ηλιέλαιου ή του πυρηνέλαιου στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων, δε σημείωσε σημαντικές μεταβολές στις τιμές που έλαβε. Αντίστοιχα οι τιμές του παράγοντα L δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή.

### Παράγοντας $\alpha$

Μελετήθηκε ο παράγοντας  $\alpha$  πως επηρεάστηκε από τις πειραματικές παραμέτρους των νανογαλακτωμάτων χωρίς εμπλουτισμένα βιοδραστικά συστατικά. Αποτελεί την ένδειξη του πράσινου ( $\alpha < 0$ ) ή κόκκινου χρώματος που έχει το γαλακτώμα ( $\alpha > 0$ ).



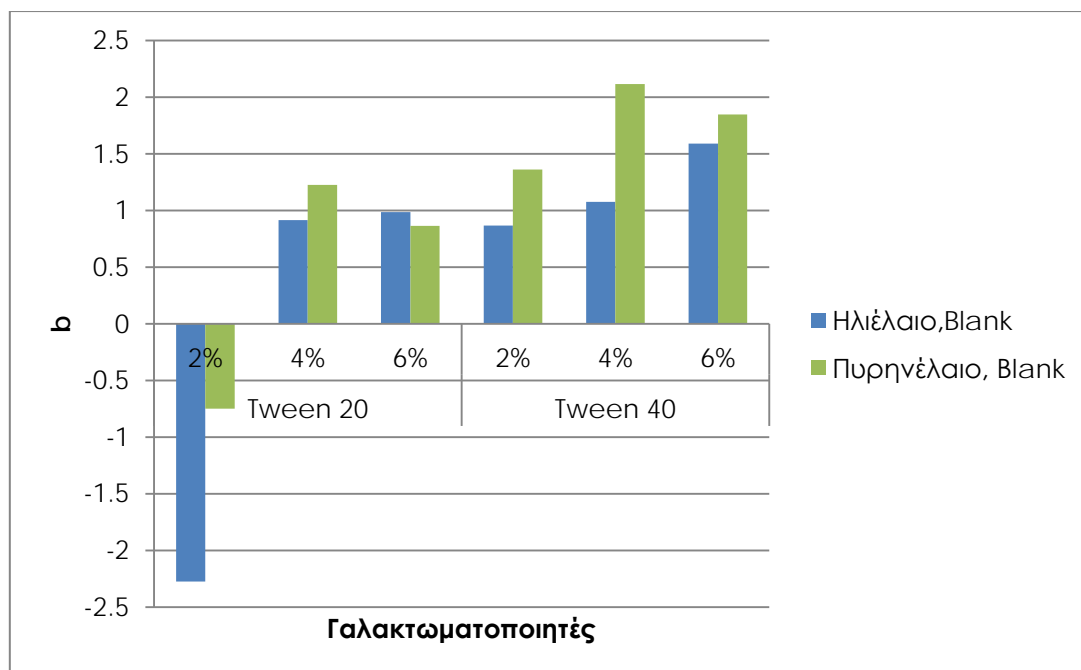
**Διάγραμμα 6. Μεταβολή της παραμέτρου  $\alpha$  ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και το είδος του ελαίου στα μη εμπλουτισμένα γαλακτώματα**

Η τιμή του παράγοντα  $\alpha$  για όλα τα νανογαλακτώματα προέκυψε θετική και κυμάνθηκε από 0,09 μέχρι 0,52.

Οι τιμές που έλαβε ο παράγοντας  $\alpha$  του χρώματος δεν μεταβλήθηκαν από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή που επιλέχθηκαν. Επιπλέον, οι τιμές αυτές κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα για τα δύο έλαια που επιλέχθηκαν, δηλαδή η διαφορετική λιπαρή φάση δεν επέφερε κάποια αλλαγή στις τιμές του παράγοντα  $\alpha$ .

### Παράγοντας $b$

Ο δείκτης  $b$  συμβολίζει το πόσο μπλε ( $b < 0$ ) ή κίτρινο ( $b > 0$ ) προκύπτει ένα νανογαλακτώμα. Η έντονη μεταβολή των τιμών φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



**Διάγραμμα 7. Μεταβολή της παραμέτρου b ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και το είδος του ελαίου στα μη εμπλουτισμένα γαλακτώματα**

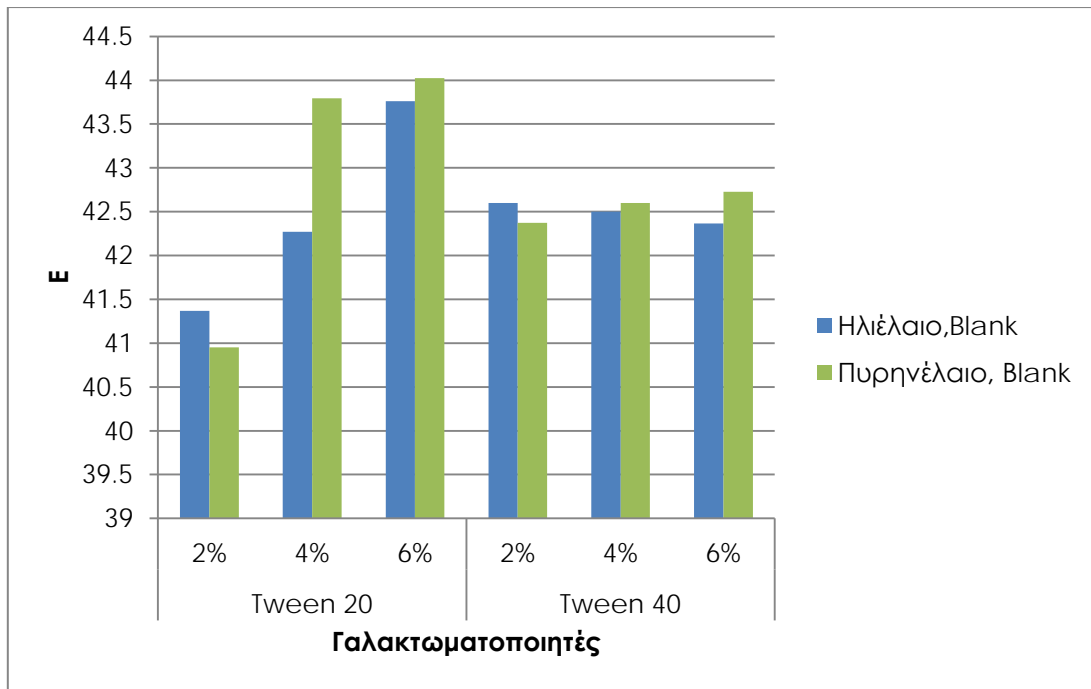
Ο παράγοντας b στα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή Tween 20, παρατηρώντας την ίδια αναλογία, παρουσίασε μικρότερες τιμές σε σχέση με αυτά που είχαν γαλακτωματοποιητή Tween 40. Πιο συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση 2% σημειώθηκε αρνητική τιμή ίση με -2,275 για το γαλάκτωμα με ηλιέλαιο, ενώ -0,75 για το γαλάκτωμα με πυρηνέλαιο. Αυτές οι τιμές δηλώνουν ότι τα συγκεκριμένα γαλακτώματα είχαν μια σχετικά μπλε απόχρωση, γεγονός που είναι αναμενόμενο σύμφωνα με τη θεωρία των νανογαλακτωμάτων. Στο γαλακτωματοποιητή Tween 40 τα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο εμφάνισαν υψηλότερη τιμή b, που δηλώνει ότι ήταν πιο κίτρινα από τα νανογαλακτώματα του ηλιέλαιου. (McClements, D. J., 2011)

Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή, ειδικά στην περίπτωση του Tween 40, φαίνεται καθαρά πως η τιμή b αυξήθηκε.

Η τιμή του παράγοντα b, στατιστικά προκύπτει ότι σημείωσε σημαντικές μεταβολές στα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου με αυτά του πυρηνέλαιου. Αντίθετα η περιεκτικότητα και το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασαν σημαντικά τις τιμές που ελήφθησαν ( $p < 0,05$ ).

### Παράγοντας E

Το πώς επηρεάστηκε το συνολικό χρώμα των νανογαλακτωμάτων από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή, αλλά και το είδος του ελαίου φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



**Διάγραμμα 8. Μεταβολή του συνολικού χρώματος E ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και το είδος του ελαίου στα μη εμπλουτισμένα γαλακτώματα**

Το ολικό χρώμα των νανογαλακτωμάτων φαίνεται πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή αυξήθηκε. Όσο αφορά το είδος του γαλακτωματοποιητή, για το Tween 20 παρατηρείται πως σημειώθηκαν μεγαλύτερες τιμές του ολικού χρώματος από ότι για το Tween 40. Στα νανογαλακτώματα που χρησιμοποιήθηκε ο γαλακτωματοποιητής Tween 40, το ολικό χρώμα δεν μεταβλήθηκε. Το είδος του ελαίου στα απλά νανογαλακτώματα δεν επέφερε κάποια αλλαγή στο συνολικό τους χρώμα.

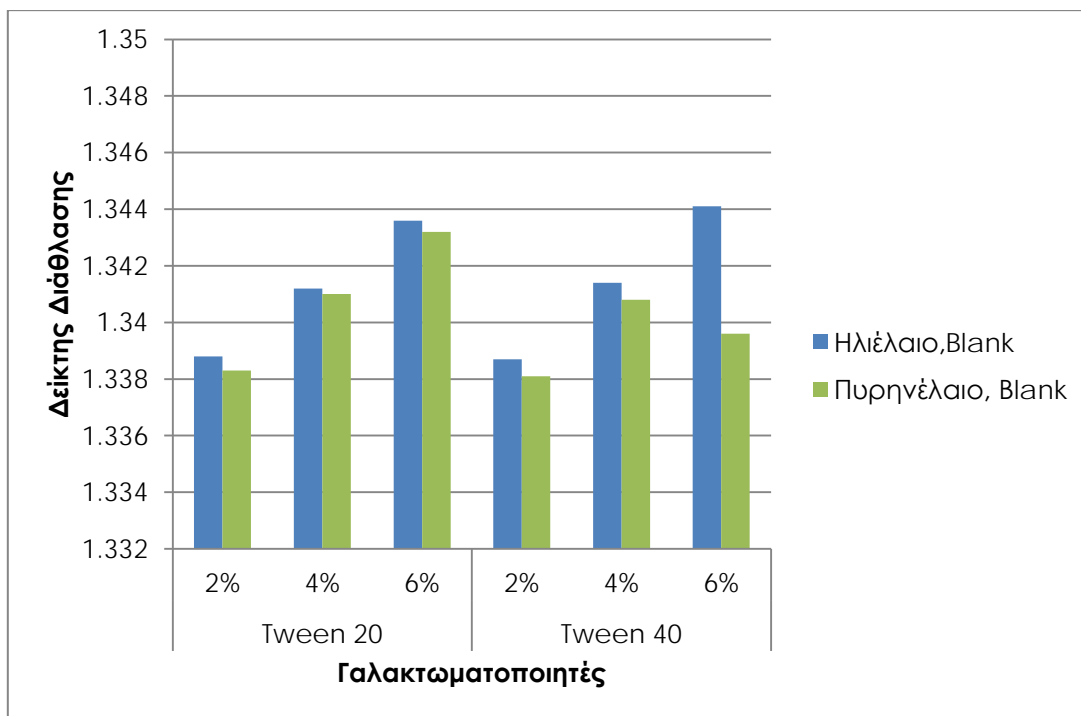
Το συνολικό χρώμα των νανογαλακτωμάτων στα απλά γαλακτώματα προέκυψε ότι εξαρτάται από το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ), σε αντίθεση με το είδος του ελαίου (ηλιέλαιο ή πυρηνέλαιο), σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε.

#### 4.B.1.6 Δείκτης διάθλασης

Η δύναμη και το εύρος των κolloειδών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων στα γαλακτώματα καθορίζονται από τη διηλεκτρική σταθερά και το δείκτη διάθλασης των φάσεων που τα αποτελούν. Επιπλέον, η εμφάνιση ενός γαλακτώματος επηρεάζεται από τη διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ του ελαίου και της υδατικής φάσης, καθώς αυτός καθορίζει το κλάσμα του φωτός που σκεδάζεται από τα σταγονίδια. Ένα γαλακτώμα είναι διαφανές, είτε όταν το μέγεθος των σταγονιδίων είναι της τάξης των nm και μάλιστα μικρότερο από το μήκος κύματος του ορατού φωτός (400-700 nm), είτε όταν το γαλακτώμα έχει ρυθμιστεί έτσι, ώστε οι δύο φάσεις να έχουν τον ιδανικό δείκτη διάθλασης. Στην παρούσα μελέτη οι τιμές του δείκτη



διάθλασης κυμάνθηκαν από 1.3381 έως 1.3447. Παρατηρήθηκε ότι τα νανογαλακτώματα με το μικρότερο δείκτη διάθλασης ήταν αυτά που παρασκευάστηκαν με πυρηνέλαιο.



**Διάγραμμα 9. Μεταβολή του δείκτη διάθλασης στα ο/ω νανογαλακτώματα συναρτήσει του είδους και της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή.**

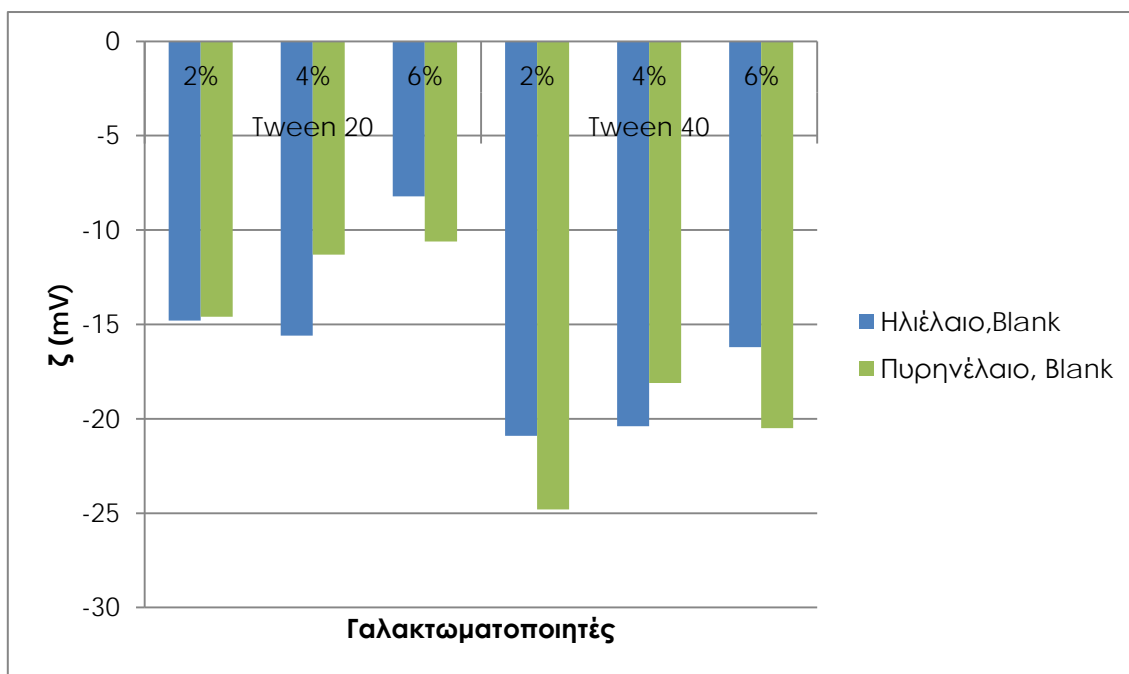
Από το διάγραμμα 10 φαίνεται πως το είδος του γαλακτωματοποιητή στα νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο δεν επηρέασε τις τιμές του δείκτη διάθλασης. Αντίθετα, στα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο ο γαλακτωματοποιητής Tween 40, για τις ίδιες αναλογίες με τον Tween 20, έδωσε πιο μικρές τιμές δείκτη διάθλασης.

Ως προς τις αναλογίες γαλακτωματοποιητή φαίνεται πως με την αύξησή τους, επέρχεται και μια αύξηση του δείκτη διάθλασης, με μόνη εξαίρεση την αναλογία 6% Tween 40 στα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο, όπου ο δείκτης διάθλασης προέκυψε ίσος με 1.3396. Στο νανογαλακτώμα πυρηνέλαιου με αναλογία 4% Tween 40, ο δείκτης διάθλασης ήταν ίσος με 1,3408, δηλαδή δεν σημειώθηκε μεγάλη διαφορά από την αναλογία 6%. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης επηρεάστηκαν σημαντικά από την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ).

Τέλος, παρατηρείται πως στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα, αυτά που παρασκευάστηκαν με πυρηνέλαιο είχαν μικρότερο δείκτη διάθλασης από αυτά του ηλιέλαιου, σε όλες τις αναλογίες και τα είδη γαλακτωματοποιητών. Εντούτοις, από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει πως το είδος του ελαίου δεν επηρέασε σημαντικά τις τιμές του δείκτη διάθλασης.

#### 4.B.1.7 ζ-δυναμικό (Zeta Potential)

Η μεταβολή των τιμών του ηλεκτρικού δυναμικού των μη εμπλουτισμένων γαλακτωμάτων φαίνεται στο διάγραμμα 10. Οι τιμές κυμάνθηκαν από -24,8 mV μέχρι -8,22 mV. Για να θεωρηθεί ένα νανογαλάκτωμα σταθερό θα πρέπει η τιμή του ζ-δυναμικού να είναι πιο χαμηλή από -25mV.



**Διάγραμμα 10. Μεταβολή της τιμής του zeta potential συναρτήσει της αναλογίας και του είδους του γαλακτωματοποιητή στα ο/w νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο και πυρηγέλαιο.**

Ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων επέφερε μείωση (αύξηση κατά απόλυτη τιμή) στο ηλεκτρικό δυναμικό των νανογαλακτωμάτων, σε όλες τις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση του πυρηγέλαιου και της αναλογίας 2% Tween 40 σημειώθηκε η πιο αρνητική τιμή ζ-δυναμικού, γεγονός που δηλώνει ότι πιθανά είναι πιο σταθερό από τα υπόλοιπα.

Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, στην περίπτωση του Tween 20, παρατηρήθηκε αύξηση στο ζ-δυναμικό (μείωση κατά απόλυτη τιμή) των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων.

Οι τιμές του ζ-δυναμικού και για τα δύο έλαια, στις ίδιες αναλογίες ήταν παρεμφερείς. Επιβεβαιώνεται σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, πως το είδος του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά την τιμή του zeta-potential ( $p < 0,05$ ) στα τελικά νανογαλακτώματα, σε αντίθεση με το είδος του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή.

#### 4.B.1.8 Μελέτη της διατηρησιμότητας των μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων

##### Δείκτης σταθερότητας (ESI)

Τα εμπορικά νανογαλακτώματα είναι σημαντικό να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής και σταθερά ποιοτικά χαρακτηριστικά. Για αυτό εξετάστηκε η σταθερότητα των συστημάτων και η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στο Δείκτη Σταθερότητας Γαλακτώματος (ESI).

Πίνακας 17. Μεταβολή του δείκτη ESI (%) των γαλακτωμάτων ανά μία εβδομάδα

Εβδομάδες	Ηλιέλαιο						Πυρηνέλαιο					
	Tween 20			Tween 40			Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
1 <sup>η</sup>	100	96.7	100	100	100	100	99.3	100	100	100	100	100
2 <sup>η</sup>	100	96.7	100	100	100	100	98	100	96.7	100	100	100
3 <sup>η</sup>	97.3	93.6	100	100	100	100	96.7	100	96.7	100	100	100
4 <sup>η</sup>	96.7	86.7	100	100	100	93.3	96.7	93.3	93.3	100	96.7	98

Παρατηρείται πως ο δείκτης σταθερότητας του γαλακτώματος με την πάροδο του χρόνου δεν μεταβλήθηκε αισθητά στα περισσότερα γαλακτώματα. Σε αυτά τα οποία παρουσιάστηκε κάποια μεταβολή ήταν πολύ μικρή και αναμενόμενη, μετά το πέρας ενός μήνα. Επομένως, επιβεβαιώνεται πως τα νανογαλακτώματα έχουν υψηλή κινητική σταθερότητα. Εντούτοις, η διαφορετική λιπαρή φάση που χρησιμοποιήθηκε στα απλά νανογαλακτώματα δεν επηρέασε την τελική σταθερότητά τους, όπως και το είδος και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή (επιβεβαιώνεται σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης ANOVA).

##### Μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MD)

Μελετήθηκε η μεταβολή της διαμέτρου των σωματιδίων των νανογαλακτωμάτων που σημειώθηκε ανά μία εβδομάδα για διάστημα ενός μήνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 18. Μεταβολή τη μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων ελαίου στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο κατά την πάροδο του χρόνου

Εβδομάδες	Ηλιέλαιο					
	Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
<b>Ημέρα παρασκευής</b>	147.9	128.6	107.4	105.9	80.6	141.7
1 <sup>η</sup>	140.8	125.9	99.6	103.2	86.9	136.4
2 <sup>η</sup>	142.5	130.2	104.3	110.7	73.4	172.7
3 <sup>η</sup>	147.5	126.5	116.1	101.1	79.0	137.4
4 <sup>η</sup>	146.7	128.4	121.7	101.8	91.6	159.7

Πίνακας 19. Μεταβολή τη μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων ελαίου στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο κατά την πάροδο του χρόνου

Εβδομάδες	Πυρηνέλαιο					
	Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
<b>Ημέρα παρασκευής</b>	133.4	114.7	104.9	113	65.7	69.5
1 <sup>η</sup>	126.3	116.6	119.4	113.8	69.4	69.3
2 <sup>η</sup>	128.1	111.1	105.3	101.3	75.5	76.8
3 <sup>η</sup>	131.6	127.3	112.7	100.3	69.4	69.1
4 <sup>η</sup>	131.4	110.3	120	100.3	71.1	70.0

Από τους πίνακες 18, 19 φαίνεται πως η διακύμανση των τιμών της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων δεν ήταν μεγάλη. Παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση που ήταν και αναμενόμενη. Παρατηρώντας μόνο τη διάμετρο των σωματιδίων φαίνεται πως τα νανογαλακτώματα με αυτές τις διαμέτρους είναι αρκετά σταθερά και διατηρούνται. Ταυτόχρονα με τη διάμετρο των σωματιδίων μετρήθηκε και ο δείκτης πολυδιασποράς ο οποίος και αυτός αντίστοιχα παρουσίασε μικρή αύξηση. Από τους παράγοντες που μελετήθηκαν (είδος, αναλογία γαλακτωματοποιητή, είδος ελαίου και χρόνος της διατήρησης) προέκυψε ότι η μέση διάμετρος των σταγονιδίων με την πάροδο του χρόνου επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ). Η χρήση είτε του ηλιέλαιου, είτε του πυρηνέλαιου στα απλά νανογαλακτώματα, δεν επηρέασε τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων με την πάροδο του χρόνου.

### Θολότητα

Η θολότητα ήδη είναι γνωστό ότι αποτελεί ένδειξη για τη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων. Η αύξησή της συμβολίζει τη μεταβολή της σταθερότητας του νανογαλακτώματος. Στον πίνακα 20 επισυνάπτονται οι τιμές της θολότητας που μετρήθηκαν την ημέρα παρασκευής των απλών νανογαλακτωμάτων και μετά από ένα μήνα.

Πίνακας 20. Μεταβολή της θολότητας των μη εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων μετά από ένα μήνα διατήρησής τους.

