



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



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *SATUREJA THYMBRA* ΣΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΑΓΛΑΪΑ ΒΕΛΛΙΟΠΟΥΛΟΥ**

*ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ*

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ**

*Στην οικογένειά μου,*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας ήταν η κ. Β. Ωραιοπούλου.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ωραιοπούλου για την ανάθεση του θέματος, για τις συμβουλές και την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης ευχαριστίες οφείλω στην Υπ. Διδάκτορα Ε. Χουλιτούδη και στον Διδάκτορα Δ. Τσιμογιάννη για το αμέριστο ενδιαφέρον τους και την εξαιρετική συνεργασία μας. Η συμβολή τους ήταν ιδιαίτερα σημαντική στην περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Σημαίνουσα φυσικά ήταν και η βοήθεια όλου του προσωπικού του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων όσες φορές και αν την χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια της ακαδημαϊκής πορείας μου και με το ενδιαφέρον της με βοήθησε να υλοποιήσω τον στόχο μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενεργός συσκευασία σε chips πατάτας με αντιοξειδωτική ουσία το εκχυλίσμα του αποξηραμένου φυτού *Satureja Thymbra* (θρούμπι) που απαντάται ευρέως στην Ελλάδα. Τα chips πατάτας τηγανίστηκαν σε φοινικέλαιο, έλαιο απαλαγμένο από αντιοξειδωτικά και έτσι ερευνήθηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να περιορίσει τον ταγγισμό των chips.

Παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα του φυτού από το οποίο είχε παραληφθεί το αιθέριο έλαιο, με δύο διαδοχικές εκχυλίσεις, πρώτα με οξικό αιθυλεστέρα και έπειτα με αιθανόλη, για την παραλαβή των άπολων και πιο πολικών φαινολικών συστατικών, αντίστοιχα. Τα αντιοξειδωτικά κλάσματα συγκρίθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε στερεά συστατικά, ολικές φαινόλες, τις κύριες επιμέρους φαινολικές ουσίες καθώς και την αντιρριζική τους δράση. Το αιθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες με τιμή, εκφρασμένη σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE),  $233 \pm 4.6$  mg GAE/g ξηρού βάρους του φυτού σχεδόν την διπλάσια από αυτή του οξικού αιθυλεστέρα. Επίσης καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισε και στην αντιρριζική δράση με τιμή  $586 \pm 18$  mg trolox/g ξηρού εκχυλίσματος έχοντας μια τάξη μεγέθους παραπάνω από την αντίστοιχη τιμή του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα.

Ακολούθησε η ενσωμάτωση των εκχυλισμάτων στο υλικό της συσκευασίας σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και για τα δύο εκχυλίσματα, 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>. Τα chips συσκευάστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους 70 °C όπου παρέμειναν για 54 ημέρες. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν για την εκτίμηση της αλλοίωσης των chips ήταν ο αριθμός υπεροξειδίων του ελαίου που εκχυλίστηκε από τα chips για να καταγραφεί η πορεία των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης αλλά και η αέρια χρωματογραφία καθώς και οι τιμές π-ανισιδίνης για να εκτιμηθεί η συσσώρευση των δευτερογενών προϊόντων. Επιπλέον, παρακολουθήθηκε η περιεκτικότητα σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα στον υπερκείμενο χώρο της κάθε συσκευασίας. Διαπιστώθηκε πως η ενεργός συσκευασία ήταν αποτελεσματική για όλες τις συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος με βέλτιστη προστασία από την συγκέντρωση 300 mg GAE/m<sup>2</sup> που αύξησε τον χρόνο επώασης σχεδόν κατά

20 ημέρες και μείωσε τον ρυθμό παραγωγής υπεροξειδίων κατά 78.4 %. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα προστάτευσε και αυτό σε ικανοποιητικό βαθμό τα chips από τον ταγγισμό μόνο για τις συγκεντρώσεις 100 και 200 mg GAE/m<sup>2</sup> καθώς η συγκέντρωση 300 mg GAE/m<sup>2</sup> παρουσίασε προοξειδωτική δράση αυξάνοντας τον ρυθμό παραγωγής των υπεροξειδίων κατά 7.44% στο στάδιο επιταχυνόμενης οξείδωσης και μειώνοντας τον χρόνο επώασης σχεδόν κατά 10 ημέρες.