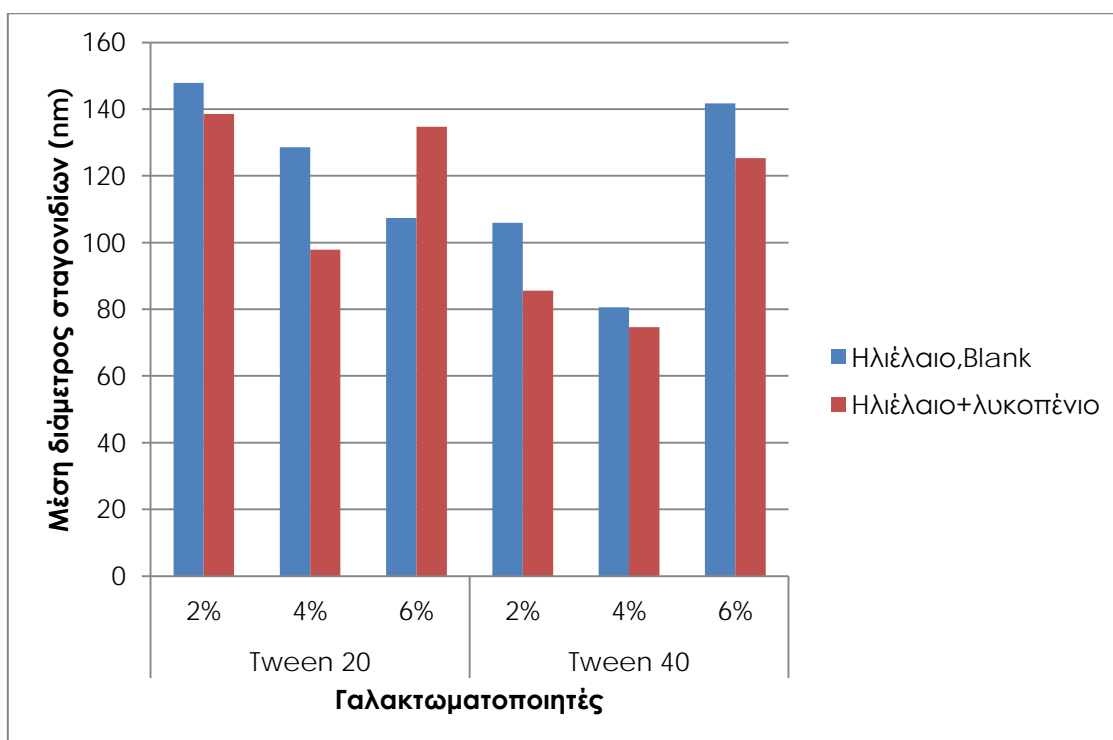
			Θολότητα	
Είδος γαλακτωμάτων			Ημέρα παρασκευής	1 μήνας
Ηλιέλαιο	Tween 20	2%	3.027	3.223
		4%	2.373	2.760
		6%	0.684	0.849
	Tween 40	2%	1.326	1.737
		4%	0.656	0.806
		6%	1.064	1.168
Πυρηνέλαιο	Tween 20	2%	2.827	2.852
		4%	1.357	1.75
		6%	0.973	1.033
	Tween 40	2%	1.008	1.146
		4%	0.722	0.955
		6%	0.752	0.986

Η θολότητα των νανογαλακτωμάτων αυξήθηκε όπως και ήταν αναμενόμενο, καθώς με το χρόνο μειώνεται η διατηρησιμότητά τους και μεταβάλλεται η σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων. Σύμφωνα, με τη θεωρία η θολότητα συνδέεται με τη διάμετρο των σωματιδίων και επομένως η αύξηση της μέσης διαμέτρου που παρατηρήθηκε, συμφωνεί με την αύξηση της θολότητας. Φαίνεται πως η αυξημένη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μικρότερη μεταβολή της θολότητας με το χρόνο.

## 4.B.2 Δεύτερη Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με λυκοπένιο νανογαλακτώματα ηλιέλαιου

### 4.B.2.1 Μέση διάμετρος σταγονιδίων (MD)

Η τιμή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των εμπλουτισμένων γαλακτωμάτων κυμάνθηκε από 74,65 μέχρι 147,9 nm.



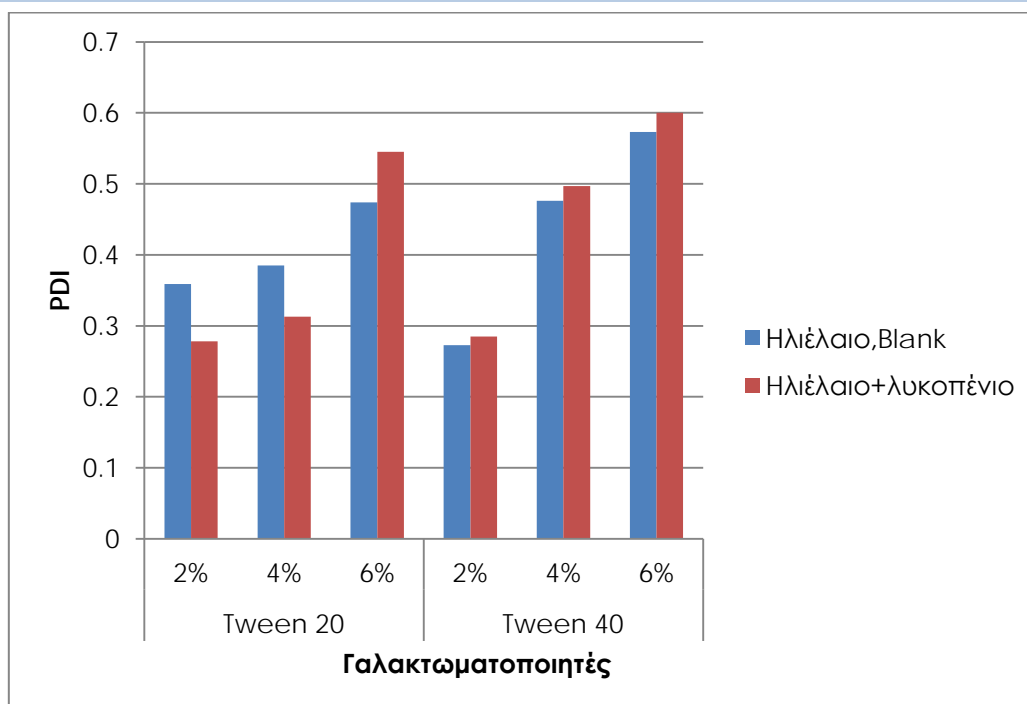
**Διάγραμμα 11. Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των ο/w νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και την παρουσία του λυκοπένιου**

Παρατηρείται στις αναλογίες 2% και 4% των δύο γαλακτωματοποιητών, ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε γαλακτωματοποιητή, οδηγεί σε μείωση της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με λυκοπένιο. Αντίθετα, η αναλογία 6% Tween 40 οδήγησε σε αύξηση της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων στα νανογαλακτώματα με το ηλιέλαιο και με το ηλιέλαιο εμπλουτισμένο με λυκοπένιο. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στη συγκέντρωση των μικκυλίων που μπορεί να έχει ξεπεράσει την κρίσιμη και η αναλογία του ελαίου (2%) δεν είναι αρκετή για την ποσότητα του γαλακτωματοποιητή που έχει διαλυτοποιηθεί στην υδατική φάση.

Από το διάγραμμα 11 φαίνεται ότι ο εμπλουτισμός των νανογαλακτωμάτων με λυκοπένιο λειτούργησε θετικά, μειώνοντας τη μέση διάμετρο των νανογαλακτωμάτων σε σχέση με αυτά που δεν περιείχαν λυκοπένιο. Εξαιρέση στην παρατήρηση αυτή αποτελεί η αναλογία 6% Tween 20, όπου το νανογαλακτώμα με ηλιέλαιο είχε μέση διάμετρο 107,4 nm, ενώ το εμπλουτισμένο νανογαλακτώμα με λυκοπένιο 134,7 nm.

Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με ενσωμάτωση λυκοπένιου δεν μεταβλήθηκε σημαντικά από την παρουσία του βιοδραστικού συστατικού. Επιπλέον, αντίστοιχη παρατήρηση προκύπτει και για το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή, σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

#### 4.B.2.2 Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)



**Διάγραμμα 12. Μεταβολή της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) στα ο/ω νανογαλακτώματα ηλιέλαιου συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού.**

Η προσθήκη του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου αύξησε το δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων. Εξαιρεση σε αυτήν την παρατήρηση αποτελούν οι αναλογίες γαλακτωματοποιητή 2% και 4% Tween 20.

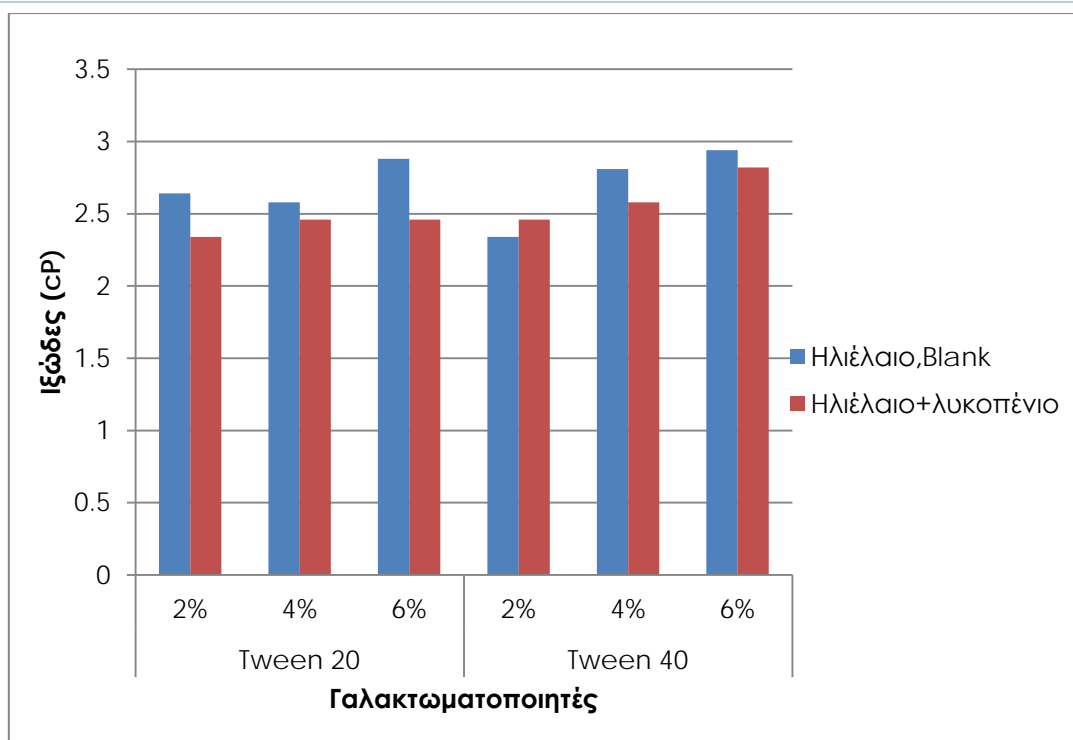
Ενώ το είδος του γαλακτωματοποιητή φαίνεται να μην επηρέασε το δείκτη PDI, αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή επέφερε μια αύξηση και στο δείκτη πολυδιασποράς.

Όπως και στα μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ο δείκτης PDI ξεπέρασε την τιμή του 0,5 για τα νανογαλακτώματα που είχαν αναλογία 6% Tween 40 και 6% Tween 20 για τα νανογαλακτώματα με λυκοπένιο. Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική για τη σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων.

Ο δείκτης πολυδιασποράς, από τους παράγοντες που μελετήθηκαν, δηλαδή το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή, αλλά και τον εμπλουτισμό του νανογαλακτώματος ηλιέλαιου με λυκοπένιο, πρόκυψε ότι επηρεάστηκε σημαντικά

από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ). Η παρουσία του βιοδραστικού συστατικού δεν επέφερε κάποια σημαντική μεταβολή στην τιμή του PDI.

#### 4.B.2.3 Ιξώδες



**Διάγραμμα 13. Μεταβολή της τιμής του ιξώδους στα ο/w νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού.**

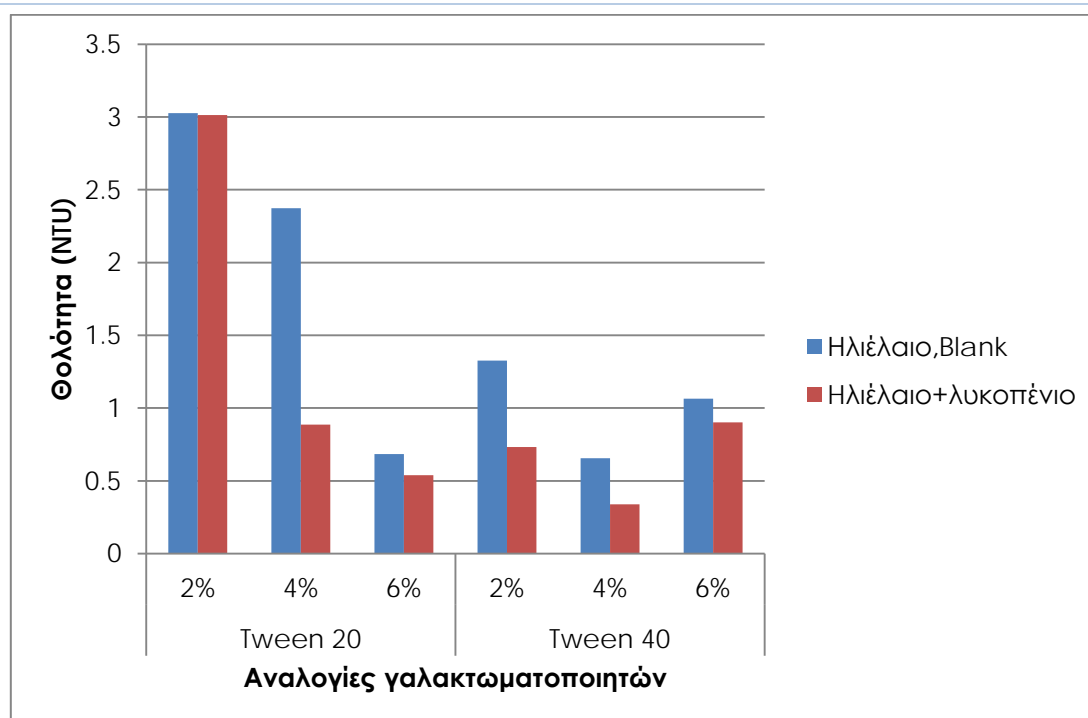
Παρατηρείται πως η παρουσία του λυκοπένιου οδήγησε σε μείωση της τιμής του ιξώδους στα νανογαλακτώματα, συγκριτικά με αυτά που δεν περιείχαν λυκοπένιο. Επιπλέον, όπως ίσχυε και στα μη εμπλουτισμένα γαλακτώματα ηλιέλαιου, το συμπέρασμα ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή αυξάνει το ιξώδες ισχύει και στην περίπτωση των εμπλουτισμένων με λυκοπένιο γαλακτωμάτων.

Η σύγκριση της κάθε αναλογίας των δύο ειδών γαλακτωματοποιητή έδειξε ότι δεν μεταβάλλεται το ιξώδες είτε χρησιμοποιείται Tween 20, είτε Tween 40.

Το ιξώδες των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων ηλιέλαιου με λυκοπένιο επηρεάστηκε σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ). Αν και εμπλουτίστηκαν τα νανογαλακτώματα με το συγκεκριμένο βιοδραστικό συστατικό, οι τιμές του ιξώδους δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από αυτό.



#### 4.B.2.4 Θολότητα



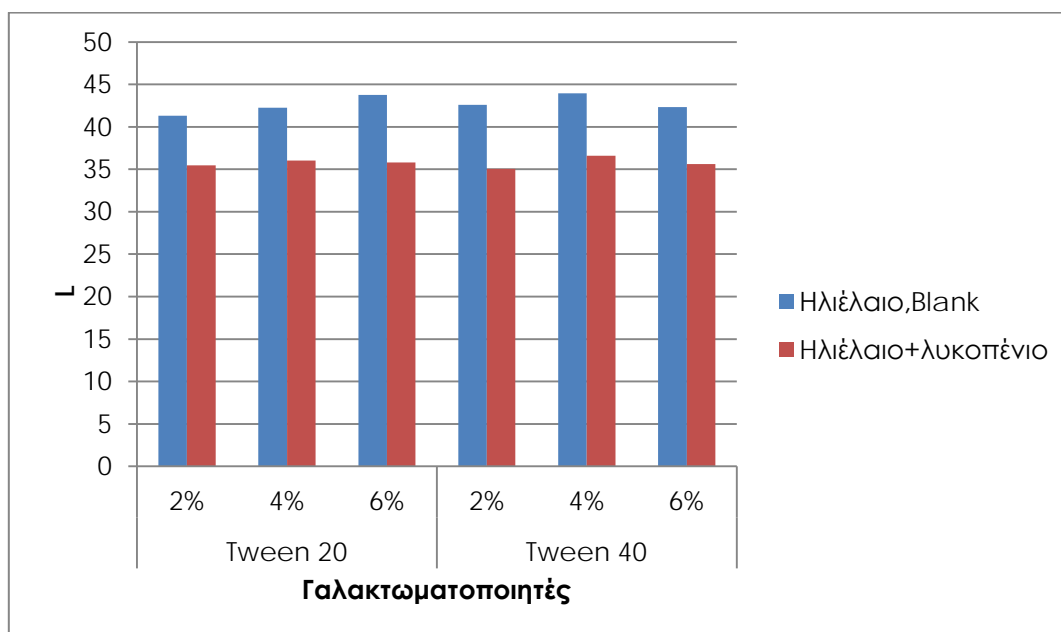
**Διάγραμμα 14. Μεταβολή της τιμής της θολότητας στα ο/w νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού.**

Οι μεγαλύτερες τιμές θολότητας που παρατηρήθηκαν ήταν στην αναλογία 2% Tween 20. Το νανογαλάκτωμα χωρίς την ενσωμάτωση λυκοπένιου είχε θολότητα 3,026 NTU, ενώ το νανογαλάκτωμα με την ενσωμάτωση 3,014 NTU. Η μικρότερη τιμή σημειώθηκε στην αναλογία 4% Tween 40 και ήταν ίση με 0,656 NTU για το νανογαλάκτωμα χωρίς ενσωμάτωση, ενώ 0,35 NTU για το νανογαλάκτωμα με λυκοπένιο.

Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται καθαρά ότι αυξάνοντας τις αναλογίες του γαλακτωματοποιητή η θολότητα μειώνεται. Επιπλέον, για τις ίδιες αναλογίες φαίνεται από το διάγραμμα 14 ότι η ενσωμάτωση του λυκοπένιου οδήγησε σε μείωση της θολότητας. Αντίθετα, στην αναλογία 6% γαλακτωματοποιητή Tween 40, που επισημάνθηκε και στα απλά νανογαλακτώματα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της θολότητας. Στη συγκεκριμένη ποσότητα ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 λειτούργησε καλύτερα ως προς τη θολότητα των τελικών νανογαλακτωμάτων σε σύγκριση με τον Tween 40, για τα εμπλουτισμένα και μη νανογαλακτώματα.

Εντούτοις, στατιστικά για τα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου εμπλουτισμένα με λυκοπένιο, προέκυψε ότι η θολότητά τους δε μεταβάλλεται σημαντικά ούτε από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή, αλλά ούτε και από τον εμπλουτισμό τους με το εν λόγω βιοδραστικό συστατικό.

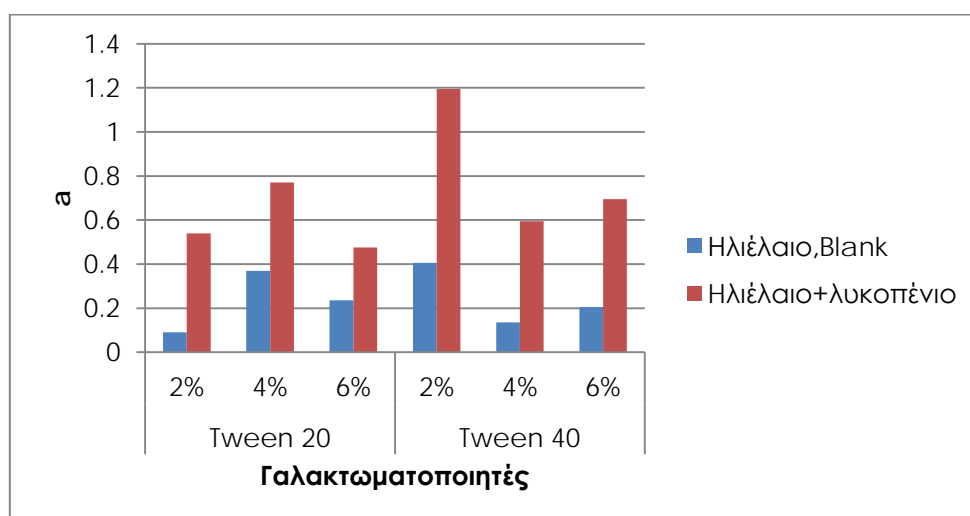
Παράγοντας L



Διάγραμμα 15. Μεταβολή της παραμέτρου L ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία του λυκοπένιου στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα ηλιέλαιου.

Η προσθήκη του λυκοπένιου φαίνεται πως μείωσε τη φωτεινότητα του νανογαλακτώματος που ήταν εμπλουτισμένο σε αυτό και επηρέασε σημαντικά τις τιμές που προέκυψαν για τον παράγοντα L ( $p < 0,05$ ). Ωστόσο, το είδος και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρέασε καθόλου τα αποτελέσματα, όπως επιβεβαιώνεται και στατιστικά.

Παράγοντας a

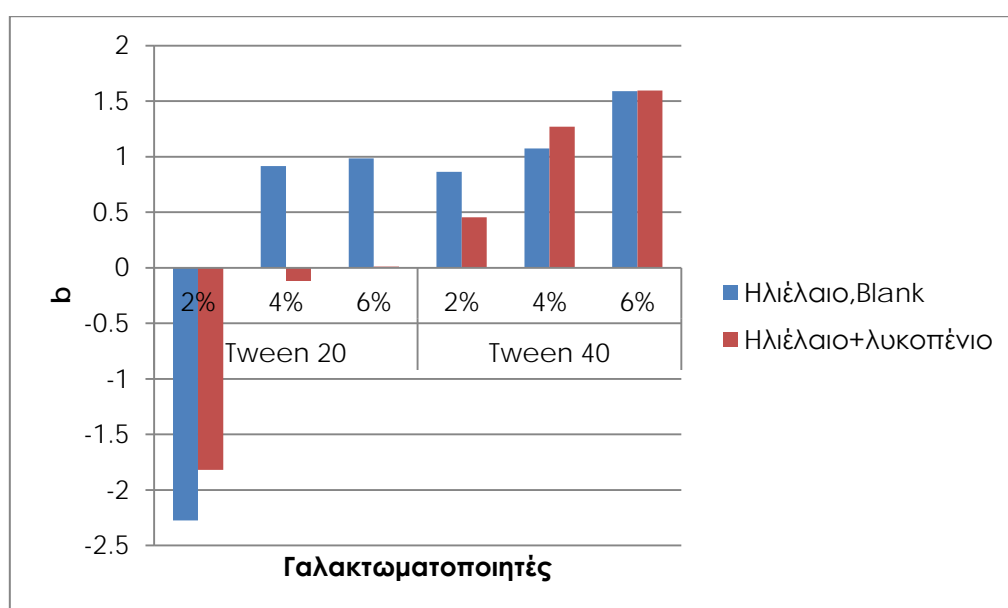


Διάγραμμα 16. Μεταβολή της παραμέτρου a ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία του λυκοπένιου στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα ηλιέλαιου.

Στο διάγραμμα 16 φαίνεται καθαρά η επίδραση του λυκοπένιου στην παράμετρο  $\alpha$  του ολικού χρώματος, που δηλώνει την κοκκινωπή απόχρωση του νανογαλακτώματος. Η μεγαλύτερη τιμή σημειώθηκε στο νανογαλάκτωμα με 2% γαλακτωματοποιητή Tween 40 και ήταν ίση με 1,195. Η παρουσία του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου επιβεβαιώνεται και στατιστικά ότι επηρέασε σημαντικά τις τιμές του παράγοντα  $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

Αντίθετα, η συνιστώσα αυτή του ολικού χρώματος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου με λυκοπένιο, όπως επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA.

### Παράγοντας $b$

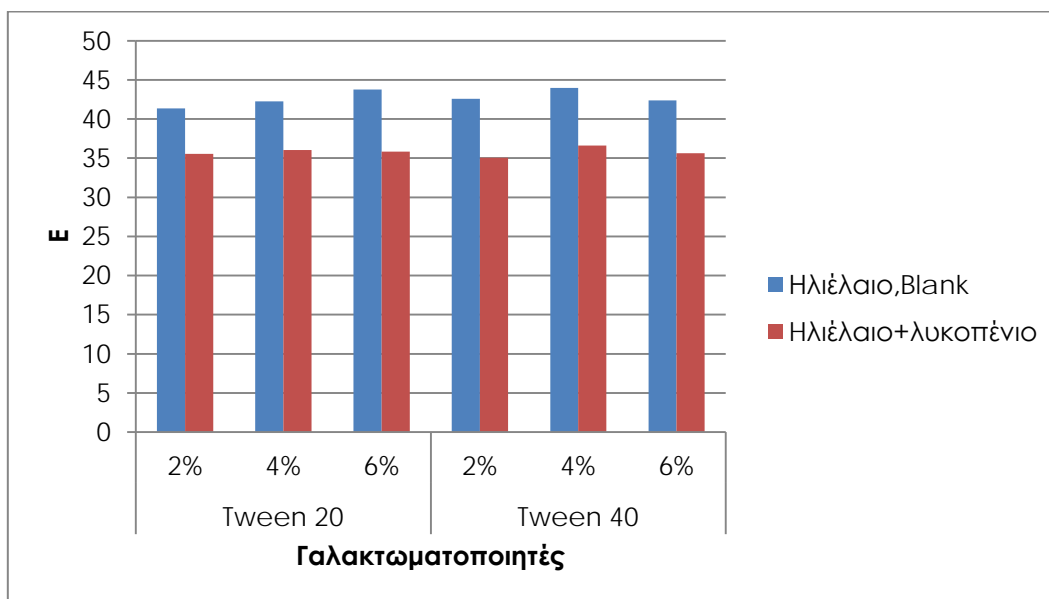


**Διάγραμμα 17. Μεταβολή της παραμέτρου  $b$  ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία του λυκοπένιου στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα ηλιέλαιου.**

Ο δείκτης αυτός δηλώνει τη μπλε ή κίτρινη απόχρωση που έχει το γαλάκτωμα. Στις αναλογίες 4% και 6% Tween 20 φαίνεται πως η προσθήκη του λυκοπένιου έδωσε τιμή περίπου 0 στον παράγοντα  $b$ . Αρνητική τιμή για το  $b$  σημειώθηκε και πάλι στην αναλογία 2% Tween 20 για το νανογαλάκτωμα με λυκοπένιο, όπως και για το μη εμπλουτισμένο.

Ως προς τους παράγοντες που επηρέασαν σημαντικά την τιμή  $b$  του ολικού χρώματος, προέκυψε ότι η αναλογία και το είδος του γαλακτωματοποιητή μετέβαλλαν σημαντικά την τιμή του ( $p < 0,05$ ). Αυξανόμενη της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή αυξανόταν και η τιμή του  $b$ . Ο εμπλουτισμός του νανογαλακτώματος με λυκοπένιο δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή στη συνιστώσα  $b$ .

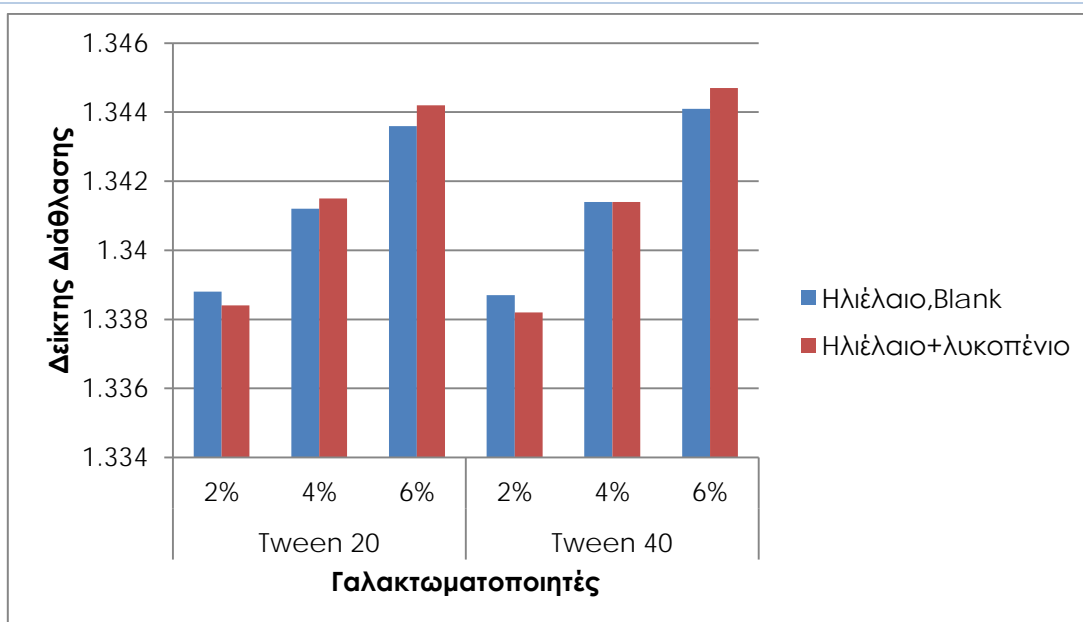
## Παράγοντας E



**Διάγραμμα 18.** Μεταβολή του συνολικού χρώματος E ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία του λικοπένιου στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα ηλιέλαιου.

Το ολικό χρώμα των νανογαλακτωμάτων με λικοπένιο προέκυψε μικρότερο από αυτό των μη εμπλουτισμένων. Φαίνεται καθαρά από το διάγραμμα 18 πως ο εμπλουτισμός των νανογαλακτωμάτων με λικοπένιο οδήγησε σε μείωση του ολικού χρώματος E, επομένως επηρέασε σημαντικά τη μεταβολή του ( $p < 0,05$ ). Αντίθετα η αναλογία και το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασαν στον ίδιο βαθμό το συνολικό χρώμα E.

### 4.B.2.6 Δείκτης διάθλασης

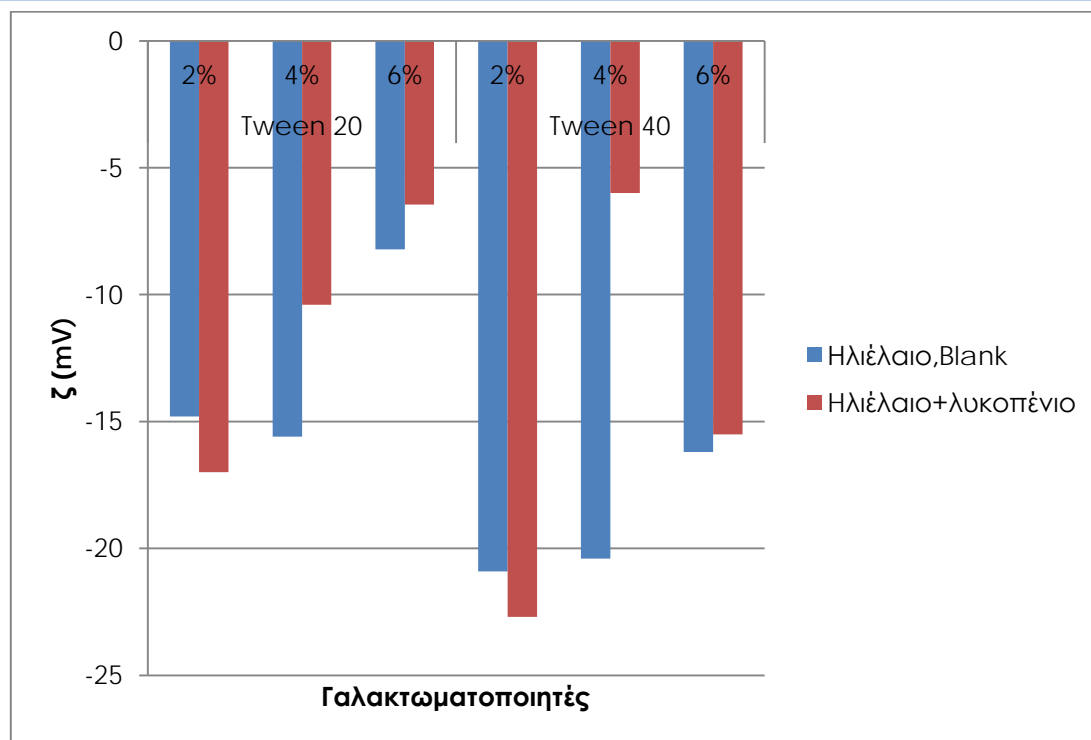


**Διάγραμμα 19.** Μεταβολή του δείκτη διάθλασης στα ο/ω νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο συναρτήσει του είδους, της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή και την παρουσία βιοδραστικού συστατικού.

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, παρατηρώντας τους δείκτες διάθλασης που προέκυψαν στα νανογαλακτώματα φαίνεται πως η προσθήκη του λυκοπένιου στις αναλογίες 2% και 4% γαλακτωματοποιητή αύξησε το δείκτη διάθλασης των νανογαλακτωμάτων σε σχέση με τα μη εμπλουτισμένα. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή, με σταθερή ποσότητα ελαίου στα νανογαλακτώματα, ο δείκτης διάθλασης όπως ήταν αναμενόμενο αυξήθηκε. Το είδος του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασε τα αποτελέσματα.

Ο δείκτης διάθλασης στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου με λυκοπένιο δεν επηρεάστηκε από την ενσωμάτωση του συγκεκριμένου βιοδραστικού συστατικού. Αντίθετα, οι τιμές του μεταβλήθηκαν από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0.05$ ).

#### 4.B.2.7 Zeta Potential



**Διάγραμμα 20. Μεταβολή της τιμής του zeta potential συναρτήσει του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού στα ο/w νανογαλακτώματα με ηλιέλαιο.**

Παρατηρείται πως στα νανογαλακτώματα με Tween 40 οι τιμές του ζ-δυναμικού προέκυψαν μεγαλύτερες (κατά απόλυτη τιμή) από τις αντίστοιχες των νανογαλακτωμάτων με Tween 20. Επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε αύξηση (μείωση κατά απόλυτη τιμή) του ηλεκτρικού δυναμικού των σωματιδίων. Διαφοροποίηση στα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται στην αναλογία 4% Tween 40 του εμπλουτισμένου νανογαλακτώματος ηλιέλαιου με λυκοπένιο. Η τιμή του ζ-δυναμικού βρέθηκε ίση με -5,99 mV και πλησίασε

την αντίστοιχη τιμή του εμπλουτισμένου νανογαλακτώματος με 6% Tween 20 (-6.45 mV).

Η προσθήκη του λυκοπένιου στο νανογαλάκτωμα, στις συγκεντρώσει, 4% και 6% των γαλακτωματοποιητών, αύξησε την τιμή του ζ-δυναμικού σε σχέση με τα νανογαλακτώματα που δεν ήταν εμπλουτισμένα. Σε αυτή την παρατήρηση δεν συμφωνούν τα αποτελέσματα για την αναλογία 2% γαλακτωματοποιητή, όπου το ζ-δυναμικό προέκυψε μεγαλύτερο για τα νανογαλακτώματα εμπλουτισμένα με λυκοπένιο σε σχέση με τα απλά. Μάλιστα το ζ-δυναμικό του νανογαλακτώματος ηλιέλαιου με λυκοπένιο και αναλογία 2% Tween 40 προέκυψε ίσο με -22,7. Σύμφωνα με αυτή την τιμή, πιθανά το συγκεκριμένο νανογαλάκτωμα να είναι πιο σταθερό από τα υπόλοιπα.

Συμπερασματικά, το ζ-δυναμικό, όπως επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στις τιμές που έλαβε, είτε από την αλλαγή της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή, είτε από την παρουσία του λυκοπένιου.

#### 4.B.2.8 Μελέτη της διατηρησιμότητας των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων ηλιέλαιου με λυκοπένιο

##### Δείκτης σταθερότητας (ESI)

Πίνακας 21. Μεταβολή του δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με λυκοπένιο ανά μία εβδομάδα

Εβδομάδες	ESI					
	Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
1 <sup>η</sup>	100	100	100	100	100	100
2 <sup>η</sup>	98.7	100	100	100	100	100
3 <sup>η</sup>	98.7	100	100	100	100	98.7
4 <sup>η</sup>	96.7	96.7	100	100	100	96.7

Φαίνεται πως ο δείκτης σταθερότητας δεν μεταβλήθηκε πολύ με την πάροδο του χρόνου και παρέμεινε σε υψηλά ποσοστά. Η μικρή μείωση που παρατηρήθηκε ήταν αναμενόμενη, καθώς μετά από ένα μήνα τα νανογαλακτώματα αλλοιώνονται και σταδιακά διασπώνται σε δύο φάσεις. Κανένας από τους παράγοντες που μελετήθηκαν (είδος και αναλογία γαλακτωματοποιητή και η ενσωμάτωση του λυκοπένιου) δεν επηρέασε το δείκτη σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων, όπως επιβεβαιώνεται και στατιστικά. Από τις παραπάνω τιμές φαίνεται η υψηλή κινητική σταθερότητα και των νανογαλακτωμάτων με λυκοπένιο.

## Μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MD)

Πίνακας 22. Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με λυκοπένιο, με το χρόνο

Εβδομάδες	MDD					
	Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
<b>Ημέρα παρασκευής</b>	138.6	97.82	134.7	85.61	74.65	125.3
1 <sup>η</sup>	132.8	108.6	125	87.18	58.94	112.6
2 <sup>η</sup>	134.7	105.9	89.24	89.6	63.14	119.4
3 <sup>η</sup>	140	99.96	90.83	81.7	65.06	120.7
4 <sup>η</sup>	141.5	99.03	94.02	87.7	61.65	119.3

Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων δεν μεταβλήθηκε πολύ με τη πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδεικνύει την υψηλή κινητική σταθερότητα των νανογαλακτωμάτων σε σχέση με των απλών γαλακτωμάτων. Παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση της μέσης διαμέτρου, παράλληλα με την αύξηση του δείκτη πολυδιασποράς. Η προσθήκη του λυκοπένιου φαίνεται πως δεν επηρέασε σημαντικά τη μεταβολή των τιμών της μέσης διαμέτρου των νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο.

Με ανάλυση διακύμανσης μελετήθηκε πως το είδος του γαλακτωματοποιητή, η αναλογία του, η παρουσία του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου και η πάροδος του χρόνου, επηρέασαν τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων. Σύμφωνα με αυτή, προέκυψε ότι οι τιμές της διαμέτρου των σταγονιδίων επηρεάστηκαν σημαντικά από τον εμπλουτισμό του νανογαλακτώματος με λυκοπένιο κατά τη διατήρησή τους. Επιπλέον, η μέση διάμετρος των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιήθηκε ( $p < 0,05$ ).

## Μεταβολή του ολικού χρώματος των νανογαλακτωμάτων

Η υποβάθμιση του χρώματος λόγω οξείδωσης του λυκοπένιου μετράται με το χρωματόμετρο (Minolta CR 200) και εκφράζεται με τη μεταβολή της τιμής του  $a$  (εκφράζει το κόκκινο) της κλίμακας  $L a b$ . Αποτελεί ένα ποιοτικό προσδιορισμό της οξείδωσης του λυκοπένιου στο νανογαλάκτωμα. Από τη θεωρία είναι γνωστό ότι η οξείδωση του *trans*-λυκοπένιου οδηγεί στον ισομερισμό του σε λιγότερο κόκκινης απόχρωσης *cis*-ισομερή (Miers et al.).

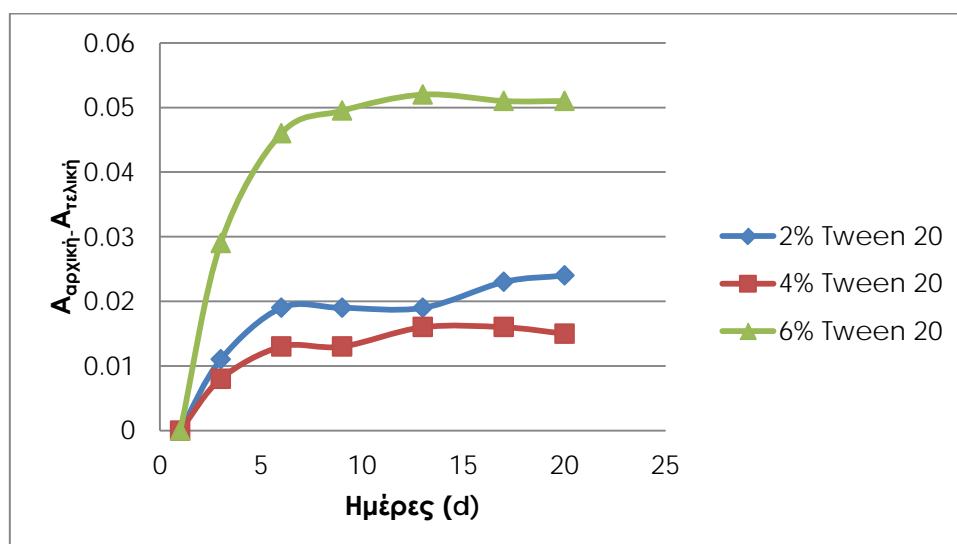
Πίνακας 23. Μεταβολή του παράγοντα  $a$  των νανογαλακτωμάτων με λυκοπένιο, με το χρόνο

Εβδομάδες	Ολικό χρώμα E					
	Tween 20			Tween 40		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
<b>Ημέρα παρασκευής</b>	35.53	34.74	35.82	34.45	35.78	34.19
1 <sup>η</sup>	36.29	36.04	36.03	35.06	36.61	35.28
2 <sup>η</sup>	36.39	36.50	37.53	39.73	36.67	35.65

Παρατηρείται πως το χρώμα αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Οι μετρήσεις που παρουσιάζονται είναι αυτές της ημέρας παρασκευής, της πρώτης εβδομάδας και της δεύτερης. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο ενδιάμεσο διάστημα δε διέφεραν από αυτές που παρουσιάζονται.

### Οξειδωτική αποδόμηση του λυκοπένιου

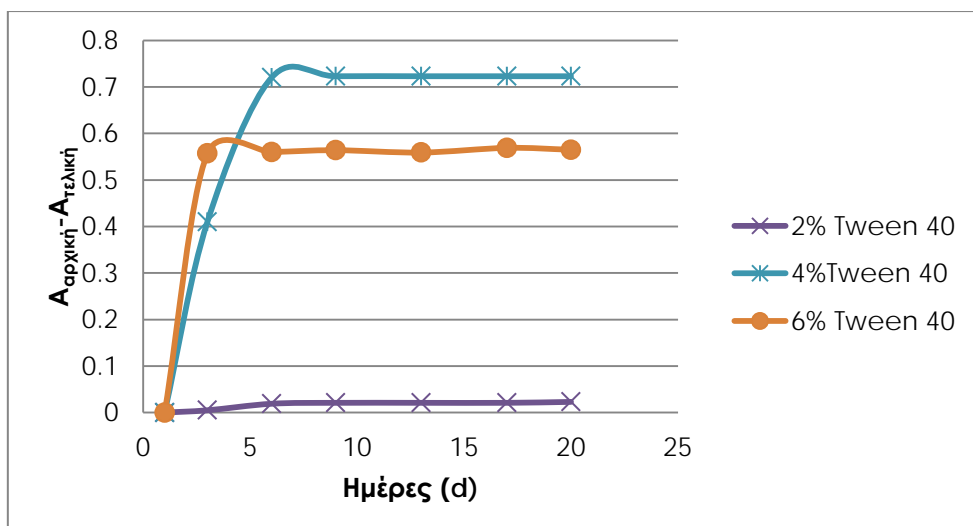
Η οξείδωση του λυκοπένιου προσδιορίστηκε μέσω της απομόνωσης του ελαίου από το νανογαλάκτωμα και μέτρηση της απορρόφησής του στο φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U-2900 UV/Vis, 200 V). Η απορρόφηση μετρήθηκε την πρώτη ημέρα της παρασκευής των νανογαλακτωμάτων και ακολούθως προσδιορίστηκε η απορρόφηση ανά δύο ημέρες. Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνεται η διαφορά της τιμής κάθε απορρόφησης ως προς την αρχική ( $A_{\text{αρχική}} - A_{\text{τελική}}$ ) με την πάροδο του χρόνου, δηλαδή η υποβάθμιση του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα που έχουν σταθεροποιηθεί με γαλακτωματοποιητές Tween.



Διάγραμμα 21. Οξειδωτική αποδόμηση του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα με Tween 20

Η διαφορά της απορρόφησης παρατηρείται ότι αυξάνεται με το χρόνο που σημαίνει ότι το λυκοπένιο οξειδώνεται. Στην περίπτωση του γαλακτωματοποιητή Tween 20 φαίνεται πως η καλύτερη αναλογία ως προς τη διατήρηση του λυκοπένιου στην αρχική του περιεκτικότητα ήταν η 4%. Επιπλέον από το διάγραμμα 21 φαίνεται πως μετά το πέρας των 10 ημερών η απορρόφηση που λαμβανόταν είχε σταθερή διαφορά με την αρχική, επομένως η αποικοδόμηση δεν ήταν τόσο έντονη. Κατά τις πρώτες πέντε μέρες παρατηρήθηκε έντονη αποικοδόμηση του λυκοπένιου.