Επιπλέον για την μελέτη της διάχυσης των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων στα chips και την γενικότερη κατανάλωση τους γινόταν μέτρηση των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu στο ανακτημένο έλαιο των chips και στην συσκευασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρχε έντονη διάχυση προς τα chips κυρίως από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα που αποδίδεται στην άπολη φύση και των δύο. Στο τέλος του πειράματος το άθροισμα των ολικών φαινολικών συστατικών της συσκευασίας και των chips παρουσίασε πάνω από 50% κατανάλωση αυτών για όλα τα δείγματα.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ .....	3
1.1 Γενικά για τα λιπίδια .....	3
1.2 Τριγλυκερίδια-Λιπαρά οξέα .....	4
1.3. Φοινικέλαιο .....	6
1.4 Οξείδωση λιπιδίων .....	9
1.5 Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων .....	15
1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης λιπιδίων .....	18
2. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ .....	22
2.1 Γενικά-Ορισμός.....	22
2.2. Πρωτογενή αντιοξειδωτικά .....	22
2.3. Δευτερογενή αντιοξειδωτικά.....	24
2.4. Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	25
2.5. Φυσικά αντιοξειδωτικά .....	28
2.5.1. Τοκοφερόλες .....	28
2.5.2. Φλαβονοειδή.....	29
2.5.3. Φαινολικά οξέα .....	31
2.6 Αρωματικά φυτά ως πηγές αντιοξειδωτικών .....	33
2.6.1. Θρούμπι ( <i>Satureja Thymbra</i> ).....	35
3. ΕΝΕΡΓΟΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ.....	38
3.1 Γενικά-Ορισμός.....	38
3.2. Κατηγορίες ενεργών συσκευασιών .....	39
3.2.1 Δέσμευση οξυγόνου .....	39
3.2.2 Παγίδευση ή απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα.....	41
3.2.3 Απορρόφηση αιθυλενίου (Ethylene Absorbers).....	42
3.2.4. Απορρόφηση υγρασίας.....	42

3.2.5. Αντιοξειδωτικές συσκευασίες.....	43
3.2.6. Αντιμικροβιακές συσκευασίες.....	48
3.2.7. Απορρόφηση και απελευθέρωση γεύσεων και οσμών .....	50
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	52
4.1 Σχεδιασμός πειραμάτων .....	52
4.2. Πρώτες ύλες -Αντιδραστήρια.....	53
4.3. Συσκευές .....	54
4.4. Πειραματικές Τεχνικές .....	54
4.4.1. Εκχύλιση από το αρωματικό φυτό θρούμπι.....	54
4.4.2 Αντιριζική δραστηριότητα εκχυλισμάτων με μέθοδο DPPH .....	55
4.4.3 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος.....	55
4.4.4 Δοκιμή εκχυλισμάτων για την προστασία chips από την οξείδωση.....	56
4.4.5. Αναλυτικές μέθοδοι .....	58
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	63
5.1. Εκχυλίσματα από το φυτό θρούμπι ( <i>Satureja Thymbra</i> ) .....	63
5.1.1. Απόδοση εκχύλισης φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική δράση εκχυλισμάτων .....	63
5.1.2. Ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων.....	65
5.2. Μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων του φυτού <i>Satureja Thymbra</i> κατά την προσθήκη τους στην συσκευασία τηγανισμένων chips πατάτας .....	67
5.3 Μεταβολή της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στη συσκευασία και στα chips .....	81
5.4 Μεταβολή της συγκέντρωσης οξυγόνου στη συσκευασία.....	87
5.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	90
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	92
7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	94
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	99

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξείδωση είναι μια από τις σημαντικότερες αντιδράσεις που συμβαίνουν στα συστήματα των τροφίμων επηρεάζοντας πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των τροφίμων οδηγώντας σε ανεπιθύμητα προϊόντα. Τα λιπίδια των τροφίμων είναι συστατικά πολύ ευαίσθητα στην οξείδωση συνεπώς τέτοιου είδους αντιδράσεις αποτελούν έναν βασικό παράγοντα υποβάθμισης που μπορεί να συμβεί κατά την διάρκεια της παραγωγής, της αποθήκευσης, της διανομής και της επεξεργασίας του τελικού προϊόντος. Τα προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων είναι παντού παρόντα αν και υπάρχει μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα και στο είδος που παρουσιάζονται. Ακόμα και τα επίπεδα αυτών των ενώσεων να είναι χαμηλά συχνά υπονομεύεται η ποιότητα ορισμένων τροφίμων και μειώνεται ο χρόνος ζωής τους. Όλα τα τρόφιμα που περιέχουν λιπίδια, ακόμα και σε μικρές περιεκτικότητες (1%), είναι ευαίσθητα στην οξείδωση οδηγώντας στο ταγγισμό. Οι επιβλαβείς αλλαγές στα τρόφιμα οδηγούν όχι μόνο σε απώλεια γεύσης αλλά και στην υποβάθμιση του χρώματος, της θρεπτικής αξίας αυτών και την συσσώρευση ουσιών βλαβερών για την υγεία των καταναλωτών ικανών να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες (αθηροσκλήρωση, σακχαρώδη διαβήτη, αυτοάνοσα νοσήματα).

Ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους επιβράδυνσης της οξείδωσης στα τρόφιμα είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά που είναι εμπορικά διαθέσιμα για το σκοπό αυτό ποικίλουν και η εφαρμογή τους εξαρτάται τόσο από το τρόφιμο όσο και από τις επιθυμίες και απαιτήσεις της εκάστοτε βιομηχανίας. Η παγιωμένη χρήση συνθετικών αντιοξειδωτικών, όπως το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), η τεταρτοταγής βουτυλιωμένη υδροκινόνη (TBHQ) και οι εστέρες γαλλικού οξέος (π.χ. προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος, PG) τείνει να αντικαθίσταται από αντιοξειδωτικά φυσικής προέλευσης. Η αιτία για την τάση αυτή ήταν αφενός η τοξικότητα που διαπιστώθηκε από μελέτες πάνω στα συνθετικά αντιοξειδωτικά και αφετέρου η καλύτερη αποδοχή των καταναλωτών για τα φυσικά συστατικά. Σύμφωνα με μελέτες φυτά, σπόροι, ξηροί καρποί, φρούτα και λαχανικά αναδείχθηκαν ως αξιοσημείωτες πηγές αντιοξειδωτικών για την προσθήκη σε τρόφιμα. Έχει αποδειχθεί μάλιστα ότι η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται στα