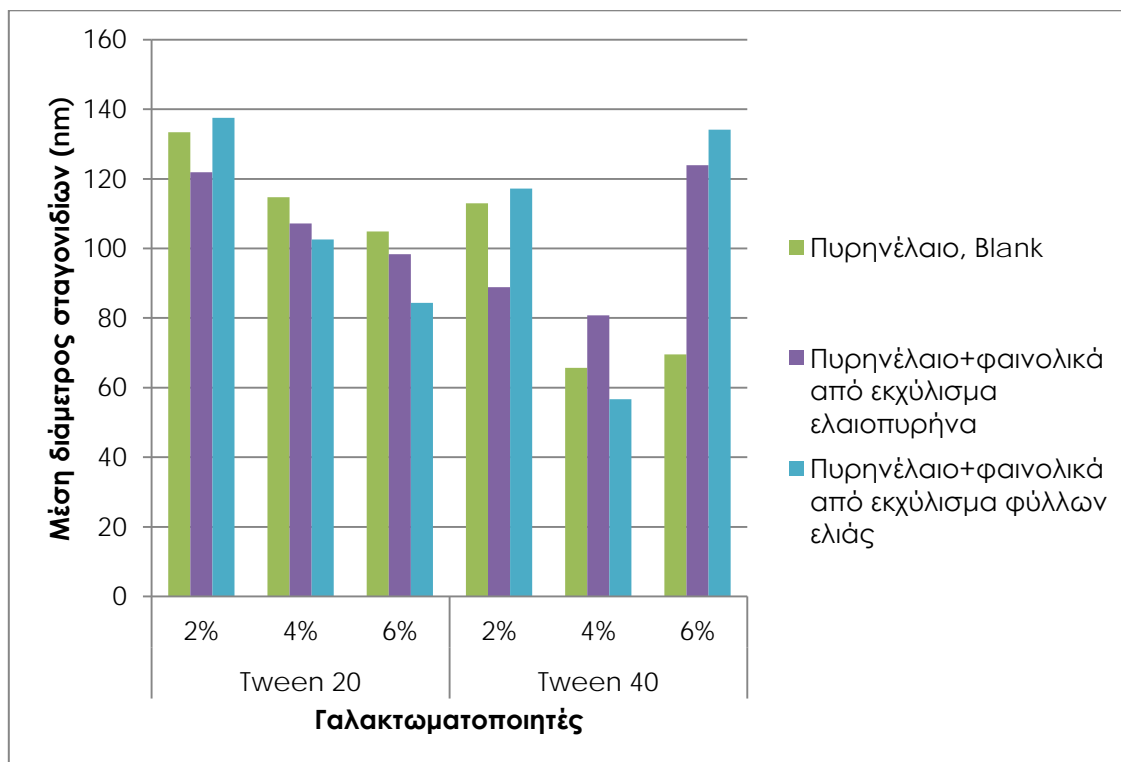


**Διάγραμμα 22. Οξειδωτική αποδόμηση του λυκοπένιου στα νανογαλακτώματα με Tween 40**

Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται πως από τις πρώτες ημέρες ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 λειτούργησε θετικά στη διατήρηση του λυκοπένιου. Ειδικότερα στα ποσοστά 4% και 6%, εξαρχής η απορρόφηση του λυκοπένιου ήταν μεγάλη (0,73 και 0,57 αντίστοιχα) και με την πάροδο του χρόνου μειώθηκε ελάχιστα. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι εξαρχής ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 προστάτευσε το λυκοπένιο κατά τη διαδικασία παρασκευής του νανογαλακτώματος (στάδιο της ομογενοποίησης και της επεξεργασίας με υπέρηχους) και συγκεκριμένα όταν χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες 4% και 6%. Η έντονη διαφορά που παρατηρείται στις καμπύλες του διαγράμματος 22 αποδίδεται στη συμπεριφορά που είχαν τα νανογαλακτώματα με 2% Tween 40. Η πρώτη απορρόφηση ήταν της τάξεως του 0,032 και η αποδόμηση του λυκοπένιου ήταν παρόμοια με τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με Tween 20.

### 4.B.3 Τρίτη Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με φαινολικά συστατικά νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου

#### 4.B.3.1 Μέση διάμετρος σταγονιδίων (MD)

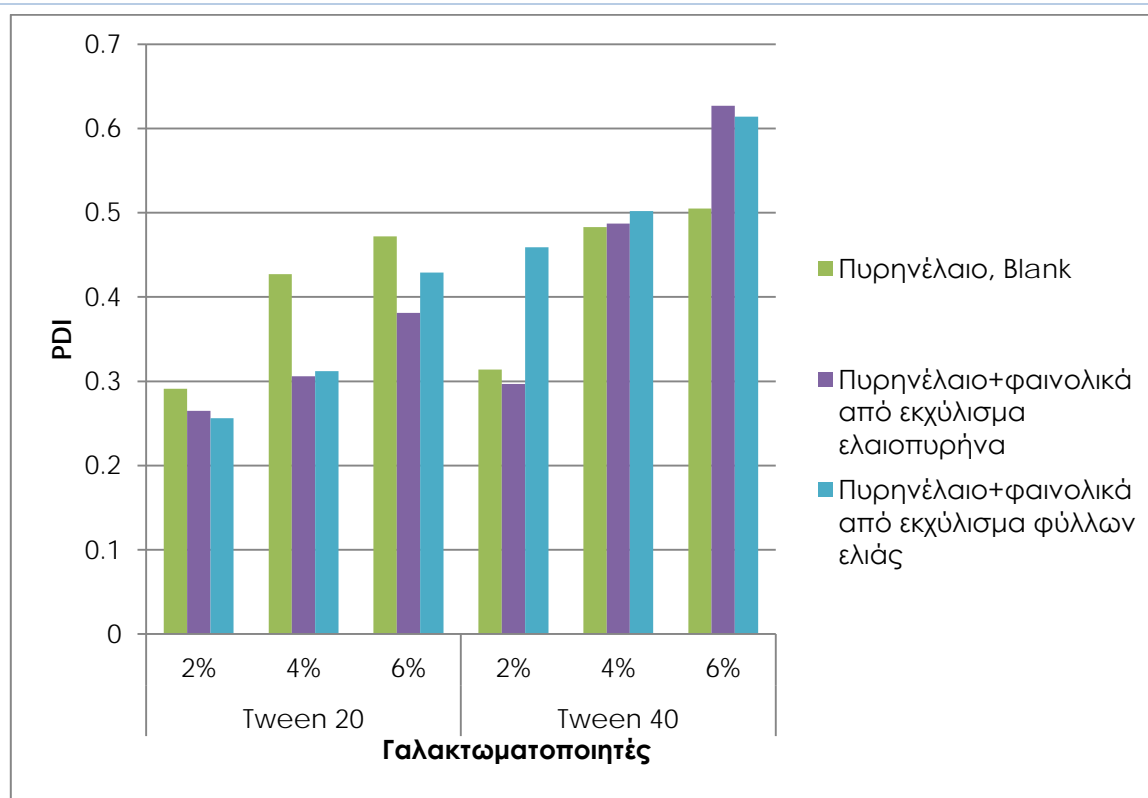


**Διάγραμμα 23. Μεταβολή της μέσης διαμέτρου των σταγονιδίων των ο/w νανογαλακτωμάτων με πυρηνέλαιο ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και την παρουσία βιοδραστικών συστατικών**

Στα νανογαλακτώματα που χρησιμοποιήθηκε ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 παρατηρείται μία ομαλή πτώση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων με την αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή. Η ίδια παρατήρηση δεν ισχύει για τον γαλακτωματοποιητή Tween 40. Ειδικότερα, στα νανογαλακτώματα που είχαν εμπλουτιστεί με φαινολικά συστατικά η αυξημένη περιεκτικότητα σε γαλακτωματοποιητή Tween 40 (6%) οδήγησε σε αύξηση της διαμέτρου των σταγονιδίων. Η προσθήκη των φαινολικών φαίνεται πως μείωσε τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων, με εξαίρεση την περιεκτικότητα 6% Tween 40 του γαλακτωματοποιητή.

Εντούτοις, σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία η μέση διάμετρος των σταγονιδίων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά από την παρουσία των φαινολικών συστατικών στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου. Αντίστοιχη παρατήρηση προκύπτει και για την αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή και το είδος του.

#### 4.B.3.2 Δείκτης Πολυδιασποράς (PDI)



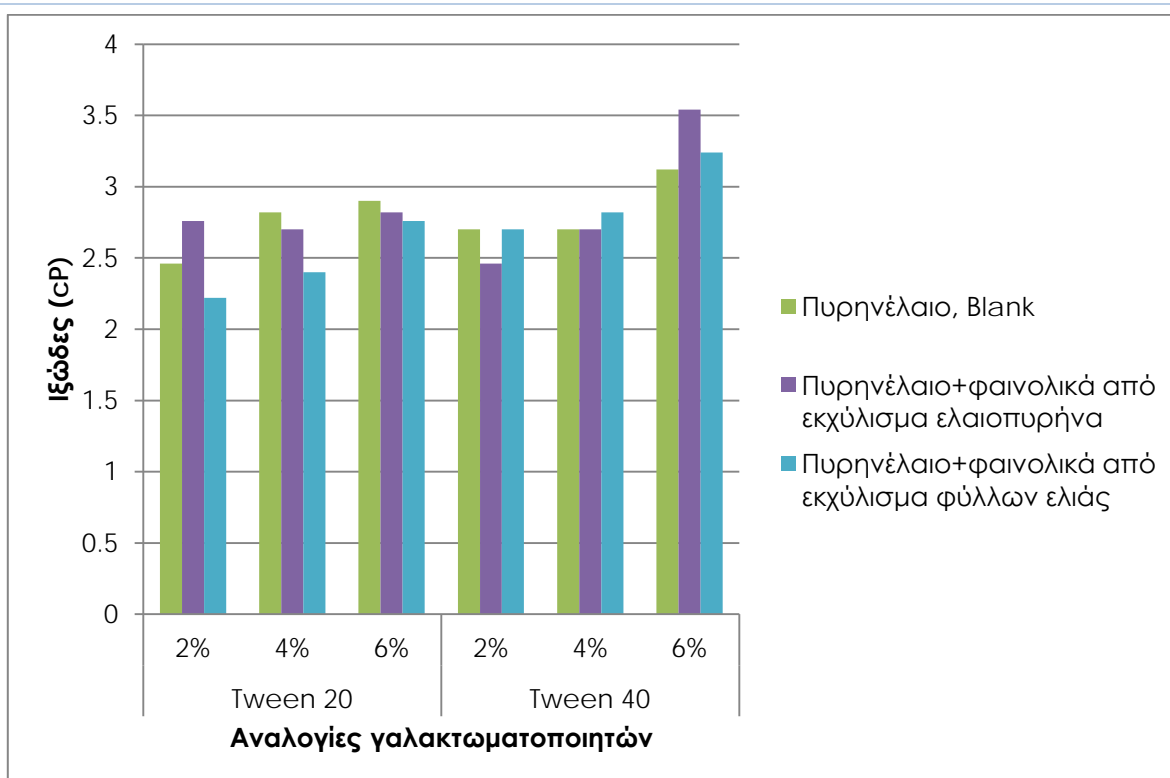
**Διάγραμμα 24. Μεταβολή της τιμής του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) στα ο/w νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού.**

Από το διάγραμμα 15 φαίνεται πως ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 αυξάνει το δείκτη πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων με πυρηνέλαιο (εμπλουτισμένων ή μη), γεγονός που δεν είναι επιθυμητό όσον αφορά τη σταθερότητα των τελικών νανογαλακτωμάτων. Εξαιτίας αυτής της παρατήρησης, στην πορεία των πειραμάτων μελετήθηκαν τα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου που παρασκευάστηκαν με γαλακτωματοποιητή Tween 20.

Όσον αφορά τα γαλακτώματα πυρηνέλαιου με γαλακτωματοποιητή Tween 20, φαίνεται πως η προσθήκη των φαινολικών συστατικών μείωσε το δείκτη πολυδιασποράς σε σχέση με τα απλά (μη εμπλουτισμένα) νανογαλακτώματα. Οι τιμές του δείκτη PDI κυμάνθηκαν από 0,256 μέχρι 0,627, με τη μέγιστη τιμή να παρουσιάζεται στο νανογαλακτώμα πυρηνέλαιου με φαινολικά συστατικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα και γαλακτωματοποιητή Tween 40 σε αναλογία 6%.

Η ενσωμάτωση των νανογαλακτωμάτων πυρηνέλαιου με φαινολικά συστατικά προέκυψε ότι δε μετέβαλλε σημαντικά το δείκτη πολυδιασποράς τους. Αντίθετα προέκυψε, όπως και στα απλά νανογαλακτώματα, ότι το PDI επηρεάζεται από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή. Τέλος, στην τρίτη σειρά πειραμάτων, το είδος του γαλακτωματοποιητή μετέβαλλε το δείκτη πολυδιασποράς των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με ενσωματωμένα φαινολικά συστατικά. ( $p < 0,05$ )

#### 4.B.3.3 Ιξώδες

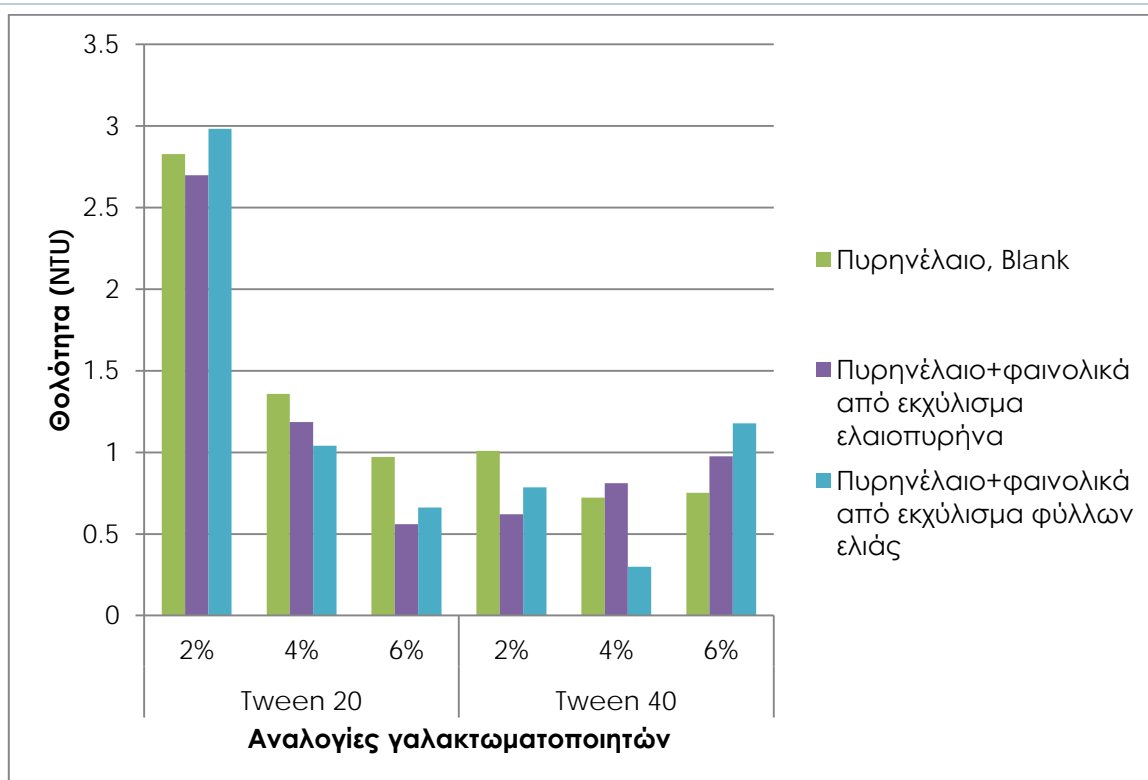


**Διάγραμμα 25. Μεταβολή της τιμής του ιξώδους στα ο/ω νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού.**

Το γενικό συμπέρασμα που αφορά την ταυτόχρονη αύξηση του ιξώδους με την αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή ισχύει και στην περίπτωση με τα ο/ω νανογαλακτώματα πυρηνελαίου. Όσον αφορά τον εμπλουτισμό τους με φαινολικά συστατικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα, προκύπτει ότι δεν παρουσιάστηκε κάποια μεταβολή στο ιξώδες σε σχέση με τα απλά. Αντίθετα τα φαινολικά συστατικά από εκχύλιση φύλλων ελιάς όταν ενσωματώθηκαν μείωσαν το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων σε όλες τις αναλογίες και τα είδη του γαλακτωματοποιητή. Αυτό αιτιολογείται και από το γεγονός ότι τα νανογαλακτώματα με τα συγκεκριμένα φαινολικά είχαν μικρότερη μέση διάμετρο στις περισσότερες αναλογίες γαλακτωματοποιητή από τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με πυρηνέλαιο χωρίς κάποια ενσωμάτωση.

Το ιξώδες των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με φαινολικά συστατικά επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ). Αντίθετα, ο εμπλουτισμός τους με τα εν λόγω βιοδραστικά συστατικά δεν επέφερε κάποια αλλαγή στις τιμές του ιξώδους που ελήφθησαν.

#### 4.Β.3.4 Θολότητα



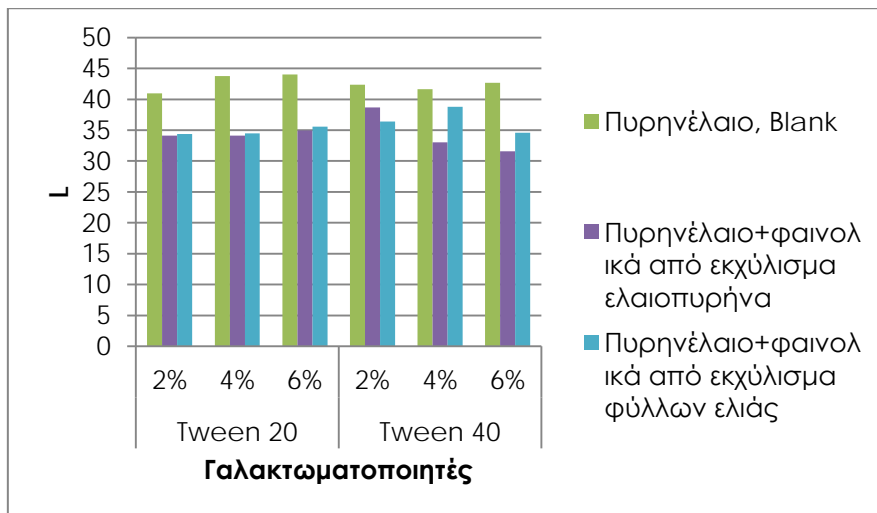
**Διάγραμμα 26. Μεταβολή της τιμής της θολότητας στα ο/ω νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο συναρτήσει της αναλογίας, του είδους του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού**

Η μικρότερη τιμή θολότητας (0,3 NTU) παρατηρήθηκε στο νανογαλάκτωμα με αναλογία 4% γαλακτωματοποιητή Tween 40 και φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη τιμή παρουσιάστηκε στα ίδια νανογαλακτώματα, αλλά με αναλογία 2% Tween 20 και η τιμή της ήταν 2,98 NTU.

Από το διάγραμμα 26 στην περίπτωση του γαλακτωματοποιητή Tween 20 φαίνεται πως αυξάνοντας την περιεκτικότητά του η θολότητα μειώνεται σε όλα τα νανογαλακτώματα. Η προσθήκη φαινολικών συστατικών για την ίδια αναλογία γαλακτωματοποιητή φαίνεται πως οδήγησε σε μείωση της θολότητας.

Ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 στις αναλογίες 2% και 4% έδωσε μικρότερες τιμές θολότητας στα νανογαλακτώματα σε σχέση με τον Tween 20. Εντούτοις, στην αναλογία 6% Tween 40, η προσθήκη φαινολικών συστατικών οδήγησε σε αύξηση της θολότητας από την αντίστοιχη των νανογαλακτωμάτων με Tween 20. Σε αυτό το σημείο για να εξαχθεί ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα πραγματοποιείται έλεγχος ANOVA. Η θολότητα των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων με φαινολικά συστατικά δεν επηρεάστηκε τόσο από την παρουσία των βιοδραστικών συστατικών, όσο από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή ( $p < 0,05$ ).

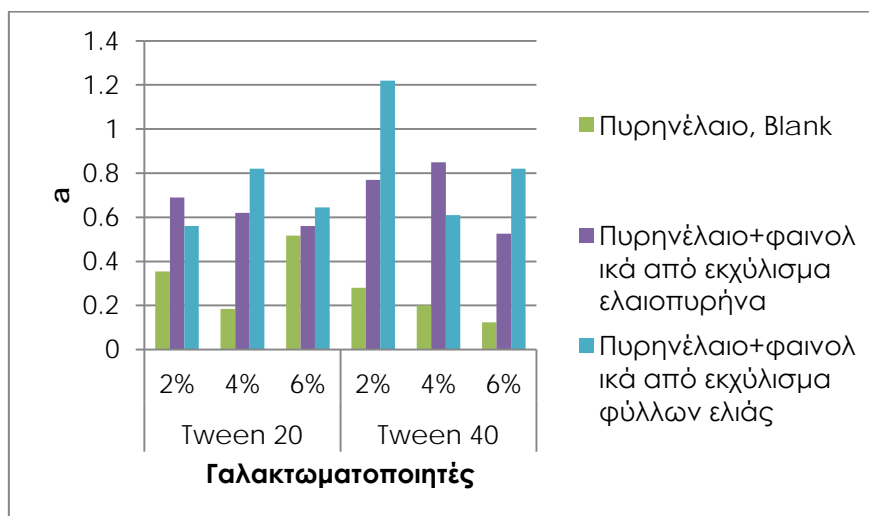
Παράγοντας L



Διάγραμμα 27. Μεταβολή της παραμέτρου L ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία των φαινολικών συστατικών στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα πυρηνέλαιου.

Από το διάγραμμα 27 φαίνεται πως το είδος και η αναλογία του γαλακτωματοποιητή δεν επηρέασε το δείκτη L που συμβολίζει τη φωτεινότητα του δείγματος. Η διαφορά που σημειώθηκε ήταν στην προσθήκη των φαινολικών συστατικών, καθώς σε σύγκριση με τα νανογαλακτώματα με απλό πυρηνέλαιο, τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές φωτεινότητας. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και στατιστικά καθώς οι τιμές της φωτεινότητας επηρεάστηκαν σημαντικά από το είδος των φαινολικών συστατικών που ενσωματώθηκαν στο πυρηνέλαιο ( $p < 0,05$ ).

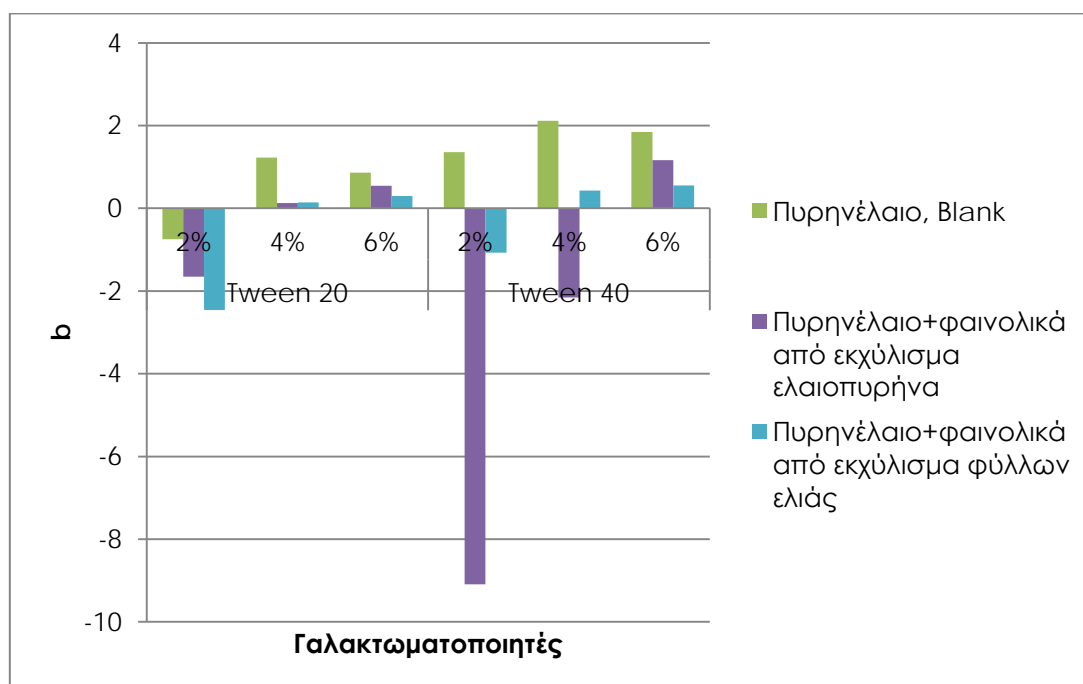
Παράγοντας a



Διάγραμμα 28. Μεταβολή της παραμέτρου a ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία των φαινολικών συστατικών στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα πυρηνέλαιου.