φαινολικά συστατικά που περιέχουν και κυρίως σε τοκοφερόλες φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Προέκταση των εφαρμογών των αντιοξειδωτικών είναι και η τεχνολογία της ενεργού συσκευασίας, μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του τροφίμου και την εξασφάλιση της ποιότητας και της θρεπτικής αξίας του. Επιτρέπει την ενσωμάτωση συστατικών στο υλικό συσκευασίας του προϊόντος, ώστε να απελευθερώσουν ή να απορροφήσουν ουσίες από το συσκευασμένο τρόφιμο ή περιβάλλον του. Όλο και περισσότερες μελέτες έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται για τον εμπλουτισμό του υλικού συσκευασίας με φυσικά αντιοξειδωτικά, κυρίως για τα ευπαθέστερα τρόφιμα, όπως προϊόντα κρέατος. Η προσφυγή στα φυσικά αντιοξειδωτικά ως πρόσθετα των τροφίμων τείνει να αυξάνεται εκτός των άλλων και για τα δυνητικά οφέλη στην υγεία των ανθρώπων.

## 1. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ

### 1.1 Γενικά για τα λιπίδια

*Πίνακας 1.1 : Κατηγοριοποίηση συστατικών που δομούν τα λιπίδια*

Κύρια Συστατικά Λιπιδίων	Δευτερεύοντα Συστατικά Λιπιδίων
1. Λιπαρά οξέα (κορεσμένα ή ακόρεστα)	1. Αλκοόλες (κηροί)
2. Ακυλογλυκερόλες ή γλυκερίδια (μονο, δι-, τρι-γλυκερίδια)	2. Στερόλες : Α) Ελεύθερες στερόλες (χοληστερόλη, εργοστερόλη, στιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη, καμπεστερόλη, μπρασικαστερόλη), Β) 4-μεθυλο, 4,4-διμέθυλο στερόλες, Γ) Εστέρες στερολών, Δ) Στεροειδή (γλυκοζίτες στερολών)
3. Φωσφοακυλογλυκερόλες ή φωσφατίδια (φωσφογλυκερίδια, σφιγγομυελίνες)	3. Χρωστικές (καροτενοειδή, χλωροφύλλες, γκοσυπόλη)
	4. Υδρογονάνθρακες
	5. Γλυκοζίτες
	6. Βιταμίνες (Α ή ρετινόλη, D ή καλσιφερόλη, E ή α-τοκοφερόλη, Κ ή φυτομεναδιόνη)

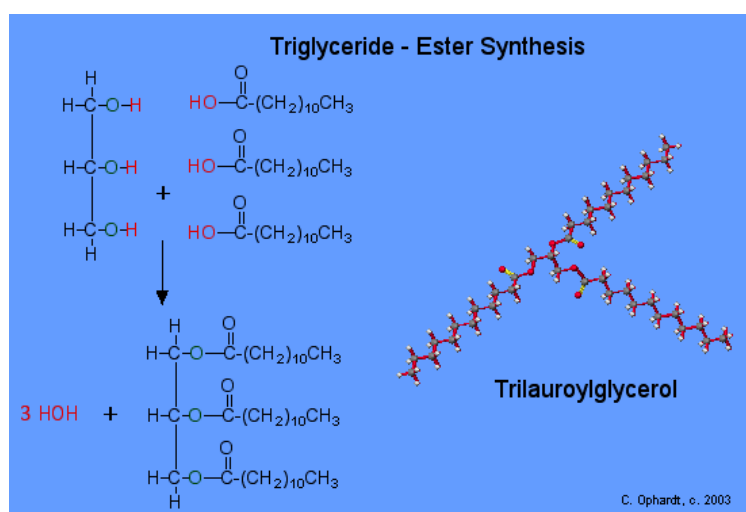
Με τον όρο λιπίδια ή λιποειδή περιγράφεται μια ευρεία κατηγορία ετερογενών ενώσεων διαλυτών σε οργανικούς διαλύτες (όπως σε διαιθυλεστέρα, πετρελαϊκό αιθέρα, χλωροφόρμιο, τετραχλωράνθρακα) και ελάχιστα διαλυτό σε H<sub>2</sub>O, που μαζί με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες αποτελούν τα κύρια συστατικά των ζωντανών οργανισμών. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες που απαρτίζονται από βασικές δομικές μονάδες, τα λιπίδια έχουν ετερογενή φύση και δύσκολα ταξινομούνται σε κατηγορίες. Μια γενική διάκριση μπορεί να γίνει με βάση τη συγκέντρωση ορισμένων συστατικών στα λιπίδια, τα οποία διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες (Gunstone, 1996). Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι δύο κατηγορίες.