Το είδος του γαλακτωματοποιητή φαίνεται πως δεν επηρέασε τον παράγοντα  $\alpha$ , που συμβολίζει το πόσο κόκκινο ( $\alpha > 0$ ) ή πράσινο ( $\alpha < 0$ ) προκύπτει ένα νανογαλάκτωμα. Επίσης, η αναλογία του γαλακτωματοποιητή φαίνεται ότι δεν επηρέασε τη μεταβολή των τιμών του  $\alpha$ . Εντούτοις, η μεγαλύτερη τιμή σημειώθηκε στην αναλογία 2% Tween 40 για το νανογαλάκτωμα που περιείχε φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς και ήταν ίση με 1,22. Συνοπτικά, στην τρίτη σειρά των πειραμάτων, το είδος των φαινολικών συστατικών, ανάλογα με την πηγή προέλευσης (από ελαιοπυρήνα ή φύλλα ελιάς), που ενσωματώθηκαν στα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου επηρέασαν σημαντικά την τιμή του παράγοντα  $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

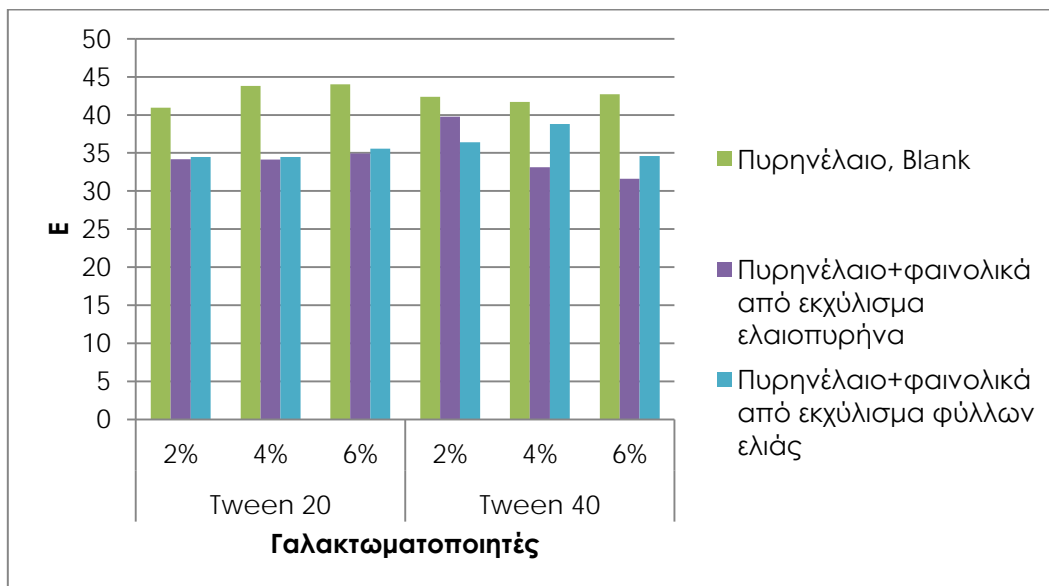
### Παράγοντας $b$



**Διάγραμμα 29. Μεταβολή της παραμέτρου  $b$  ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία των φαινολικών συστατικών στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα πυρηνέλαιου.**

Η παράμετρος  $b$ , συμβολίζει πόσο μπλε ή κίτρινο είναι ένα νανογαλάκτωμα. Στην αναλογία 2% Tween 40 στο νανογαλάκτωμα με πυρηνέλαιο και φαινολικά συστατικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα σημειώθηκε η πιο αρνητική τιμή για τον παράγοντα  $b$ . Επομένως, η αναλογία του γαλακτωματοποιητή φαίνεται πως επηρέασε σημαντικά την τιμή της παραμέτρου  $b$  ( $p < 0,05$ ).

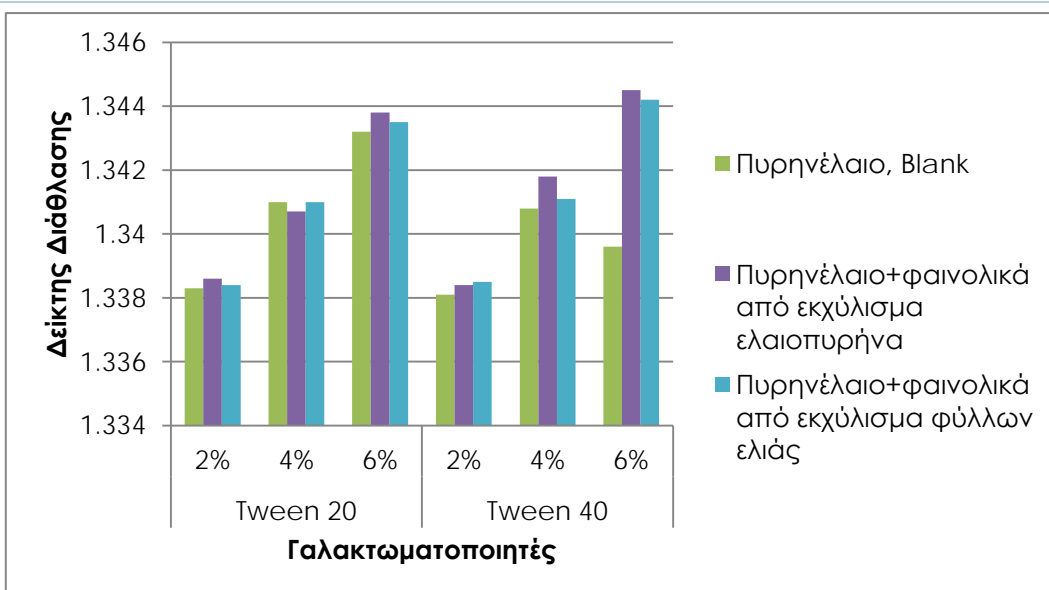
## Παράγοντας E



**Διάγραμμα 30. Μεταβολή του συνολικού χρώματος E ανάλογα με το είδος, την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και τη παρουσία των φαινολικών συστατικών στα εμπλουτισμένα γαλακτώματα πυρηνέλαιου.**

Από το διάγραμμα 30 φαίνεται πως το ολικό χρώμα δεν επηρεάστηκε από το είδος και την αναλογία του γαλακτωματοποιητή. Αντίθετα, η προσθήκη των φαινολικών συστατικών στα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου μείωσε το ολικό χρώμα τους σε σύγκριση με τα απλά. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ( $p < 0,05$ ). Το είδος και η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή δεν επέφεραν σημαντική μεταβολή στο χρώμα.

### 4.B.3.6 Δείκτης διάθλασης

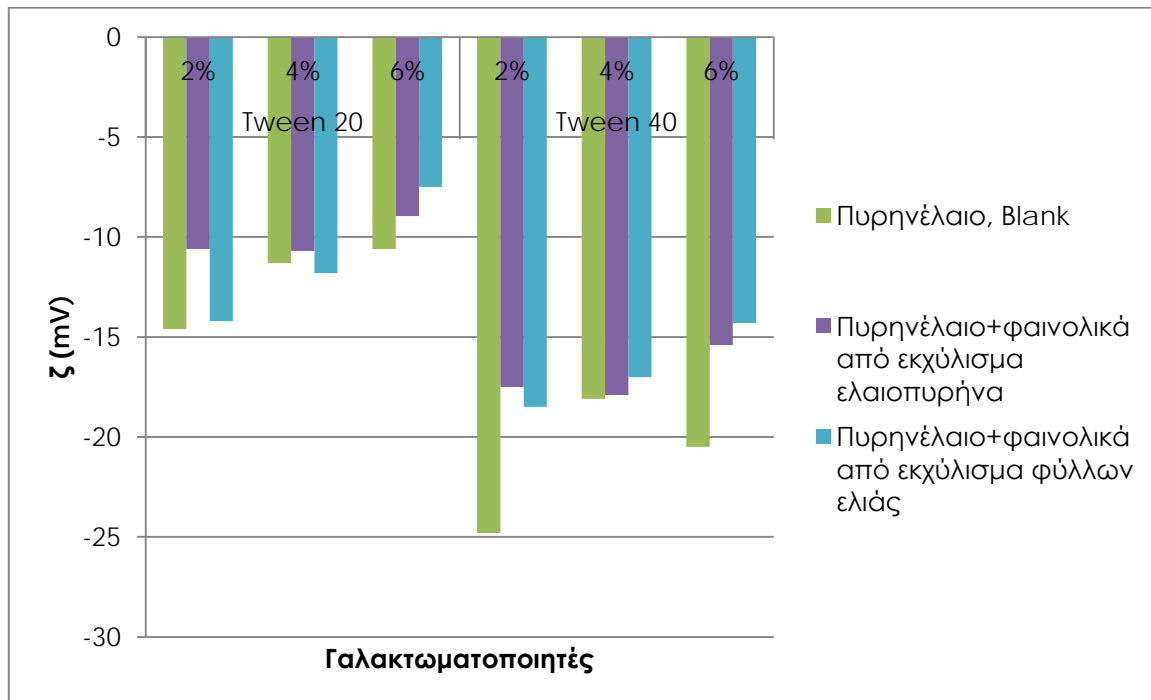


**Διάγραμμα 31. Μεταβολή του δείκτη διάθλασης στα ο/w νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο συναρτήσει του είδους, της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή και την παρουσία βιοδραστικού συστατικού.**



Όπως και στα νανογαλακτώματα των άλλων σειρών του πειράματος, ο δείκτης διάθλασης στα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου με φαινολικά συστατικά παρατηρείται πως αυξάνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας του γαλακτωματοποιητή, ανεξάρτητα από το είδος. Επομένως, η αναλογία του γαλακτωματοποιητή επηρέασε σημαντικά το δείκτη διάθλασης των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων πυρηνέλαιου ( $p < 0,05$ ). Ακολούθως, η προσθήκη των φαινολικών συστατικών οδήγησε στην αύξηση του δείκτη διάθλασης. Αύξηση παρατηρήθηκε στην αναλογία 6% Tween 40, όπου το νανογαλάκτωμα χωρίς φαινολικά είχε δείκτη διάθλασης 1.3396, ενώ το νανογαλάκτωμα με φαινολικά συστατικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα 1.3445 και το νανογαλάκτωμα με φαινολικά συστατικά από εκχύλιση φύλλων ελιάς 1.3442. Εντούτοις, από τη στατιστική επεξεργασία προέκυψε ότι η παρουσία των συγκεκριμένων βιοδραστικών συστατικών δε μετέβαλλε σημαντικά τις τιμές του δείκτη διάθλασης.

#### 4.B.3.7 Zeta Potential



**Διάγραμμα 32. Μεταβολή της τιμής του zeta potential συναρτήσει του γαλακτωματοποιητή και του βιοδραστικού συστατικού στα o/w νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο.**

Η αύξηση της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή οδήγησε σε μείωση του ηλεκτρικού δυναμικού των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων και στα δύο είδη γαλακτωματοποιητή. Επιπλέον, παρατηρείται πως ο γαλακτωματοποιητής Tween 40 μείωσε αρκετά το ζ-δυναμικό σε σχέση με τον Tween 20. Συγκεκριμένα, στην αναλογία 2% Tween 40 παρατηρήθηκε ότι το ζ-δυναμικό για το νανογαλάκτωμα με πυρηνέλαιο και χωρίς ενσωμάτωση σημείωσε τη μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή,

γεγονός που δηλώνει ότι έχει αυξημένη σταθερότητα. Η προσθήκη των φαινολικών συστατικών μείωσε το ζ-δυναμικό (κατά απόλυτη τιμή).

Όλοι οι παράγοντες που μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στο ζ-δυναμικό προέκυψε ότι ήταν σημαντικοί. Τόσο η αναλογία και το είδος του γαλακτωματοποιητή, όσο και η παρουσία των φαινολικών συστατικών από τις διαφορετικές πηγές, μετέβαλαν το ηλεκτρικό δυναμικό των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων.

#### 4.B.3.8 Μελέτη της διατηρησιμότητας των εμπλουτισμένων νανογαλακτωμάτων πυρηνέλαιου με φαινολικά συστατικά

##### Δείκτης σταθερότητας (ESI)

Πίνακας 24. Δείκτης σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων με βάση το πυρηνέλαιο εμπλουτισμένο με φαινολικά συστατικά με την πάροδο του χρόνου

Εβδομάδες	Πυρηνέλαιο με φαινολικά από ελαιοπυρήνα			Πυρηνέλαιο με φαινολικά από φύλλα ελιάς		
	Tween 20			Tween 20		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
1 <sup>η</sup>	100	100	100	100	100	100
2 <sup>η</sup>	100	100	100	97.5	100	100
3 <sup>η</sup>	100	97.5	95	97.5	98	100
4 <sup>η</sup>	98	95	95	95	95	95

Τα νανογαλακτώματα με τον εμπλουτισμό φαινολικών συστατικών φαίνεται πως παρουσίασαν υψηλή κινητική σταθερότητα, λόγω των υψηλών τιμών του δείκτη σταθερότητας που παρουσίασαν. Σε σύγκριση με το δείκτη σταθερότητας που παρουσίασαν τα νανογαλακτώματα με πυρηνέλαιο χωρίς κάποιο εμπλουτισμό, φαίνεται πως τα συγκεκριμένα φαινολικά αύξησαν ελάχιστα τη σταθερότητα των τελικών νανογαλακτωμάτων, καθώς ο δείκτης ESI προέκυψε μεγαλύτερος. Από τους παράγοντες που μελετήθηκαν (αναλογία γαλακτωματοποιητή και εμπλουτισμός των νανογαλακτωμάτων με φαινολικά συστατικά) προέκυψε ότι ο δείκτης σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων κατά την αποθήκευσή τους δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές.

## Μέση διάμετρος των σταγονιδίων (MD)

Πίνακας 25. Μέση διάμετρος των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων με φαινολικά συστατικά ανά μία εβδομάδα

Εβδομάδες	Πυρηνέλαιο με φαινολικά από ελαιοπυρήνα			Πυρηνέλαιο με φαινολικά από φύλλα ελιάς		
	Tween 20			Tween 20		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
Ημέρα παρασκευής	121.9	107.2	98.33	137.5	102.6	84.37
1 <sup>η</sup>	130.2	101.5	95.71	135.4	99.09	85.48
2 <sup>η</sup>	124.4	107.4	98.21	133.8	100.2	86.69
3 <sup>η</sup>	129.7	99.41	90.03	130.9	98.61	80.76
4 <sup>η</sup>	128.3	101.8	95.62	134	98.17	82.22

Η μέση διάμετρος των σταγονιδίων φαίνεται πως δε σημείωσε διαφορές με την πάροδο ενός μήνα της διατήρησης των νανογαλακτωμάτων. Η διάμετρος κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα και οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται δε θεωρούνται ως σημαντική ένδειξη της αποσταθεροποίησης του νανογαλακτώματος. Από τους παράγοντες που εξετάστηκαν, δηλαδή την αναλογία του γαλακτωματοποιητή, το είδος των φαινολικών συστατικών και το χρόνο της αποθήκευσης, προέκυψε ότι η μέση διάμετρος των σταγονιδίων κατά την αποθήκευση των νανογαλακτωμάτων με τα φαινολικά συστατικά, επηρεάστηκε από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή και την ενσωμάτωση με τα φαινολικά συστατικά από τις διαφορετικές πηγές προέλευσης ( $p < 0,05$ ).

## Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC)

Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ώστε να διαπιστωθεί η διατήρηση των φαινολικών στα νανογαλακτώματα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται ως mg GA/gr και η μέθοδος η οποία το προσδιόριζε ήταν η Folin-Ciocalteu.

Αρχικά μετρήθηκαν τα φαινολικά που περιείχε το πυρηνέλαιο. Προέκυψε ότι η συγκέντρωσή τους εκφρασμένη σε γαλλικό οξύ ήταν 0.006 mg GA/g ελαίου. Ακολούθως μετρήθηκε το περιεχόμενο των φαινολικών στα εκχυλίσματα των φύλλων ελιάς και του ελαιοπυρήνα. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg GA/g ξηρού βάρους.

- Εκχύλισμα ελαιοπυρήνα: 189 mg GA/g ξ.β.
- Εκχύλισμα φύλλων ελιάς: 277,65 mg GA/g ξ.β.

Υπενθυμίζεται πως τα φαινολικά αυτά διαλυτοποιήθηκαν στο πυρηνέλαιο σε ποσοστό 0,05% κατά βάρος. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου μέτρηση των φαινολικών στο πυρηνέλαιο με τα δύο εκχυλίσματα.

- Πυρηνέλαιο με εκχύλισμα ελαιοπυρήνα: 0,081 mg GA/g ξ.β.
- Πυρηνέλαιο με εκχύλισμα φύλλων ελιάς: 0,129 mg GA/g ξ.β.

Τα νανογαλακτώματα που παρασκευάστηκαν περιείχαν 2% κ.β. πυρηνέλαιο με τις παραπάνω ενσωματώσεις. Η μέτρηση Folin για την εύρεση του περιεχομένου τους σε φαινολικά πραγματοποιήθηκε την ημέρα παρασκευής τους και μετά από ένα μήνα. Αξιζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δεν αντιδρά με το διάλυμα νερού-γαλακτωματοποιητή, (Richards, Chaiyasit, McClements, Decker ,2002) και για αυτό το λόγο ήταν δυνατή η μέτρηση των φαινολικών στα νανογαλακτώματα. Στον παρακάτω πίνακα επισυνάπτεται ο μέσος όρος της μέτρησης του φαινολικού περιεχομένου στο νανογαλάκτωμα και για τις τρεις αναλογίες γαλακτωματοποιητή, καθώς ήταν πολύ κοντινά τα αποτελέσματα (οι αποκλίσεις φαίνονται από τις τιμές απόκλισης). Τέλος αναφέρεται το ποσοστό του φαινολικού περιεχομένου στα νανογαλακτώματα που διατηρήθηκε μετά την πάροδο ενός μήνα.

Πίνακας 26. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο στα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου.

	1 <sup>η</sup> ημέρα	30 <sup>η</sup> ημέρα
Γαλακτώματα πυρηνέλαιου με:	mg GA/g γαλακτώματος	mg GA/g γαλακτώματος
<b>Φαινολικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα</b>	0.0016 ± 0.0005	0.0012 ± 0.0005
<b>Φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς</b>	0.0259 ± 0.0004	0.0174 ± 0.0003

Πίνακας 27. Ποσοστό διατήρησης του ολικού φαινολικού περιεχομένου στα νανογαλακτώματα

Γαλακτώματα πυρηνέλαιου με:	Διατήρηση των φαινολικών συστατικών στο νανογαλάκτωμα (%)
<b>Φαινολικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα</b>	75.00%
<b>Φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς</b>	67.35%

Τα φαινολικά από το εκχύλισμα ελαιοπυρήνα, αν και λιγότερο δραστικά σε σχέση με τα φαινολικά από τα φύλλα ελιάς, στα νανογαλακτώματα διατηρήθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό. Από τα ποσοστά διατήρησης των φαινολικών επιβεβαιώνεται

ότι τα νανογαλακτώματα είναι καλοί φορείς για την ενσωμάτωσή τους, καθώς με την πάροδο ενός μήνα δε μειώθηκαν κάτω από το μισό.

#### 4.B.4 Επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση

Τα μόρια στην επιφάνεια των υγρών έλκονται μεταξύ τους και προς το εσωτερικό του υγρού από δυνάμεις συνοχής. Συνέπεια αυτού είναι να δημιουργείται μια συνισταμένη δύναμη, που ονομάζεται επιφανειακή τάση. Η διεπιφανειακή τάση είναι η επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια δύο υγρών. Το νερό λόγω της μοριακής δομής του, έχει μεγάλη επιφανειακή τάση και έντονο ιοντικό προσανατολισμό ο οποίος οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου. Η μεγάλη επιφανειακή τάση του νερού παρεμποδίζει τη γαλακτωματοποίησή τους. Στόχος στην προσθήκη των γαλακτωματοποιητών είναι η μείωση της επιφανειακής τάσης του νερού και συνεπώς η διευκόλυνση της διαδικασίας της γαλακτωματοποίησης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επιφανειακή τάση που έχουν οι γαλακτωματοποιητές διαλυτοποιημένοι σε νερό (2%, 4%, 6%), τα γαλακτώματα και τα έλαια (εμπλουτισμένα και μη). Τα αποτελέσματα επισυνάπτονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 28. Επιφανειακή τάση των εμπλουτισμένων και μη ελαίων

Έλαια	ST [mN/m]
Πυρηνέλαιο	33.554
Πυρηνέλαιο+φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς	31.208
Πυρηνέλαιο+φαινολικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα	31.379
Ηλιέλαιο	32.576
Ηλιέλαιο+λυκοπένιο	31.991

Πίνακας 29. Επιφανειακή τάση υδατικών διαλυμάτων γαλακτωματοποιητών

Διαλύματα γαλακτωματοποιητών	ST [mN/m]
2% Tween 20	34.498
4% Tween 20	34.482
6% Tween 20	35.319
2% Tween 40	34.018
4% Tween 40	35.090
6% Tween 40	32.221

Η προσθήκη των βιοδραστικών συστατικών στο ηλιέλαιο και το πυρηνέλαιο μείωσε την επιφανειακή τους τάση, γεγονός που ήταν επιθυμητό, ώστε να γίνει πιο καλή η γαλακτωματοποίηση. Από τις τιμές της επιφανειακής τάσης του νερού με όλες τις αναλογίες του γαλακτωματοποιητή φαίνεται πως κυμάνθηκαν στην ίδια κλίμακα με εκείνες των ελαίων, συνεπώς φαίνεται πως πραγματοποιήθηκε καλή ομογενοποίηση των δύο φάσεων κατά την παρασκευή του νανογαλακτώματος.

Ακολουθούν οι μετρήσεις της επιφανειακής τάσης των νανογαλακτωμάτων. Οι επιφανειακές τάσεις των σχηματισμένων νανογαλακτωμάτων έχουν μετρηθεί με σκοπό την παρακολούθηση της συμπεριφοράς της διεπιφανείας νερού-αέρα. Καθώς ο αέρας είναι ένα σχετικά υδροφοβικό μέσο, αλλαγές στην επιφανειακή τάση μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη των μεταβολών στη διεπιφανειακή συμπεριφορά του νερού-ελαίου. Από τις μετρήσεις που ελήφθησαν παρατηρήθηκε πως οι τιμές δεν μεταβλήθηκαν αισθητά από αυτές των διαλυμάτων-νερού γαλακτωματοποιητή.

**Πίνακας 30. Επιφανειακή τάση των νανογαλακτωμάτων**

<b>Γαλακτώματα με βάση τα εξής έλαια</b>		<b>ST [mN/m]</b>
<b>Ηλιέλαιο</b>	2% Tween 20	36.973
	4% Tween 20	34.931
	6% Tween 20	34.866
	2% Tween 40	34.362
	4% Tween 40	34.629
	6% Tween 40	35.767
<b>Ηλιέλαιο εμπλουτισμένο με λυκοπένιο</b>	2% Tween 20	32.291
	4% Tween 20	31.914
	6% Tween 20	29.854
	2% Tween 40	30.673
	4% Tween 40	29.740
	6% Tween 40	30.133
<b>Πυρηνέλαιο</b>	2% Tween 20	36.756
	4% Tween 20	35.944
	6% Tween 20	34.482
	2% Tween 40	34.887
	4% Tween 40	35.019
	6% Tween 40	34.182
<b>Πυρηνέλαιο εμπλουτισμένο με φαινολικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα</b>	2% Tween 20	34.990
	4% Tween 20	34.812
	6% Tween 20	35.473
	2% Tween 40	35.429
	4% Tween 40	33.982
	6% Tween 40	33.635
<b>Πυρηνέλαιο εμπλουτισμένο με φαινολικά από εκχύλιση φύλλων ελιάς</b>	2% Tween 20	30.295
	4% Tween 20	34.917
	6% Tween 20	34.438
	2% Tween 40	34.347
	4% Tween 40	35.137
	6% Tween 40	33.582

Η επιφανειακή τάση των απλών νανογαλακτωμάτων (αυτών που η λιπαρή τους φάση δεν ήταν εμπλουτισμένη με κάποιο βιοδραστικό συστατικό) δε μεταβλήθηκε από το είδος, την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή. Επίσης, οι επιφανειακές τάσεις των νανογαλακτωμάτων ηλιέλαιου και πυρηνέλαιου δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Αντίστοιχη παρατήρηση προέκυψε και για τα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου με εμπλουτισμένα φαινολικά συστατικά. Ωστόσο, ο εμπλουτισμός του

ηλιέλαιου με λυκοπένιο μετέβαλλε την τιμή της επιφανειακής τάσης των νανογαλακτωμάτων που περιείχαν αυτό ως λιπαρή φάση ( $p < 0,05$ ).