## 1.2 Τριγλυκερίδια-Λιπαρά οξέα

Τα λίπη και τα έλαια αποτελούνται κυρίως από εστέρες της γλυκερίνης με τρία λιπαρά οξέα (τριγλυκερίδια), τα οποία μπορεί να είναι απλά ή μικτά, ανάλογα με το αν τα τρία μόρια των λιπαρών οξέων είναι όμοια ή διαφορετικά μεταξύ τους. Η δομή των τριγλυκεριδίων (Εικόνα 1.1) δίνεται από την ένωση των τριών υδροξυλομάδων της αλκοόλης της γλυκερίνης με τα λιπαρά οξέα. Στα φυσικά λιπαρά σώματα διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια, στα οποία μόνο δύο ή μία ομάδα υδροξυλίου της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με λιπαρά οξέα, βρίσκονται σε μικρή αναλογία (0.1-0.4). Με βάση την προέλευση τους διακρίνονται σε φυτικά έλαια (περιέχουν φυτοστερόλες) και σε ζωικά λίπη (περιέχουν ζωοστερόλες).

Η χημεία των λιπών και των ελαίων έχει άμεση σχέση με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των λιπαρών οξέων καθώς τα τελευταία αποτελούν το 94-96% του συνολικού βάρους του τριγλυκεριδίου. Πρόκειται για μονοβασικά καρβοξυλικά οξέα με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα από 2 ως 80 με συνηθέστερο αριθμό από 12 ως 22 άτομα άνθρακα που φέρουν την καρβοξυλομάδα στο άκρο της αλύσου. Τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα ή ακόρεστα (με έναν, δύο ή τρεις διπλούς δεσμούς). Ο άρτιος αριθμός των ατόμων άνθρακα έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται στη βιοσύνθεση από το μόριο του οξικού οξέος και έτσι σπάνια συναντώνται στη φύση λιπαρά οξέα με περιττό αριθμό ατόμων καθώς και με διακλαδισμένη ανθρακική αλυσίδα. Για την ονοματολογία των λιπαρών οξέων χρησιμοποιείται είτε η επίσημη

ονοματολογία κατά IUPAC, είτε εμπειρικές ονομασίες. Τα εμπειρικά ονόματα όμως δεν δίνουν πληροφορίες για τη δομή τους. Ως παράδειγμα αναφέρεται το ελαϊκό οξύ ή cis-9-δεκαοκτενοϊκό οξύ, δηλαδή καρβοξυλικό οξύ με 18 άτομα άνθρακα (C18) και με ένα διπλό δεσμό μεταξύ C9-C10 σε cis διαμόρφωση. Άλλος τρόπος ονομασίας των λιπαρών οξέων είναι με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα της αλυσίδας τους, συνοδευόμενο από αριθμούς που δηλώνουν το πλήθος ή και την θέση των διπλών δεσμών όπως π.χ. το λινολαϊκό οξύ 18:2, όπου το 18 αναφέρεται στον αριθμό των ατόμων άνθρακα στο μόριο του λιπαρού οξέος και το 2 στο πλήθος των διπλών δεσμών cis διαμόρφωσης. Ωστόσο λόγω των ισομερών ενώσεων που εμφανίζονται, προστίθενται επιπλέον αριθμοί ως εξής : 18:2 (9,12) ή 18:2 (9c, 12c) ή 18:2 (9Z,12Z), όπου τα 9 και 12 δηλώνουν τη θέση των διπλών δεσμών από το καρβοξυλικό άκρο της αλυσίδας και το c ή Z τη cis διαμόρφωση του δεσμού. Συνήθως η θέση του πρώτου διπλού δεσμού υποδεικνύεται με το πρόθεμα Δ, όταν η αρίθμηση ξεκινά από την καρβοξυλομάδα, π.χ. Δ9 18:2 ( ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται εννιά άτομα άνθρακα από το καρβοξυλικό άκρο του λιπαρού οξέος), ή το πρόθεμα ω ή n-, όταν η αρίθμηση ξεκινά από το μεθυλενικό άκρο του λιπαρού οξέος, 18:2 ω6 ή 18:2 n-6. Στους παραπάνω τύπους θεωρείται ότι οι διπλοί δεσμοί βρίσκονται εναλλάξ με μελενικές ομάδες και είναι cis διαμόρφωσης, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά.



**Εικόνα 1.1:** Εστεροποίηση γλυκερόλης με λιπαρά οξέα και τελική δομή τριγλυκεριδίου

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, μικρής ή μέσης ανθρακικής αλυσίδας (C4-C18) περιέχονται κυρίως στο λίπος του γάλακτος, καθώς και σε ορισμένα φυτικά έλαια. Το βουτυρικό οξύ (C4:0) περιέχεται σε ποσοστό 4% στο γάλα, ενώ διάφοροι φυτικοί σπόροι περιέχουν καπρυλικό (C8:0), καπρικό (C10:0), λαυρικό (C12:0) και μυριστικό οξύ (C14:0). Έλαια με υψηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι το καρυδέλαιο και το φοινικέλαιο. Το παλμιτικό οξύ (C16:0) απαντάται στα ιχθυέλαια, στο βαμβακέλαιο, στο λάρδι και στο γάλα. Το στεατικό οξύ (C18:0) απαντάται συχνά στα φυτικά λίπη. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μακριάς ανθρακικής αλυσίδας (>C18) απαντώνται στα έλαια ορισμένων φυτικών σπόρων. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με μακριά ανθρακική αλυσίδα (C20-C30) περιέχονται επίσης στους κηρούς. Τα φυτικά λίπη, σε αντίθεση με τα έλαια, περιέχουν υψηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Στα ακόρεστα λιπαρά οξέα το ελαϊκό, C18:1 (9), αποτελεί το πιο διαδεδομένο στα ω9 ακόρεστα λιπαρά οξέα. Περιέχεται σε μεγάλο ποσοστό στο ελαιόλαδο (60-80%), στο αμυγδαλέλαιο (60-70%), όπως επίσης και στα έλαια πολλών ξηρών καρπών, κάσιους, φιστίκια και καρύδια τύπου μακαντέμια (55-75%). Αντίστοιχα σημαντικό ω6 λιπαρό οξύ είναι το λινελαϊκό οξύ, C18:2 (9,12), που περιέχεται σε όλα τα φυτικά λιπαρά, όπως για παράδειγμα στο σογιέλαιο (45-60%), στο τροποποιημένο κραμβέλαιο (10-30%), στα έλαια από διάφορους ξηρούς καρπούς (15-45%), στο έλαιο από φλοιούς ρυζιού, στο βαμβακέλαιο και στο σησαμέλαιο. Αποτελεί απαραίτητο λιπαρό οξύ στη διατροφή των ανθρώπων, καθώς η έλλειψη του συνδέεται με καθυστέρηση της ανάπτυξης και προβλήματα στο δέρμα. Στην κατηγορία των ω3 λιπαρών οξέων αντιπροσωπευτικό είναι το λινολενικό οξύ, C18:3 (9,12,15) το οποίο βρίσκεται στο σογιέλαιο, αραβοσιτέλαιο και ηλιέλαιο σε μικρά όμως ποσοστά (Gunstone, 1996).

### 1.3. Φοινικέλαιο

Το φοινικέλαιο, χρησιμοποιείται ως τρόφιμο πάνω από 5000 χρόνια και παράγεται κατά κύριο λόγο στην Αφρική και τη Νοτιοανατολική Ασία, καθώς και σε περιοχές της Νότιας Αμερικής με πολύ χαμηλό κόστος παραγωγής και μεγάλη αποδοτικότητα καλλιεργειών. Το φοινικέλαιο παράγεται από τον πολτό των

φρούτων από 3 διαφορετικά είδη φοινίκων: *Elaeis guineensis*, *Cocos nucifera*, *Orbignya speciosa* τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3. Το λάδι αυτό είναι ένα στερεό λίπος σε εύκρατα κλίματα καθώς αποτελείται από 32-47% από κορεσμένα λιπαρά οξέα με το παλμιτικό οξύ ως το κυριότερο.

Το φοινικέλαιο είναι ένα από τα κυριότερα φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων όπως και το αραβοσιτέλαιο, βαμβακέλαιο, σογιέλαιο, και ηλιέλαιο. Τόσο το φοινικέλαιο όσο και τα προϊόντα του, κυρίως η φοινικολεΐνη, χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρασκευή τηγανισμένων προϊόντων. Οι παράγοντες που οδηγούν σε αυτή τη χρήση είναι η χαμηλή τιμή του, η μεγάλη διαθεσιμότητα, η υψηλή οξειδωτική και θερμική σταθερότητα καθώς και η ποιότητα και η αρεστή γεύση από τους καταναλωτές. Η υψηλή θερμική και οξειδωτική σταθερότητα είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τα τηγανιτά τρόφιμα καθώς απορροφούν σημαντική ποσότητα ελαίου κατά το τηγάνισμα αλλάζοντας έτσι την σύνθεση τους σε λιπαρά οξέα και κατ' επέκταση τις οξειδωτικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα τα τσιπς πατάτας από 0.1% λίπους φτάνουν το 40% μετά από τηγάνισμα. Επίσης το φοινικέλαιο προκαλεί μια λιπαρή, κηρώδη υφή στα τρόφιμα κυρίως όταν έχει κρύο καθώς έχει σημείο τήξης τους 38.7 °C. Το πιο δημοφιλές εμπορικό λάδι τηγανίσματος είναι το φοινικέλαιο που έχει προέλθει από κλασμάτωση. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι τα τριγλυκερίδια υψηλής τήξης να απομακρύνονται και οι ενώσεις χαμηλής τήξης να εμπλουτίζουν το λάδι. Κατ'αυτόν τον τρόπο παραλαμβάνεται λάδι με μεγάλο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων και μικρό ποσοστό κορεσμένων.

Σε πείραμα των C. Man and Jaswir 2000, μελετήθηκε η επίδραση προσθήκης δενδρολίβανου και φασκόμηλου (4%) σε φοινικέλαιο για τηγάνισμα πατατών στους 180 °C. Το πείραμα είχε διάρκεια 6 μέρες και ουσιαστικά περιλάμβανε 1 τηγάνισμα την ημέρα με το περισσευούμενο λάδι. Ύστερα από τις έξι μέρες η προσθήκη δενδρολίβανου μείωσε την ανάπτυξη υπεροξειδίων κατά 38.9% ενώ του φασκόμηλου κατά 39.5% δείχνοντας μία καλή παρεμπόδιση στην οξείδωση του ελαίου.