Ακολούθως, μετρήθηκε η διεπιφανειακή τάση ανάμεσα σε υδατικά διαλύματα που περιείχαν όμοιες αναλογίες γαλακτωματοποιητών με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων και τα αντίστοιχα έλαια, εμπλουτισμένα ή μη. Τα αποτελέσματα επισυνάπτονται στον πίνακα 31.

**Πίνακας 31. Διεπιφανειακή τάση ανάμεσα στα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή των νανογαλακτωμάτων και τα διαλύματα με διάφορες αναλογίες γαλακτωματοποιητών.**

<b>Έλαια και διαλύματα γαλακτωματοποιητών/νερού</b>		<b>ST [mN/m]</b>
<b>Ηλιέλαιο</b>	2% Tween 20	5.810
	4% Tween 20	5.668
	6% Tween 20	5.832
	2% Tween 40	5.724
	4% Tween 40	6.731
	6% Tween 40	5.824
<b>Ηλιέλαιο + λυκοπένιο</b>	2% Tween 20	4.322
	4% Tween 20	5.859
	6% Tween 20	5.719
	2% Tween 40	7.178
	4% Tween 40	5.975
	6% Tween 40	6.369
<b>Πυρηνέλαιο</b>	2% Tween 20	4.570
	4% Tween 20	5.208
	6% Tween 20	4.926
	2% Tween 40	5.946
	4% Tween 40	5.529
	6% Tween 40	5.083
<b>Πυρηνέλαιο+ φαινολικά από εκχύλιση ελαιοπυρήνα</b>	2% Tween 20	5.245
	4% Tween 20	4.616
	6% Tween 20	4.813
	2% Tween 40	6.466
	4% Tween 40	5.817
	6% Tween 40	4.140
<b>Πυρηνέλαιο+ φαινολικά από εκχύλιση φυλλων ελίας</b>	2% Tween 20	5.981
	4% Tween 20	4.784
	6% Tween 20	4.770
	2% Tween 40	6.389
	4% Tween 40	5.254
	6% Tween 40	5.162

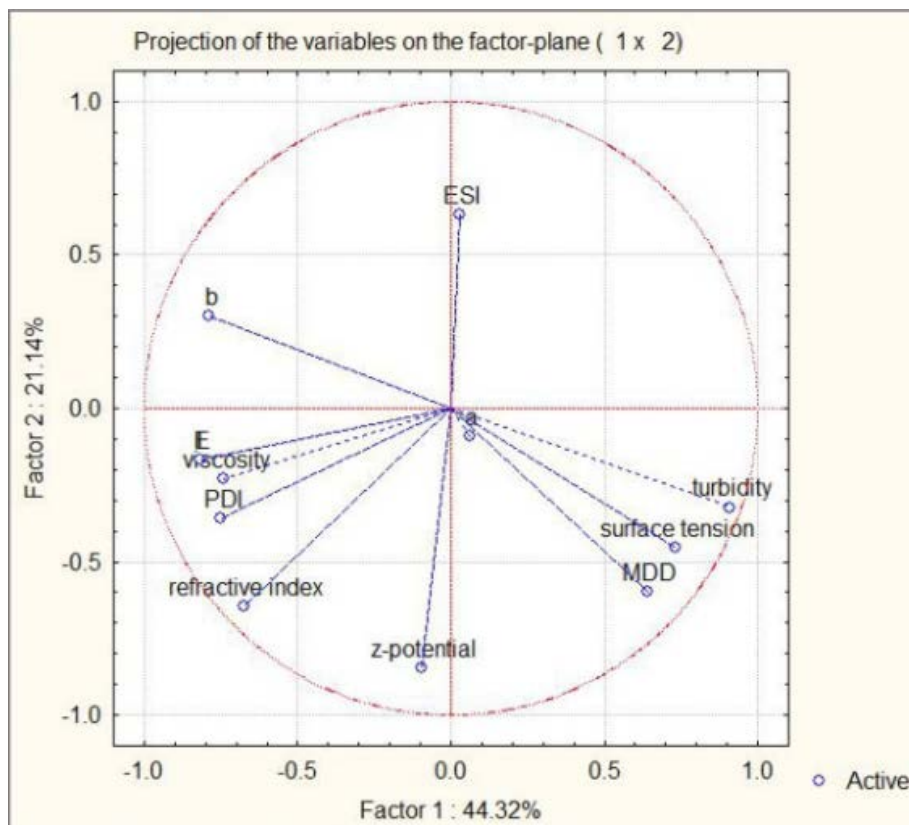
Οι υψηλές τιμές της διεπιφανειακής τάσης σημαίνει ότι κατά τη διαδικασία σχηματισμού του νανογαλακτώματος απαιτείται περισσότερη ενέργεια ώστε να κατακερματιστούν τα σταγονίδια σε μικρότερα και να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση των δύο φάσεων. Επομένως, είναι επιθυμητό οι τιμές ανάμεσα στα έλαια και στα διαλύματα νερού-γαλακτωματοποιητή να είναι χαμηλές ώστε να

πραγματοποιηθεί εύκολα η ομογενοποίηση και ο σχηματισμός του νανογαλακτώματος.

#### 4.B.5 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

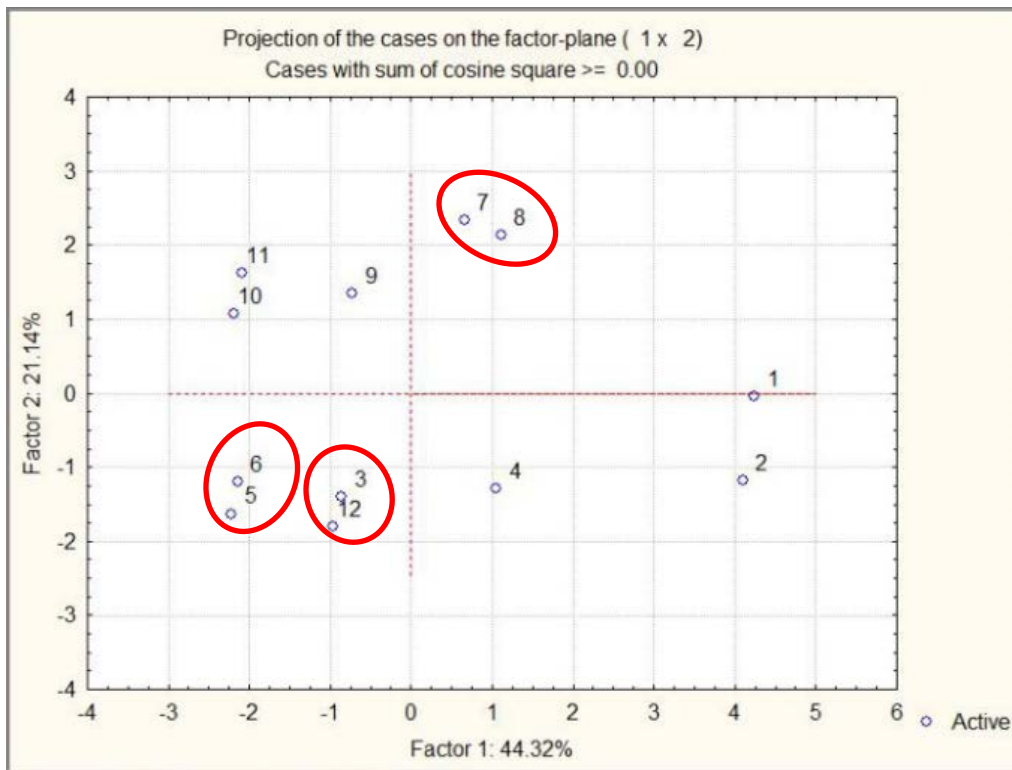
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των μεταβλητών (είδος και αναλογία γαλακτωματοποιητή, είδος ελαίου) στις ιδιότητες των μελετώμενων νανογαλακτωμάτων, τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με ανάλυση κύριων συνιστωσών. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν υπόψη οι εξής εξαρτημένες μεταβλητές (ιδιότητες): η θολότητα, το ιξώδες, το χρώμα, η μέση διάμετρος (MD), ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI), ο δείκτης σταθερότητας (ESI), ο δείκτης διάθλασης και η επιφανειακή τάση των νανογαλακτωμάτων. Ακολουθεί η ανάλυση κύριων συνιστωσών για κάθε σειρά πειράματος.

##### 4.B.5.1 Μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση πυρηνέλαιο και ηλιέλαιο



Διάγραμμα 33. Γραφική απεικόνιση των ιδιοτήτων με την ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα γαλακτώματα με βάση το διαφορετικό έλαιο, τύπο γαλακτωματοποιητή και τη διαφορετική ποσότητα γαλακτωματοποιητή.

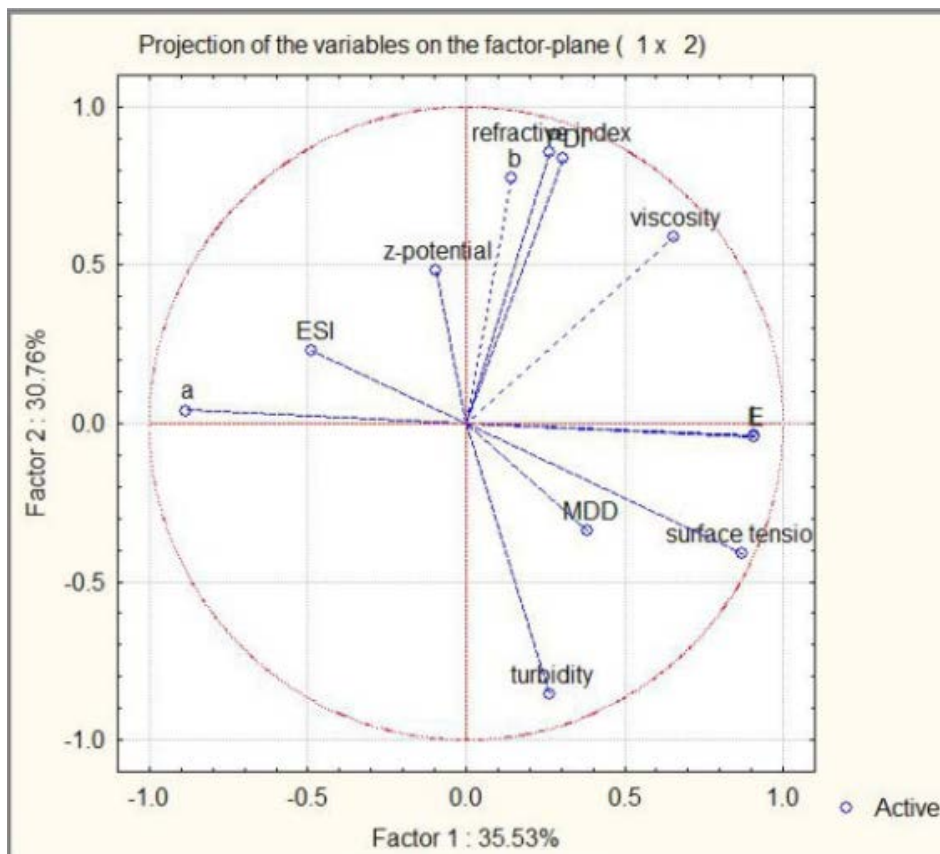




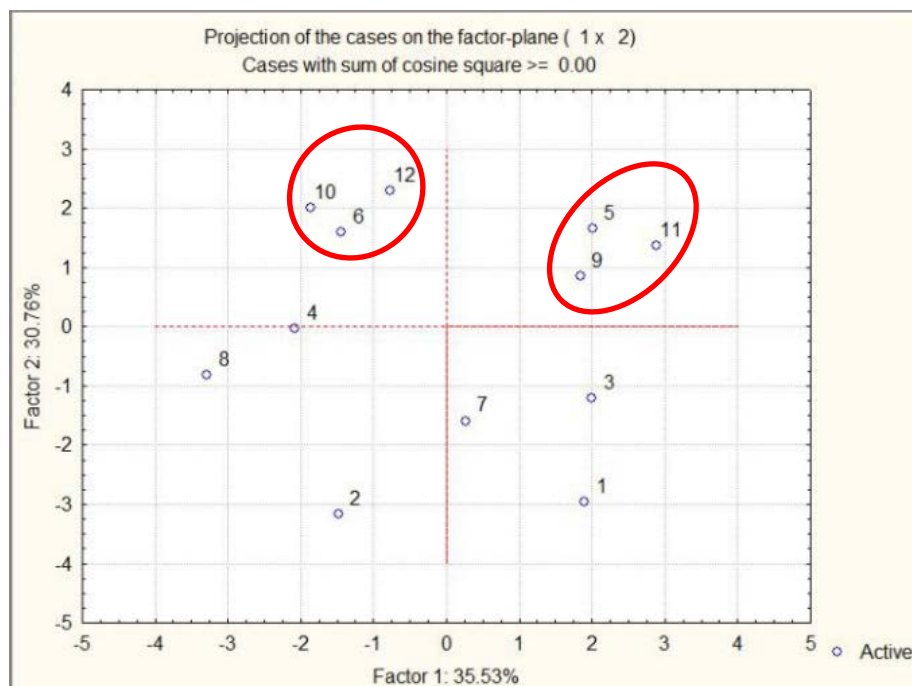
**Διάγραμμα 34. Γραφική απεικόνιση των δειγμάτων με ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα γαλακτώματα.**

Προκύπτει ότι το πείραμα παρασκευής νανογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο και πυρηνέλαιο παρείχε 2 κύριες συνιστώσες, οι οποίες είχαν 44,32% και 21,14% αντίστοιχα, ποσοστό συνεισφοράς στη συνολική διακύμανση του πειράματος. Από το διάγραμμα 33 φαίνεται ποιες παράμετροι έχουν επίδραση στις κύριες συνιστώσες και ποιες σχετίζονται μεταξύ τους. Οι παράμετροι της θολότητας και του ολικού χρώματος E επιδρούν σημαντικά στην κύρια συνιστώσα 1, ενώ το ζ-δυναμικό και ο δείκτης σταθερότητας ESI επιδρούν στη δεύτερη. Η συνιστώσα b του χρώματος και η θολότητα είναι μη συσχετίσιμες παράμετροι μεταξύ τους. Παράλληλα, στο διάγραμμα 34 μπορούν να ομαδοποιηθούν τα σημεία 5 και 6, τα οποία παρουσίασαν υψηλές τιμές στο συνολικό χρώμα E και το ιξώδες. Τα σημεία αυτά συμβολίζουν την αναλογία 6% Tween 20 που χρησιμοποιήθηκε στα νανογαλακτωμάτων των δύο ελαιών. Ακολούθως, τα σημεία 3 και 12 παρουσίασαν υψηλές τιμές στο δείκτη διάθλασης. Πράγματι, αυτά τα σημεία αντιστοιχούν σε δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις του γαλακτωματοποιητή (6% Tween 20 και 6% Tween 40) και το συμπέρασμα που εξαγεται είναι παρόμοιο με αυτό από την ανάλυση διακύμανσης ANOVA για το δείκτη διάθλασης, δηλαδή ότι επηρεάζεται σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή. Μία επιπλέον ομαδοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί για τα σημεία 7 και 8 τα οποία αποτελούν την αναλογία 2% Tween 40 και παρουσίασαν τον υψηλότερο δείκτη σταθερότητας από τα υπόλοιπα. Ταυτόχρονα τα σημεία αυτά παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές στο δείκτη διάθλασης.

#### 4.B.5.2 Εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λυκοπένιο (έλαιο: ηλιέλαιο)



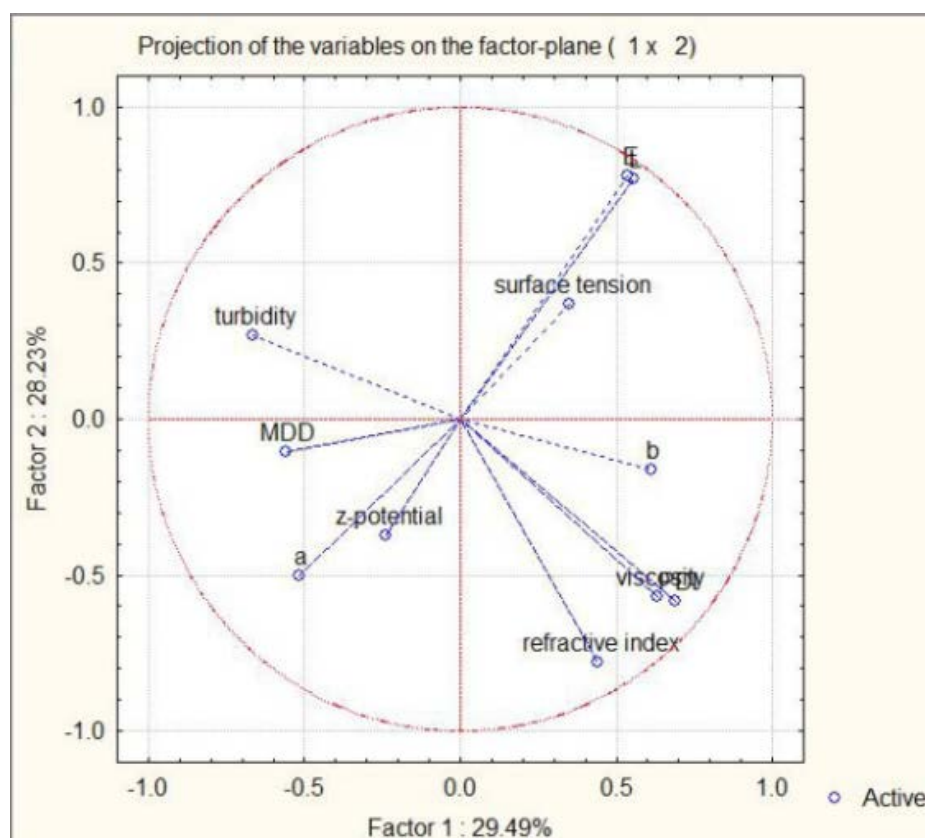
Διάγραμμα 35. Γραφική απεικόνιση των ιδιοτήτων με την ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα γαλακτώματα με βάση τη προσθήκη του λυκοπένιου και το διαφορετικό τύπο και ποσότητα γαλακτωματοποιητή.



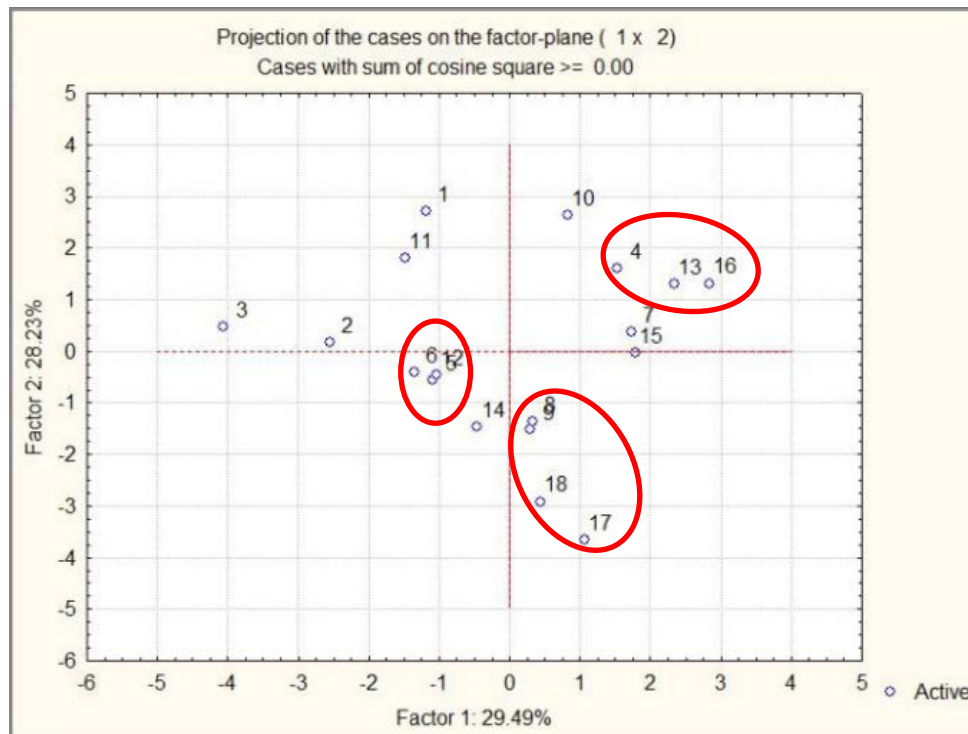
Διάγραμμα 36. Γραφική απεικόνιση των δειγμάτων με ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα νανογαλακτώματα.

Για τα πειράματα παρασκευής ναογαλακτωμάτων με εμπλουτισμένο λυκοπένιο, σύμφωνα με το πρώτο διάγραμμα, προκύπτει ότι δύο κύριες συνιστώσες συνεισέφεραν στη συνολική διακύμανση του πειράματος με ολικό ποσοστό 66,29%. Το ολικό χρώμα E, ο παράγοντας a του χρώματος και η επιφανειακή τάση επιδρούν σημαντικά στην πρώτη κύρια συνιστώσα, ενώ η θολότητα, δείκτης διάθλασης και δείκτης πολυδιασποράς (PDI) στη δεύτερη. Ταυτόχρονα, στο διάγραμμα 36 φαίνεται πως μπορούν να ομαδοποιηθούν τα σημεία 5,9 και 11 τα οποία παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές στο ιξώδες των ναογαλακτωμάτων. Τα σημεία αυτά αντιστοιχούν στις αναλογίες 4% Tween 40 και 6% Tween 20 και Tween 40 των απλών ναογαλακτωμάτων με ηλιέλαιο. Επιπλέον ομαδοποιούνται τα σημεία 6,10,12 τα οποία αφορούν τις ίδιες αναλογίες που αναφέρθηκαν ακριβώς από πάνω, αλλά στα ναογαλακτώματα ηλιέλαιου εμπλουτισμένου με λυκοπένιο. Για αυτά τα σημεία ο δείκτης σταθερότητας έλαβε υψηλές τιμές.

#### 4.B.5.3 Εμπλουτισμένα ναογαλακτώματα με φαινολικά συστατικά από διαφορετικά εκχυλίσματα (έλαιο: πυρηνέλαιο)



Διάγραμμα 37. Γραφική απεικόνιση των ιδιοτήτων με την ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα γαλακτώματα με βάση τη προσθήκη των φαινολικών και το διαφορετικό τύπο και ποσότητα γαλακτωματοποιητή.



**Διάγραμμα 38. Γραφική απεικόνιση των δειγμάτων με ανάλυση κύριων συνιστωσών για τα νανογαλακτώματα.**

Για το πείραμα της παρασκευής νανογαλακτωμάτων με εμπλουτισμένα φαινολικά συστατικά προκύπτουν δύο κύριες συνιστώσες. Η πρώτη έχει 29,49% και η δεύτερη 28,23% ποσοστό συνεισφοράς στη συνολική διακύμανση του πειράματος. Ο δείκτης πολυδιασποράς επιδρά σημαντικά στην πρώτη κύρια συνιστώσα, ενώ το ολικό χρώμα E, η παράμετρος L του χρώματος (φωτεινότητα) και ο δείκτης διάθλασης στη δεύτερη. Παράλληλα παρατηρείται πως το θολότητα με τον παράγοντα b και ο παράγοντας a του χρώματος με την επιφανειακή τάση είναι μη συσχετίσιμες παράμετροι μεταξύ τους.

Από το διάγραμμα 38 μπορεί να γίνει μια ομαδοποίηση στα σημεία 13,16,4 τα οποία παρουσίασαν υψηλές τιμές στην επιφανειακή τάση. Τα σημεία αυτά συμβολίζουν τις αναλογίες 4% Tween 20 και 4%, 6% Tween 40 που χρησιμοποιήθηκαν στα απλά νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου. Αντίστοιχα, τα σημεία 8,9,17,18 ομαδοποιούνται ως προς τις υψηλές τιμές που παρουσίασαν για το δείκτη διάθλασης. Τα σημεία αυτά συμβολίζουν την αναλογία 6% και για τους δύο γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν στα νανογαλακτώματα με εμπλουτισμένα φαινολικά συστατικά. Ήδη από την ανάλυση διακύμανσης είχε προκύψει ότι ο δείκτης διάθλασης επηρεάζεται σημαντικά από την αναλογία του γαλακτωματοποιητή. Τέλος, ομαδοποιούνται τα σημεία 5,6 και 12 τα οποία εμφάνισαν τις καλύτερες (μέσες) τιμές στη διάμετρο των σταγονιδίων των νανογαλακτωμάτων. Τα σημεία αυτά αποτελούν τις αναλογίες 4% Tween 20 για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα από τα φαινολικά των δύο εκχυλίσεων και την αναλογία 2% Tween 40 για το νανογαλακτώμα που εμπλουτίστηκε με φαινολικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

## Κεφάλαιο 5 : Συμπεράσματα-Προτάσεις

---

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα παρασκευής ο/ω νανογαλακτωμάτων με βάση το νερό και με λιπαρή φάση ηλιέλαιο και πυρηνέλαιο. Χρησιμοποιήθηκαν μη ιοντικοί γαλακτωματοποιητές Tween 20 και Tween 40, ώστε να προσδιοριστεί η γαλακτωματοποιητική τους ικανότητα στα συγκεκριμένα κολλοειδή συστήματα. Στη συνέχεια ενσωματώθηκαν λιπόφιλα βιοδραστικά συστατικά στη λιπαρή φάση των νανογαλακτωμάτων και μελετήθηκαν οι ιδιότητες των τελικών συστημάτων. Τα συστατικά αυτά ήταν λυκοπένιο (στα νανογαλακτώματα με βάση το ηλιέλαιο) όπως και φαινολικά συστατικά από εκχύλισμα ελαιοπυρήνα και εκχύλισμα φύλλων ελιάς (στα νανογαλακτώματα βάση το πυρηνέλαιο).

Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμπεραίνεται αρχικά ότι είναι δυνατόν να παρασκευαστούν σταθερά ο/ω νανογαλακτώματα με λιπαρή φάση τα δύο έλαια που αναφέρθηκαν, αλλά και τις αντίστοιχες ενσωματώσεις. Από τα διαγράμματα φάσης προέκυψε ότι η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή δεν πρέπει να είναι απαραίτητως υψηλή, για να σταθεροποιηθούν τα μικροσταγονίδια που παράγονται κατά την ομογενοποίηση του νανογαλακτώματος. Επιπλέον, οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή σχηματίζουν πολύ πηκτά διαλύματα, οπότε ο γαλακτωματοποιητής δεν διαλυτοποιείται πλήρως, με αποτέλεσμα να μην δημιουργείται νανογαλάκτωμα. Η προσθήκη των βιοδραστικών συστατικών στα έλαια ενδεχομένως να οδηγούσε σε αφομοίωση μεγαλύτερης ποσότητας ελαίου στο νανογαλάκτωμα, για τις ίδιες αναλογίες γαλακτωματοποιητή και αυτό για το λόγο ότι τα συγκεκριμένα συστατικά λειτούργησαν θετικά ως προς τις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων (μικρότερη μέση διάμετρος, χαμηλή επιφανειακή τάση ελαίου κλπ).

Η αναλογία γαλακτωματοποιητή που επέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων κρίθηκε η 4% κ.β. τελικού μίγματος. Ως προς τους γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά τα πειράματα, ο γαλακτωματοποιητής Tween 20 έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον Tween 40. Το κύριο πρόβλημα με το συγκεκριμένο γαλακτωματοποιητή ήταν στην εμφάνιση του νανογαλακτώματος καθώς μετά την εφαρμογή των δύο σταδίων κατά την παραγωγική διαδικασία (ομογενοποίηση και επεξεργασία με υπέρηχους), στην επιφάνεια του νανογαλακτώματος υπήρχαν μικρά σταγονίδια ελαίου (κηλίδες), γεγονός που έδειχνε πως ο συγκεκριμένος γαλακτωματοποιητής δεν διέθετε καλή γαλακτωματοποιητική ικανότητα. Βέβαια, η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να οφείλεται και σε αλλοίωση του συγκεκριμένου γαλακτωματοποιητή.

Τα συμπεράσματα που ακολουθούν αφορούν τις μεταβολές στις ιδιότητες των νανογαλακτωμάτων που παρατηρήθηκαν λόγω της διαφορετικής λιπαρής φάσης

---

και της ενσωμάτωσης του εκάστοτε βιοδραστικού συστατικού (λυκοπένιο στο ηλιέλαιο ή πολυφαινολικά συστατικά σε πυρηνέλαιο) που πραγματοποιήθηκε και θα γίνει αναφορά στις κυριότερες.

Όσον αφορά τα απλά νανογαλακτώματα (χωρίς ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών), παρατηρήθηκε πως όταν χρησιμοποιήθηκε πυρηνέλαιο στη λιπαρή φάση προέκυψε μικρότερη μέση διάμετρος σωματιδίων σε σχέση με τα νανογαλακτώματα ηλιέλαιου. Επιπλέον, η ενσωμάτωση με τα βιοδραστικά συστατικά οδήγησε σε μικρότερη μέση διάμετρο των σταγονιδίων, γεγονός που επιβεβαιώνει πως τα συγκεκριμένα συστατικά μπορούν να λειτουργήσουν και ως γαλακτωματοποιητές. Πιο συγκεκριμένα, η ελευρωπαΐνη που υπήρχε στα φαινολικά συστατικά από εκχύλισμα φύλλων ελιάς και ελαιοπυρήνα είναι γνωστό ότι διαθέτει γαλακτωματοποιητική ικανότητα. Αντίστοιχα, και το λυκοπένιο μείωσε τη μέση διάμετρο των νανογαλακτωμάτων ηλιέλαιου σε όλες τις αναλογίες γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν. Η μεγαλύτερη τιμή της μέση διαμέτρου προέκυψε 147,9 nm και ήταν στο απλό νανογαλάκτωμα ηλιέλαιου, ενώ η μικρότερη τιμή που σημειώθηκε ήταν 56,65 nm στο νανογαλάκτωμα πυρηνέλαιου εμπλουτισμένου με φαινολικά συστατικά προερχόμενα από εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Παρατηρείται πως το συγκεκριμένο νανογαλάκτωμα ανήκει στην κατηγορία του μικρογαλακτώματος, λόγω της μικρής τιμής διαμέτρου που προέκυψε.

Ο δείκτης πολυδιασποράς των νανογαλακτωμάτων έφτασε μέχρι την τιμή του 0,627, η οποία σημειώθηκε στη μεγαλύτερη αναλογία Tween 40. Ο συγκεκριμένος γαλακτωματοποιητής δεν βοήθησε, ώστε τα σταγονίδια στο νανογαλάκτωμα που προκύπτει να είναι ομοιογενώς διεσπαρμένα στη συνεχή φάση, γεγονός το οποίο δεν ήταν επιθυμητό κατά την παρασκευή των νανογαλακτωμάτων. Η τιμή του δείκτη αυτού θα πρέπει να κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα, ώστε να προκύπτει ένα σταθερό νανογαλάκτωμα. Ανάμεσα στα δύο έλαια που χρησιμοποιήθηκαν δεν διαφοροποιήθηκαν τα αποτελέσματα για το δείκτη πολυδιασποράς, όμως η προσθήκη των φαινολικών συστατικών και από τα δύο εκχυλίσματα μείωσε την τιμή του μέχρι 0,256. Επομένως, τα φαινολικά συστατικά βοήθησαν ως προς τη διασπορά των σταγονιδίων του ελαίου στην υδατική φάση.

Επιπλέον, η προσθήκη των φαινολικών συστατικών αλλά και του λυκοπένιου στο πυρηνέλαιο και στο ηλιέλαιο αντίστοιχα, μείωσε την επιφανειακή τάση των ελαίων με αποτέλεσμα η ομογενοποίηση των υδατικών διαλυμάτων με τις αναλογίες γαλακτωματοποιητή που επιλέχθηκαν και των ελαίων, να πραγματοποιηθεί πιο εύκολα. Επόμενη ιδιότητα των νανογαλακτωμάτων που μελετήθηκε και ιδιαίτερα σημαντική για τη σταθερότητά τους ήταν το ζ-δυναμικό (ηλεκτρικό δυναμικό των σταγονιδίων). Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν μη ιοντικοί γαλακτωματοποιητές εμφανίστηκαν αρνητικές τιμές κατά τη μέτρηση του ζ-δυναμικού. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα σταγονίδια λιπιδίων που

σταθεροποιούνται με μη ιοντικούς γαλακτωματοποιητές, έχουν ένα αρνητικό φορτίο σε ουδέτερο pH, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ιοντικών προσμίξεων (όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα) στο γαλακτωματοποιητή ή στο έλαιο. Σε υψηλά pH οφείλεται στην προσρόφηση των καρβοξυλικών ιόντων στις επιφάνειες των σταγονιδίων, ενώ σε χαμηλά pH λόγω της προσρόφησης των ιόντων υδρογόνου (Hsu και Nacu, 2003 και Mun et al., 2007). Η τιμή του ζ-δυναμικού, ώστε ένα νανογαλάκτωμα να είναι σταθερό, θα πρέπει να είναι είτε μεγαλύτερη των 25 mV, είτε μικρότερη από -25 mV. Το νανογαλάκτωμα με πυρηνέλαιο παρουσίασε μία τέτοια τιμή (-24,8 mV) και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε γαλακτωματοποιητής Tween 40, ενώ σε όλες τις άλλες περιπτώσεις ανεξάρτητα από το έλαιο και την αντίστοιχη ενσωμάτωση παρατηρήθηκε ότι το ζ-δυναμικό λάμβανε τιμές κοντά στα -15 mV. Τα νανογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή Tween 20 έχουν ζ-δυναμικό το οποίο κυμαίνεται στα -10 mV, επομένως οι τιμές στα νανογαλακτώματα δεν παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις από αυτήν. Η ενσωμάτωση των βιοδραστικών συστατικών οδήγησε σε μικρή αύξηση του ζ-δυναμικού.

Ακολούθως, οι ιδιότητες που είναι δευτερεύουσας σημασίας ως προς το χαρακτηρισμό των νανογαλακτωμάτων, αλλά αποτελούν μία ποιοτική ένδειξη του τελικού προϊόντος που προκύπτει, ήταν το ιξώδες και η θολότητα. Αρχικά, το ιξώδες δεν μεταβλήθηκε από τη διαφορετική λιπαρή φάση (ηλιέλαιο ή πυρηνέλαιο) που χρησιμοποιήθηκε στο νανογαλάκτωμα. Παρατηρήθηκε μόνο αύξηση, κατά την αύξηση της αναλογίας του γαλακτωματοποιητή, όμως οι τιμές που έλαβε το ιξώδες σε όλες τις περιπτώσεις ήταν από δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερες από αυτής του νερού. Η προσθήκη των βιοδραστικών συστατικών δεν μετέβαλε σημαντικά το ιξώδες των νανογαλακτωμάτων. Ακολούθως, όσον αφορά τη θολότητα, τα νανογαλακτώματα πυρηνελαίου παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές σε σχέση με του ηλιελαίου. Η ενσωμάτωσή τους με βιοδραστικά συστατικά παρ' όλα αυτά δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή στο ιξώδες των νανογαλακτωμάτων.

Τέλος, η πιο σημαντική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, ήταν η μελέτη της σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων, τόσο των απλών όσο και των εμπλουτισμένων, καθώς έπρεπε να ελεγχθεί ο βαθμός διατήρησης του εκάστοτε ενσωματωμένου βιοδραστικού συστατικού και η διατήρηση του συστήματος ενσωμάτωσής του. Όλα τα νανογαλακτώματα αποδείχθηκε ότι διέθεταν υψηλή κινητική σταθερότητα, καθώς μετά την πάροδο ενός μήνα, ο δείκτης σταθερότητας των νανογαλακτωμάτων είχε υψηλές τιμές και δεν μεταβλήθηκε ανάλογα με το είδος της λιπαρής φάσης, ούτε ανάλογα με την ενσωμάτωση των βιοδραστικών συστατικών. Το λυκοπένιο, στα νανογαλακτώματα ηλιελαίου που ενσωματώθηκε, παρατηρήθηκε πως στις πρώτες δύο εβδομάδες διατήρησής του μεταβλήθηκε ανάλογα με την περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή στο νανογαλάκτωμα. Όσο μεγαλύτερη ήταν η αναλογία του γαλακτωματοποιητή τόσο μικρότερη οξειδωτική αποδόμηση του λυκοπένιου

παρατηρήθηκε. Οι μεγάλες αναλογίες του γαλακτωματοποιητή Tween 40 (4% και 6%) διατήρησαν εξαρχής το λυκοπένιο σε υψηλά ποσοστά, καθώς φαίνεται πως το «προστάτευσαν» κατά την παραγωγική διαδικασία του νανογαλακτώματος που περιλάμβανε και επεξεργασία με υπέρηχους. Μετά την πάροδο δύο εβδομάδων το λυκοπένιο παρέμεινε στα ίδια επίπεδα και δεν μεταβλήθηκε. Η ενσωμάτωση φαινολικών συστατικών αντίστοιχα προέκυψε ότι ήταν επιτυχημένη και τα φαινολικά συστατικά από τα δύο εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στα νανογαλακτώματα πυρηνέλαιου κατά 75% (από το εκχύλισμα ελαιοπυρήνα), ενώ κατά 67,35% (από το εκχύλισμα φύλλων ελιάς). Συνεπώς συμπεραίνεται πως τα ο/ω νανογαλακτώματα μπορούν να λειτουργήσουν ως καλοί φορείς ενσωμάτωσης λιπόφιλων βιοδραστικών συστατικών.

Καταλήγοντας, ωφέλιμο θα ήταν να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνες στη διατήρηση των νανογαλακτωμάτων υπό ψύξη και στην αξιοποίηση κρυπροστατευτικών υλικών για το σκοπό αυτό. Επιπλέον, μελέτες μπορούν να διεξαχθούν στο μέλλον για την ενσωμάτωση άλλων βιοδραστικών συστατικών ή και αιθέριων ελαίων στα νανογαλακτώματα, όπως και την αξιοποίηση φυσικών γαλακτωματοποιητών στην παρασκευή του νανογαλακτώματος. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ως συμπληρωματική έρευνα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ενσωμάτωση του νανογαλακτώματος (με μορφή ένεσης) σε κάποιο τρόφιμο και μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του λυκοπένιου και των φαινολικών συστατικών στο τελικό προϊόν. Τέλος, ως προς τον εμπλουτισμό κάποιου τροφίμου με βιοδραστικό συστατικό κρίνεται σημαντική και η μελέτη του εγκλεισμού του εν λόγω συστατικού στο νανογαλάκτωμα, αντί της ενσωμάτωσής του.



## Βιβλιογραφία

---

1. McClements, D. J. (2016). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
2. Benichou A., Aserin A. and Garti N. (2004). *Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29-41
3. Mitsou, E., Tavantzis, G., Sotiroudis, G., Ladikos, D., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2016). Food grade water-in-oil microemulsions as replacement of oil phase to help process and stabilization of whipped cream. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 510, 69-76.
4. Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.
5. Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1413-1423.
6. Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89-98.
7. Dehghani, F., Farhadian, N., Golmohammadzadeh, S., Birihaee, A., Ebrahimi, M., & Karimi, M. (2017). Preparation, characterization and in-vivo evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 479-489.
8. Garti, N. (Ed.). (2008). *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. Elsevier.
9. Vicentini, F. T., Simi, T. R., Del Ciampo, J. O., Wolga, N. O., Pitol, D. L., Iyomasa, M. M., ... & Fonseca, M. J. (2008). Quercetin in w/o microemulsion: in vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 948-957.
10. Setya, S., Talegaonkar, S., & Razdan, B. K. (2014). Nanoemulsions: Formulation methods and stability aspects. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(2), 2214.
11. Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635.
12. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Food chemistry, 4th revised and extended edn. *Berlin (DE): Springer*.
13. Sagis, L. M. (Ed.). (2015). *Microencapsulation and microspheres for food applications*. Academic Press.

14. Takamura, A., Minowa, T., Noro, S., & Kubo, T. (1979). Effects of Tween and Span group emulsifiers on the stability of o/w emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 2921-2926.
15. Dalgleish, D.G. (2001). *Food Emulsions*. In *Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology*, ed Sjoblom, J., New York, Marcel Dekker.
16. Özogul, Y., Durmus, M., Ucar, Y., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 422-430.
17. McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.
18. Walker, R. M. (2015). *Fish Oil Nanoemulsions: Optimization of Physical and Chemical Stability for Food System Applications*.
19. McClements, D. J. and J. Rao (2011). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 285-330.
20. Ostertag, F., J. Weiss, and D. J. McClements (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 95-102.
21. Robins, M. M., A. D. Watson, and P. J. Wilde (2002). Emulsions—Creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 419-425.
22. Krog, N.J., and Sparso, F.V. (2004). Food Emulsifiers: Their Chemical and Physical Properties. In *Food Emulsions*, 4rd Ed., eds Friberg, S.E., Larsson, K., and Sjoblom, J., New York, Marcel Dekker.
23. Bai, L., Huan, S., Gu, J., & McClements, D. J. (2016). Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 61, 703-711.
24. Choi, S. J., Won, J. W., Park, K. M., & Chang, P. S. (2014). A new method for determining the emulsion stability index by backscattering light detection. *Journal of Food Process Engineering*, 37(3), 229-236.
25. Rajinder Pal, *Rheology of simple and multiple emulsions (desktop)*
26. Gunstone, F. (Ed.). (2011). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
27. Gao, B., Luo, Y., Lu, W., Liu, J., Zhang, Y., & Yu, L. L. (2017). Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO<sub>2</sub> ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 218, 569-574.
28. Grompone, M. A. (2005). Sunflower oil. *Bailey's industrial oil and fat products*.

29. Upadhyay, R., Sehwag, S., & Mishra, H. N. (2017). Chemometric approach to develop frying stable sunflower oil blends stabilized with oleoresin rosemary and ascorbyl palmitate. *Food Chemistry*, 218, 496-504.
30. Guinda, Á., Dobarganes, M. C., Ruiz-Mendez, M., & Mancha, M. (2003). Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. *European journal of lipid science and technology*, 105(3-4), 130-137.
31. Dobarganes, M. C., Marquez-Ruiz, G., & Perez-Camino, M. C. (1993). Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 678-681.
32. Dobson, G., Christie, W. W., & Dobarganes, M. C. (1996). Changes in molecular species of triacylglycerols during frying. *Grasas y aceites*, 47(1-2), 34-37.
33. Guinda, Á., Dobarganes, M. C., Ruiz-Mendez, M., & Mancha, M. (2003). Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. *European journal of lipid science and technology*, 105(3-4), 130-137.
34. McClements, D.J., Decker, E.A., and Weiss, J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J Food Sci.* 72: 109-124.
35. Κ. Τζιά, (1987). Συμβολή στη μελέτη του εξευγενισμού υψηλόβαθμων πυρηνέλαιων, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
36. Koukouch, A., Idlimam, A., Asbik, M., Sarh, B., Izrar, B., Bostyn, S., & Amine, A. (2017). Experimental determination of the effective moisture diffusivity and activation energy during convective solar drying of olive pomace waste. *Renewable Energy*, 101, 565-574.
37. Yanik, D. K. (2017). Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 45-51.
38. Akay, F., Kazan, A., Celiktas, M. S., & Yesil-Celiktas, O. (2015). A holistic engineering approach for utilization of olive pomace. *The Journal of Supercritical Fluids*, 99, 1-7.
39. Meziane, S. (2013). Optimization of oil extraction from olive pomace using response surface methodology. *Food Science and Technology International*, 19, 315-322.
40. Chanioti, S., & Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 178-189.
41. Lama-Muñoz, A., Álvarez-Mateos, P., Rodríguez-Gutiérrez, G., Durán-Barrantes, M. M., & Fernández-Bolaños, J. (2014). Biodiesel production from

- olive–pomace oil of steam-treated alperujo. *biomass and bioenergy*, 67, 443-450.
42. Bhushani, J. A., Karthik, P., & Anandharamakrishnan, C. (2016). Nanoemulsion based delivery system for improved bioaccessibility and Caco-2 cell monolayer permeability of green tea catechins. *Food Hydrocolloids*, 56, 372-382.
  43. McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
  44. Grumezescu, A. (Ed.). (2016). *Emulsions* (Vol. 3). Academic Press.
  45. Grumezescu, A. (Ed.). (2016). *Novel Approaches of Nanotechnology in Food* (Vol. 1). Academic Press.
  46. Haug, A., Hostmark, A.T., Harstad, O.M., (2007). Bovine milk in human nutrition– review. *Lipids Health Dis.* 6 (25), 1–16.
  47. McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72 (8), 109–124.
  48. Agarwal, S. and Rao, A.V. (2000). Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabol. Drug Interact.* 17,189–210.
  49. Rao, A. V., Ray, M. R., & Rao, L. G. (2006). Lycopene. *Advances in food and nutrition research*, 51, 99-164.
  50. Kiokias, S., Proestos, C., & Varzakas, T. (2016). A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4(Special Issue Carotenoids March 2016), 25-37.
  51. Kiokias, S., Dimakou, C., & Oreopoulou, V. (2009). Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. *Food chemistry*, 114(4), 1278-1284.
  52. Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., Decker, E. A., & Gao, Y. (2013). Influence of pH, EDTA,  $\alpha$ -tocopherol, and WPI oxidation on the degradation of  $\beta$ -carotene in WPI-stabilized oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 236-241.
  53. Dimakou, C., & Oreopoulou, V. (2012). Antioxidant activity of carotenoids against the oxidative destabilization of sunflower oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 393-400.
  54. Yeum, K. J., & Russell, R. M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22, 483-504.
  55. Svelander, C. A., Tibäck, E. A., Colle, I. J., Altskär, A. I., Alminger, M. A., Hendrickx, M. E., et al. (2009). Mechanical and thermal treatments of tomato and carrot: Effects on in vitro bioaccessibility of carotenes and microstructure, Potsdam

56. Hou, Z., Liu, Y., Lei, F., & Gao, Y. (2014). Investigation into the in vitro release properties of  $\beta$ -carotene in emulsions stabilized by different emulsifiers. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 867-873.
57. Hart, D. J., & Scott, K. J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.
58. Philip, T., & Chen, T. S. (1988). Separation and quantitative analysis of some carotenoid fatty acid esters of fruits by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 435, 113-126.
59. Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. *Current Opinion in Food Science*, 1, 56-63.
60. Kiokias, S., & Oreopoulou, V. (2006). Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 132-139.
61. Rao, A.V. and Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr. Res.* 19, 305–323.
62. Shin, G. H., Kim, J. T., & Park, H. J. (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 144-157.
63. Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C. H., Chidewe, C., Ndhlala, A. R., & Benhura, M. A. N. (2007). Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, 2, 414-420.
64. Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.
65. Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
66. Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000, 657-691.
67. Lu, W., Kelly, A. L., & Miao, S. (2016). Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 1-9.
68. Costa, D. C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Ramos, F., Castilho, M. C., & Sanches-Silva, A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 336-354.
69. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

70. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
71. Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*.
72. Di Mattia, C., Paradiso, V. M., Andrich, L., Giarnetti, M., Caponio, F., & Pittia, P. (2014). Effect of olive oil phenolic compounds and maltodextrins on the physical properties and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Biophysics*, 9 (4), 396–405.
73. Souilem, S., Kobayashi, I., Neves, M. A., Sayadi, S., Ichikawa, S., & Nakajima, M. (2014). Preparation of monodisperse food-grade oleuropein-loaded w/o/w emulsions using microchannel emulsification and evaluation of their storage stability. *Food and Bioprocess Technology*, 7(7), 2014–2027.
74. Giacintucci, V., Di Mattia, C., Sacchetti, G., Neri, L., & Pittia, P. (2016). Role of olive oil phenolics in physical properties and stability of mayonnaise-like emulsions. *Food Chemistry*, 213, 369-377.
75. Di Mattia, C., Sacchetti, G., & Pittia, P. (2011). Interfacial behavior and antioxidant efficiency of olive phenolic compounds in o/w olive oil emulsions as affected by surface active agent type. *Food Biophysics*, 6(2), 295–302.
76. Badee, Z. M., Amal, Abd El-Kader, E., & Hanan, M. A. (2012). Microencapsulation of peppermint oil by spray drying. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6, 499-504.
77. Chanioti, S., Siamandoura, P., & Tzia, C. (2016). Evaluation of Extracts Prepared from Olive Oil By-Products Using Microwave-Assisted Enzymatic Extraction: Effect of Encapsulation on the Stability of Final Products. *Waste and Biomass Valorization*, 7(4), 831-842.
78. Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 107-112.
79. Chanioti, C., & Tzia, C. (2014). Arabic gum mixtures as encapsulating agents of freeze-dried fennel oleoresin products. *Food and bioprocess technology*, 7(4), 1057-1065.
80. Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
81. Fardet, A., Rock, E., & Remesy, C. (2008). Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 258–276.
82. Ferreira, I. C. F. R., Martins, N., & Barros, L. (2017). Phenolic Compounds and Its Bioavailability: In Vitro Bioactive Compounds or Health Promoters. *Advances in Food and Nutrition Research*.