Οι Zeddelmann & Wurzinger 1977 πραγματοποίησαν πειράματα θέρμανσης χωρίς τηγάνισμα προκειμένου να συγκρίνουν το φοινικέλαιο με άλλα έλαια όπως σογιέλαιο, αραχιδέλαιο, υδρογονωμένο ιχθυέλαιο και έλαιο καρύδας. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι το φοινικέλαιο και το σκληρυμένο ιχθυέλαιο είχαν την μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα καθώς και τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε υψηλή θερμοκρασία σε σύγκριση με ζωικά λίπη ή εξαιρετικά ακόρεστα έλαια.

Μια επιπλέον έρευνα από τους Das & Pereira 1990 παρουσίασε την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών στην θερμική αυτοοξείδωση του φοινικέλαιου κατά σειρά μείωσης της δράσης : μορίνη > καμφερόλη > μυρισετίνη > κερκετίνη > απιγενίνη > χρυσίνη > λουτεολίνη > ναριγγενίνη.

**Πίνακας 1.3: Χαρακτηριστικά φοινικοπυρηνέλαιων (H.-D. Belitz et al. 2009)**

	Ελαιοφοίνικας ( <i>Elaeis guineensis</i> )	Κοκοφοίνικας ( <i>Cocos nucifera</i> )	Φοίνικας Μπαμπάσου ( <i>Orbignya speciosa</i> )
Περιεκτικότητα του πυρήνα σε λάδι (% κ.β)	40-52	63-70	67-69
Εύρος σημείου τήξης λίπους (°C)	23-30	20-28	22-26
Μέση σύσταση σε λιπαρά οξέα(% κ.β)			
8:0	6	8	4,5
10:0	4	6	7
12:0	47	47	45
14:0	16	18	16
16:0	8	9	7
18:0	2,5	2,5	4
18:1 (9)	14	7	14
18:2 (9,12)	2,5	2,5	2,5

#### 1.4 Οξείδωση λιπιδίων

Τα λιπαρά μπορεί να υποστούν ανεπιθύμητες μεταβολές τόσο ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και ως προς την θρεπτικότητα τους. Κύρια αιτία της υποβάθμισης αυτής είναι η οξείδωση των λιπαρών οξέων και κυρίως των πολυακόρεστων. Η οξείδωση τους αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τις βιομηχανίες τροφίμων, διότι έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανεπιθύμητων γεύσεων, οσμών και δυνητικά τοξικών προϊόντων (Lin, 2002). Επίσης οι αλλοιώσεις είναι ικανές να αποτελέσουν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (αθηροσκλήρωση, σακχαρώδη διαβήτη, καρκίνο, και αυτοάνοσα νοσήματα) (Saguy et al. 2001; Catala, 2012). Οι συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης των τροφίμων που περιέχουν λιπαρά έχουν τον κύριο ρόλο στην ποιοτική υποβάθμιση αυτή. Η οξειδωτική υποβάθμιση οφείλεται κυρίως στην αυθόρμητη αντίδραση οξείδωσης, γνωστή με τον όρο αυτοοξείδωση. Η αυτοοξείδωση προκαλείται από την αντίδραση των ακόρεστων λιπαρών οξέων με μοριακό οξυγόνο.

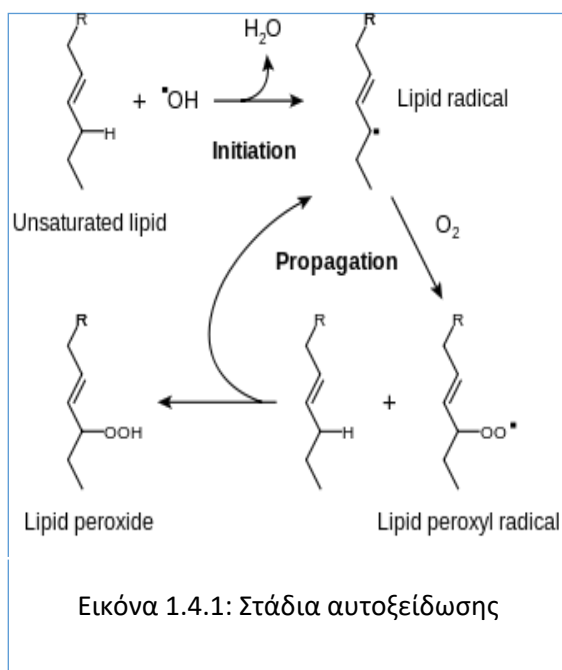
Η ύπαρξη περίσσειας οξυγόνου, φωτός, υγρασίας και ουσιών με καταλυτική προοξειδωτική δράση, επιταχύνει την αλλοίωση των τροφίμων με περιεκτικότητα σε λιπαρά. Η αυτοοξείδωση είναι αρκετά σύνθετη και περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό αλληλένδετων αντιδράσεων ενδιαμέσων προϊόντων. Ως εκ τούτου, προσομοιάζεται συνήθως μέσω της μελέτης ενός μοντελικού συστήματος στο οποίο, καταγράφονται οι μεταβολές ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος ή ενός από τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξείδωσης, παρουσία οξυγόνου σε ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες.