83. Richards, M. P., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of surfactant micelles to alter the partitioning of phenolic antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(5), 1254-1259.
84. Chanioti, S., & Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 178-189.
85. Wang, M., Feng, M. Q., Jia, K., Sun, J., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2017). Effects of flaxseed gum concentrations and pH values on the stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 67, 54-62.
86. Salvia-Trujillo, L., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of lycopene bioaccessibility from tomato juice using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size. *Food chemistry*, 210, 295-304.
87. Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of  $\beta$ -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. *Food chemistry*, 135(3), 1036-1043.
88. Craig, D. Q. M., Lievens, H. S. R., Pitt, K. G., & Storey, D. E. (1993). An investigation into the physico-chemical properties of self-emulsifying systems using low frequency dielectric spectroscopy, surface tension measurements and particle size analysis. *International journal of pharmaceuticals*, 96(1-3), 147-155.
89. Chang, Y., & McClements, D. J. (2016). Influence of emulsifier type on the in vitro digestion of fish oil-in-water emulsions in the presence of an anionic marine polysaccharide (fucoidan): Caseinate, whey protein, lecithin, or Tween 80. *Food Hydrocolloids*, 61, 92-101.

## Παράρτημα

Στατιστική επεξεργασία των ιδιοτήτων των νανογαλακτωμάτων με ANOVA με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA 7.

### 1<sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων: μη εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα

27 Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων

Effect	Univariate Tests of Significance for MDD (Elena-Iadia-t) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	143721.0	1	143721.0	324.2298	0.000000
Emuls Code	2147.8	1	2147.8	4.8453	0.063618
Emulsion Ratio %	1606.5	2	803.3	1.8121	0.232168
<b>Oil phase code</b>	1023.8	1	1023.8	2.3096	<b>0.172374</b>
Error	3102.9	7	443.3		

26. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη πολυδιασποράς

Effect	Univariate Tests of Significance for PDI (Elena-Iadia-t) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2.110085</b>	<b>1</b>	<b>2.110085</b>	<b>1132.411</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.003888	1	0.003888	2.087	0.191829
Emulsion Ratio %	<b>0.080711</b>	<b>2</b>	<b>0.040356</b>	<b>21.657</b>	<b>0.001004</b>
Oil phase code	0.000192	1	0.000192	0.103	0.757583
Error	0.013044	7	0.001863		

29 Αποτελέσματα ANOVA για τη θολότητα

Effect	Univariate Tests of Significance for turbidity (Elena-Iad) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>23.43118</b>	<b>1</b>	<b>23.43118</b>	<b>72.53809</b>	<b>0.000061</b>
Emuls Code	<b>2.71915</b>	<b>1</b>	<b>2.71915</b>	<b>8.41792</b>	<b>0.022941</b>
Emulsion Ratio %	2.86611	2	1.43305	4.43644	0.056957
Oil phase code	0.18532	1	0.18532	0.57371	0.473510
Error	2.26113	7	0.32302		

28. Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες

Effect	Univariate Tests of Significance for viscosity (Elena-Ia) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	90.14601	1	90.14601	5047.167	0.000000
Emuls Code	0.00908	1	0.00908	0.508	0.499029
<b>Emulsion Ratio %</b>	<b>0.36232</b>	<b>2</b>	<b>0.18116</b>	<b>10.143</b>	<b>0.008552</b>
Oil phase code	0.02168	1	0.02168	1.214	0.307059
Error	0.12503	7	0.01786		

31 Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-δυναμικό

Effect	Univariate Tests of Significance for z-potential (Elena-I) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3201.987	1	3201.987	627.1923	0.000000
<b>Emuls Code</b>	<b>174.651</b>	<b>1</b>	<b>174.651</b>	<b>34.2099</b>	<b>0.000631</b>
Emulsion Ratio %	47.923	2	23.962	4.6935	0.050944
Oil phase code	1.191	1	1.191	0.2332	0.643877
Error	35.737	7	5.105		

30. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη διάθλασης

Effect	Univariate Tests of Significance for refractive index (Ela) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>21.57079</b>	<b>1</b>	<b>21.57079</b>	<b>18152138</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.00000	1	0.00000	1	0.397842
Emulsion Ratio %	<b>0.00004</b>	<b>2</b>	<b>0.00002</b>	<b>15</b>	<b>0.003041</b>
Oil phase code	0.00000	1	0.00000	3	0.114761
Error	0.00001	7	0.00000		



### 32. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα L (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for L (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>21812.49</b>	<b>1</b>	<b>21812.49</b>	<b>20048.43</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.02	1	0.02	0.02	0.897704
Emulsion Ratio %	4.37	2	2.18	2.01	0.204605
Oil phase code	0.05	1	0.05	0.04	0.840437
Error	7.62	7	1.09		

### 33. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα α (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for α (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>0.800833</b>	<b>1</b>	<b>0.800833</b>	<b>35.28661</b>	<b>0.000576</b>
Emuls Code	0.013556	1	0.013556	0.59733	0.464890
Emulsion Ratio %	0.008017	2	0.004008	0.17662	0.841722
Oil phase code	0.004033	1	0.004033	0.17772	0.685985
Error	0.158866	7	0.022695		

### 37. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα β (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for β (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>8.027852</b>	<b>1</b>	<b>8.027852</b>	<b>16.04548</b>	<b>0.005153</b>
Emuls Code	5.185484	1	5.185484	10.36436	0.014666
Emulsion Ratio %	6.217179	2	3.108590	6.21322	0.028085
Oil phase code	1.023752	1	1.023752	2.04620	0.195670
Error	3.502230	7	0.500319		

### 34. Αποτελέσματα ANOVA για το χρώμα E

Effect	Univariate Tests of Significance for β (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>8.027852</b>	<b>1</b>	<b>8.027852</b>	<b>16.04548</b>	<b>0.005153</b>
Emuls Code	5.185484	1	5.185484	10.36436	0.014666
Emulsion Ratio %	6.217179	2	3.108590	6.21322	0.028085
Oil phase code	1.023752	1	1.023752	2.04620	0.195670
Error	3.502230	7	0.500319		

### 36. Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων κατά τη διατηρησιμότητα των νανογαλακτωμάτων

Effect	Univariate Tests of Significance for MDD (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>143721.0</b>	<b>1</b>	<b>143721.0</b>	<b>324.2298</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	2147.8	1	2147.8	4.8453	0.063618
Emulsion Ratio %	1606.5	2	803.3	1.8121	0.232168
<b>Oil phase code</b>	<b>1023.8</b>	<b>1</b>	<b>1023.8</b>	<b>2.3096</b>	<b>0.172374</b>
Error	3102.9	7	443.3		

### 35. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη ESI

Effect	Univariate Tests of Significance for ESI (Elena-ladia-twee Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>111611.9</b>	<b>1</b>	<b>111611.9</b>	<b>7206.385</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	29.1	1	29.1	1.882	0.212508
Emulsion Ratio %	47.0	2	23.5	1.518	0.283428
Oil phase code	1.3	1	1.3	0.085	0.779511
Error	108.4	7	15.5		

## 2<sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με λυκοπένιο νανογαλακτώματα

### 39. Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο (MDD)

Effect	Univariate Tests of Significance for MDD (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>156118.5</b>	<b>1</b>	<b>156118.5</b>	<b>363.4718</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	1664.0	1	1664.0	3.8742	0.089716
Emulsion Ratio %	2209.1	2	1104.5	2.5715	0.145442
Bioactive compound Code	255.5	1	255.5	0.5948	0.465794
Error	3006.6	7	429.5		

### 38. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη PDI

Effect	Univariate Tests of Significance for PDI (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2.131947</b>	<b>1</b>	<b>2.131947</b>	<b>592.2819</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	0.010208	1	0.010208	2.8360	0.136046
Emulsion Ratio %	<b>0.124335</b>	<b>2</b>	<b>0.062168</b>	<b>17.2710</b>	<b>0.001964</b>
Bioactive compound Code	0.000040	1	0.000040	0.112	0.918668
Error	0.025197	7	0.003600		

### 41 Αποτελέσματα ANOVA για τη θολότητα

Effect	Univariate Tests of Significance for turbidity (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>20.13747</b>	<b>1</b>	<b>20.13747</b>	<b>39.13468</b>	<b>0.00042</b>
Emulsifier Code	2.52183	1	2.52183	4.90086	0.06244
Emulsion Ratio %	3.33565	2	1.66783	3.24121	0.10084
Bioactive compound Code	0.61400	1	0.61400	1.19324	0.31083
Error	3.60198	7	0.51457		

### 40. Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες

Effect	Univariate Tests of Significance for viscosity (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>81.69301</b>	<b>1</b>	<b>81.69301</b>	<b>4094.643</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	0.02901	1	0.02901	1.454	0.267064
Emulsion Ratio %	<b>0.21782</b>	<b>2</b>	<b>0.10891</b>	<b>5.459</b>	<b>0.037271</b>
Bioactive compound Code	0.09541	1	0.09541	4.782	0.064985
Error	0.13966	7	0.01995		

### 43 Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-δυναμικό

Effect	Univariate Tests of Significance for z-potential (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2527.642</b>	<b>1</b>	<b>2527.642</b>	<b>133.8819</b>	<b>0.000008</b>
Emulsifier Code	71.151	1	71.151	3.7686	0.093356
Emulsion Ratio %	117.370	2	58.685	3.1084	0.108120
Bioactive compound Code	27.241	1	27.241	1.4429	0.268739
Error	132.158	7	18.880		

### 42. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη διάθλασης

Effect	Univariate Tests of Significance for refractive index (Elenalycopen) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>21.59064</b>	<b>1</b>	<b>21.59064</b>	<b>188525320</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	0.00000	1	0.00000	0	0.516912
<b>Emulsion Ratio %</b>	<b>0.00006</b>	<b>2</b>	<b>0.00003</b>	<b>276</b>	<b>0.000000</b>
Bioactive compound Code	0.00000	1	0.00000	0	0.624527
Error	0.00000	7	0.00000		

#### 45. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα L (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for L (Elenalycopene) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>18465.95</b>	<b>1</b>	<b>18465.95</b>	<b>36100.42</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	0.17	1	0.17	0.34	0.578030
Emulsion Ratio %	2.56	2	1.28	2.50	0.151416
Bioactive compound Code	<b>144.46</b>	<b>1</b>	<b>144.46</b>	<b>282.41</b>	<b>0.000001</b>
Error	3.58	7	0.51		

#### 44. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα α (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for α (Elenalycopene) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2.717008</b>	<b>1</b>	<b>2.717008</b>	<b>59.44539</b>	<b>0.000115</b>
Emulsifier Code	0.046875	1	0.046875	1.02558	0.344917
Emulsion Ratio %	0.048467	2	0.024233	0.53020	0.610372
Bioactive compound Code	<b>0.667408</b>	<b>1</b>	<b>0.667408</b>	<b>14.60222</b>	<b>0.006531</b>
Error	0.319942	7	0.045706		

#### 47. Αποτελέσματα ANOVA για το παράγοντα β (χρώμα)

Effect	Univariate Tests of Significance for β (Elenalycopene) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>1.721419</b>	<b>1</b>	<b>1.721419</b>	<b>3.88255</b>	<b>0.089436</b>
Emulsifier Code	<b>6.984502</b>	<b>1</b>	<b>6.984502</b>	<b>15.75309</b>	<b>0.005399</b>
Emulsion Ratio %	<b>7.036738</b>	<b>2</b>	<b>3.518369</b>	<b>7.93545</b>	<b>0.015862</b>
Bioactive compound Code	0.259602	1	0.259602	0.58552	0.469166
Error	3.103615	7	0.443374		

#### 46. Αποτελέσματα ANOVA για το χρώμα Ε

Effect	Univariate Tests of Significance for Ε (Elenalycopene) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>18489.13</b>	<b>1</b>	<b>18489.13</b>	<b>36895.86</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	0.17	1	0.17	0.35	0.574509
Emulsion Ratio %	2.46	2	1.23	2.45	0.155716
Bioactive compound Code	<b>144.35</b>	<b>1</b>	<b>144.35</b>	<b>288.07</b>	<b>0.000001</b>
Error	3.51	7	0.50		

#### 48. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη ESI

Effect	Univariate Tests of Significance for ESI (Elenalycopene) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>114075.0</b>	<b>1</b>	<b>114075.0</b>	<b>5563.916</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	8.3	1	8.3	0.406	0.544057
Emulsion Ratio %	5.6	2	2.8	0.135	0.875529
Bioactive compound Code	23.1	1	23.1	1.129	0.323259
Error	143.5	7	20.5		

#### 47. Αποτελέσματα ANOVA για τη μέση διάμετρο των σταγονιδίων κατά την αποθήκευση

Effect	Univariate Tests of Significance for MDD (MDD-diatris) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>743996.2</b>	<b>1</b>	<b>743996.2</b>	<b>1775.499</b>	<b>0.000000</b>
emulsion code	<b>6249.3</b>	<b>1</b>	<b>6249.3</b>	<b>14.914</b>	<b>0.000319</b>
% emulsion code	<b>8833.4</b>	<b>2</b>	<b>4416.7</b>	<b>10.540</b>	<b>0.000147</b>
Bioactive compound code	<b>4349.3</b>	<b>1</b>	<b>4349.3</b>	<b>10.379</b>	<b>0.002222</b>
time code	216.8	4	54.2	0.129	0.971056
Error	21370.8	51	419.0		

### 3<sup>η</sup> Σειρά Πειραμάτων: εμπλουτισμένα με φαινολικά συστατικά νανογαλακτώματα

#### 50. Αποτελέσματα ANOVA για MDD

Effect	Univariate Tests of Significance for MDD (Elenaphenol Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	191095.9	1	191095.9	394.9922	0.000000
Emuls Code	1337.3	1	1337.3	2.7642	0.122274
Emulsion Ratio %	2831.7	2	1415.9	2.9266	0.092215
Phenolic compound Code	83.1	2	41.6	0.0859	0.918226
Error	5805.6	12	483.8		

#### 49. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη PDI

Effect	Univariate Tests of Significance for PDI (Elenaphenolic Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3.064463	1	3.064463	932.1350	0.000000
Emuls Code	0.073344	1	0.073344	22.3096	0.000494
Emulsion Ratio %	0.109870	2	0.054935	16.7099	0.000340
Phenolic compound Code	0.003707	2	0.001853	0.5638	0.583436
Error	0.039451	12	0.003288		

#### 52. Αποτελέσματα ANOVA για το ιξώδες

Effect	Univariate Tests of Significance for viscosity (Elenaphenol Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	137.8907	1	137.8907	3624.463	0.000000
Emuls Code	0.2544	1	0.2544	6.688	0.023832
Emulsion Ratio %	0.8450	2	0.4225	11.105	0.001863
Phenolic compound Code	0.0610	2	0.0305	0.801	0.471321
Error	0.4565	12	0.0380		

#### 51. Αποτελέσματα ANOVA για τη θολότητα

Effect	Univariate Tests of Significance for turbidity (Elenaphenol Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	25.51956	1	25.51956	69.72573	0.000002
Emuls Code	2.82625	1	2.82625	7.72202	0.016686
Emulsion Ratio %	3.57080	2	1.78540	4.87815	0.028156
Phenolic compound Code	0.06187	2	0.03094	0.08452	0.919493
Error	4.39199	12	0.36600		

#### 54. Αποτελέσματα ANOVA για το ζ-δυναμικό

Effect	Univariate Tests of Significance for z-potential (Elenaphenol Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3879.043	1	3879.043	1329.147	0.000000
Emuls Code	225.852	1	225.852	77.388	0.000001
Emulsion Ratio %	44.340	2	22.170	7.596	0.007385
Phenolic compound Code	35.346	2	17.673	6.056	0.015197
Error	35.021	12	2.918		

#### 53. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη διάθλασης

Effect	Univariate Tests of Significance for refractive index (Elenaphenol Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	32.36235	1	32.36235	31295972	0.000000
Emuls Code	0.00000	1	0.00000	0	0.734103
Emulsion Ratio %	0.00007	2	0.00003	33	0.000013
Phenolic compound Code	0.00000	2	0.00000	2	0.159514
Error	0.00001	12	0.00000		

### 56. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα L (χρώμα)

Univariate Tests of Significance for L (Elenaphenolic) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>25393.94</b>	<b>1</b>	<b>25393.94</b>	<b>6294.563</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.70	1	0.70	0.172	0.685307
Emulsion Ratio %	1.07	2	0.54	0.133	0.877064
Phenolic compound Code	<b>230.87</b>	<b>2</b>	<b>115.44</b>	<b>28.614</b>	<b>0.000027</b>
Error	48.41	12	4.03		

### 55. Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα a (χρώμα)

Univariate Tests of Significance for a (Elenaphenolic) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>5.951250</b>	<b>1</b>	<b>5.951250</b>	<b>171.9649</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.011084	1	0.011084	0.3203	0.581870
Emulsion Ratio %	0.045908	2	0.022954	0.6633	0.533066
Phenolic compound Code	<b>0.837325</b>	<b>2</b>	<b>0.418662</b>	<b>12.0975</b>	<b>0.001328</b>
Error	0.415288	12	0.034607		

### 58 Αποτελέσματα ANOVA για τον παράγοντα b (χρώμα)

Univariate Tests of Significance for b (Elenaphenolic) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>2.35445</b>	<b>1</b>	<b>2.35445</b>	<b>0.577132</b>	<b>0.462103</b>
Emuls Code	0.56416	1	0.56416	0.138289	0.716472
Emulsion Ratio %	<b>33.95706</b>	<b>2</b>	<b>16.97853</b>	<b>4.161844</b>	<b>0.042371</b>
Phenolic compound Code	26.16743	2	13.08372	3.207132	0.076588
Error	48.95482	12	4.07957		

### 57. Αποτελέσματα ANOVA για το χρώμα E

Univariate Tests of Significance for E (Elenaphenolic) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>25510.54</b>	<b>1</b>	<b>25510.54</b>	<b>5418.677</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	1.21	1	1.21	0.258	0.621010
Emulsion Ratio %	1.80	2	0.90	0.191	0.828473
Phenolic compound Code	<b>224.20</b>	<b>2</b>	<b>112.10</b>	<b>23.811</b>	<b>0.000066</b>
Error	56.49	12	4.71		

### 60. Αποτελέσματα ANOVA για το δείκτη ESI

Univariate Tests of Significance for ESI (Elenaphenolic) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>81859.57</b>	<b>1</b>	<b>81859.57</b>	<b>37889.29</b>	<b>0.000000</b>
% emulsion code	15.43	2	7.72	3.57	0.128863
phenolic compound code	8.02	2	4.01	1.86	0.268861
Error	8.64	4	2.16		

### 59. Αποτελέσματα ANOVA για MDD κατά την αποθήκευση των νονογαλακτωμάτων

Univariate Tests of Significance for MDD (Elenapheno) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>569553.8</b>	<b>1</b>	<b>569553.8</b>	<b>4960.625</b>	<b>0.000000</b>
% emulsion code	<b>8412.3</b>	<b>2</b>	<b>4206.1</b>	<b>36.634</b>	<b>0.000000</b>
phenolic compound code	<b>2473.2</b>	<b>2</b>	<b>1236.6</b>	<b>10.770</b>	<b>0.000216</b>
time	314.4	4	78.6	0.685	0.607332
Error	4133.3	36	114.8		

## Επιφανειακή τάση

### 61. Αποτελέσματα ANOVA για τα απλά νανογαλακτώματα

Effect	Univariate Tests of Significance for surface tension (E) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>14896.51</b>	<b>1</b>	<b>14896.51</b>	<b>19358.82</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	2.17	1	2.17	2.82	0.136787
Emulsion Ratio %	1.76	2	0.88	1.14	0.372354
Oil phase code	0.01	1	0.01	0.01	0.934715
Error	5.39	7	0.77		

### 62. Αποτελέσματα ANOVA για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με λυκοπένιο

Effect	Univariate Tests of Significance for surface tension (E) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>13076.78</b>	<b>1</b>	<b>13076.78</b>	<b>15000.40</b>	<b>0.000000</b>
Emulsifier Code	2.54	1	2.54	2.92	0.131350
Emulsion Ratio %	1.95	2	0.98	1.12	0.378817
Bioactive compound Code	<b>60.40</b>	<b>1</b>	<b>60.40</b>	<b>69.29</b>	<b>0.000071</b>
Error	6.10	7	0.87		

### 63. Αποτελέσματα ANOVA για τα εμπλουτισμένα νανογαλακτώματα με φαινολικά συστατικά

Effect	Univariate Tests of Significance for surface tension (E) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	<b>21514.78</b>	<b>1</b>	<b>21514.78</b>	<b>11777.98</b>	<b>0.000000</b>
Emuls Code	0.20	1	0.20	0.11	0.745198
Emulsion Ratio %	1.48	2	0.74	0.41	0.675719
Phenolic compound Code	6.29	2	3.15	1.72	0.219942
Error	21.92	12	1.83		