Τα αρχικά προϊόντα της οξείδωσης είναι ανιχνεύσιμα μόνο μετά από μία ορισμένη παρερχόμενη περίοδο αποθήκευσης. Αυτό γίνεται καθώς στην αρχή τα υποστρώματα αντιστέκονται στην οξείδωση. Όταν αυτή η επαγωγική περίοδος ή «περίοδος επώασης» που είναι χαρακτηριστική για μια δεδομένη διαδικασία αυτοοξείδωσης, παρέλθει, εμφανίζεται μία απότομη άνοδος στην ταχύτητα αντίδρασης. Ορισμένα τρόφιμα, περιέχουν ενώσεις με προοξειδωτική δράση σε υψηλή συγκέντρωση και έτσι η περίοδος επώασης σε αυτά τα τρόφιμα μπορεί να είναι σχεδόν ανύπαρκτη.



Μελέτες μοντελικών συστημάτων έχουν αποκαλύψει ότι τόσο η φάση επαγωγής όσο και η ταχύτητα αυτοξειδωσης επηρεάζονται από τη σύσταση του λιπαρού οξέος, αυξημένες αλλυλικές ομάδες συνεπάγεται βραχύτερη περίοδο επαγωγής και υψηλότερη ταχύτητα οξείδωσης, το βαθμό ακορεστότητας, την παρουσία και τη δραστηριότητα υπερ- και αντι- οξειδωτικών, τη μερική πίεση του οξυγόνου, τη φύση της επιφάνειας που εκτίθεται στο οξυγόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης. Όσον αφορά τον μηχανισμό που γίνεται η αντίδραση της οξείδωσης έχουν αναγνωριστεί τρεις μηχανισμοί οι οποίοι αποδίδουν διαφορετικά προϊόντα οξείδωσης:

1. Μηχανισμός ελευθέρων ριζών
2. Φωτο-οξείδωση
3. Οξείδωση με λιποξυγονάση



Η πορεία της αυτοξειδωσης με τον μηχανισμό ελευθέρων ριζών ακολουθεί τρεις σαφώς διευκρινισμένες μεταξύ τους φάσεις την έναρξη, διάδοση και τον τερματισμό (Frankel, 1984; Hamilton et al., 1997).

Στάδιο έναρξης: Κατά την έναρξη σχηματίζεται μια ρίζα υπεροξειδίου ( $RO_2\cdot$ ), αλκοξυλίου ( $RO\cdot$ ) ή αλκυλίου ( $R\cdot$ ) ενός λιπαρού οξέος από την δράση μιας ενεργής

ρίζας, που περιέχει συνήθως οξυγόνο και η οποία αποσπά ένα άτομο H, συνήθως από το μεθυλένιο μιας 1,4-πενταδιενικής ομάδας του λιπαρού οξέος. Η απόσπαση του H από το λιπαρό οξύ οφείλεται σε ελεύθερες ρίζες άγνωστης προέλευσης, ίχνη μετάλλων και θερμική ή φωτοχημική ομολυτική διάσπαση του δεσμού RH.

Στάδιο διάδοσης: Η ρίζα αυτή είναι ευαίσθητη στην αντίδραση της οξειδωσης, έτσι προσλαμβάνοντας οξυγόνο από τον ατμοσφαιρικό αέρα μετατρέπεται σε ρίζα υπεροξειδίου (αντίδραση 2), με σταθερά ρυθμού αντίδρασης ( $k_2=10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Η υπεροξειδική ρίζα ή και οι άλλες από το πρώτο στάδιο ( $\text{RO}^\cdot, \text{RO}_2^\cdot$ ), αντιδρά με ένα γειτονικό μόριο λιπαρού οξέος και σχηματίζεται πάλι μία ελεύθερη ρίζα ( $\text{R}^\cdot$ ) και ένα υδρουπεροξειδίο,  $\text{ROOH}$  (αντίδραση 3) με σταθερά ρυθμού αντίδρασης  $k_3=10^{60} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Λόγω της σταθερότητας των υπεροξειδικών ριζών και με βάση τις τιμές  $k_2, k_3$ , προκύπτει ότι το περιοριστικό στάδιο στην όλη διαδικασία δημιουργίας νέων ριζών είναι το στάδιο απόσπασης ενός ατόμου υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ (Belitz & Grosch, 1999).

Ο σχηματισμός μια ρίζας  $\text{RO}^\cdot$  είναι δυνατός και από τη διάσπαση ενός λιπαρού οξέος μέσω ενός μονομοριακού μηχανισμού αντίδρασης, ο οποίος επιταχύνεται παρουσία μετάλλων ή ενώσεων που περιέχουν σίδηρο (αντίδραση 5) (Belitz & Grosch, 1999). Η συγκέντρωση των υδροϋπεροξειδίων φτάνει σε ένα επίπεδο στο οποίο αρχίζει να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες μέσω ενός διμοριακού μηχανισμού αποικοδόμησης (αντίδραση 6). Ο μηχανισμός αυτός ωστόσο δεν έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς η οξείδωση των λιπαρών σε ένα τρόφιμο, το καθιστά δυσάρεστο στη γεύση και γενικότερα μη αποδεκτό, πολύ πριν η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων φτάσει το απαιτούμενο επίπεδο, ώστε να επιτευχθεί αυτή η αντίδραση. Οι αντιδράσεις 5 και 6 είναι παράπλευρες αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών.

Στάδιο τερματισμού: Στο στάδιο του τερματισμού η αλυσιδωτή αντίδραση τερματίζεται με την αντίδραση δύο υπεροξειδικών ριζών (αντίδραση 9) ενώ όταν το οξυγόνο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις λαμβάνουν χώρα και οι αντιδράσεις 7 και 8. Σε πολλά τρόφιμα οι αντιδράσεις τερματισμού της οξειδωσης δεν έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσο τα δύο προηγούμενα στάδια (έναρξη, διάδοση), καθώς το τρόφιμο έχει ήδη ταγγιστεί, δηλαδή έχει ήδη υποστεί σοβαρές

αλλοιώσεις προτού πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις τερματισμού (Chaiyasit, 2007).

### Στάδια Αυτοξειδωσης:

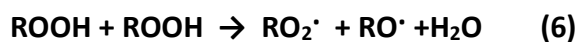
Στάδιο Έναρξης:



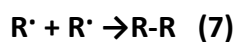
Στάδιο Διάδοσης:



Πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις :



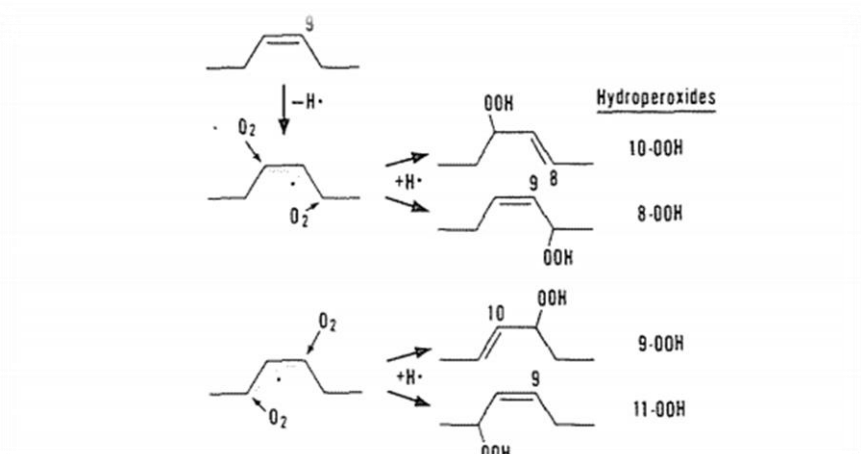
Στάδιο Τερματισμού:



Όπου  $R^{\cdot}$ : ρίζα λιπαρού οξέος,  $RO_2^{\cdot}$ : υπεροξειδική ρίζα,  $ROOH$ : υπεροξείδιο

### Αυτοξειδωση ελαϊκού οξέος

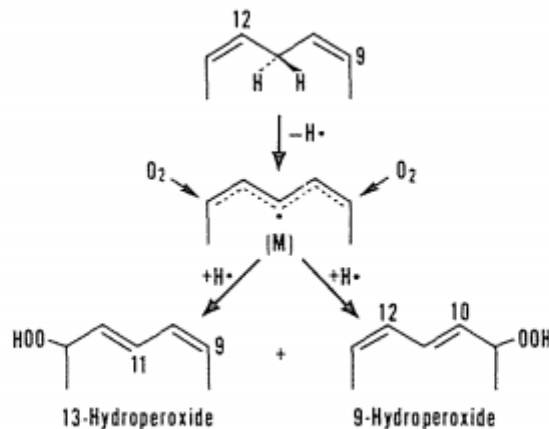
Στον μηχανισμό αυτοξειδωσης του ελαϊκού οξέος απομακρύνεται ένα άτομο υδρογόνου από τα αλλυλικά μεθυλένια στις θέσεις C-8 και C-11 του οξέος, παράγοντας δύο αλλυλικές ρίζες. Αυτές οι ρίζες αντιδρούν με το οξυγόνο στις τελικές θέσεις για την παραγωγή ισομερούς μείγματος 8-, 9-, 10-, 11- υδροπεροξειδίων. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό αυτά τα 4 ισομερή σχηματίζονται σε ίσα ποσά. Ωστόσο σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες που βασίστηκαν στην αέρια χρωματογραφία (GC) και την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έδειξαν ότι τα ισομερή 8- και 11- υδροϋπεροξειδία εμφανίζονται σταθερά σε ποσοστό 27% ενώ τα 9- και 10- υδροϋπεροξειδία σε 23% (Frankel,1977).



**Εικόνα 1.4.2: Μηχανισμός αυτοξειδωσης ελαϊκού οξέος**

### Αυτοξειδωση λινολεϊκού οξέος

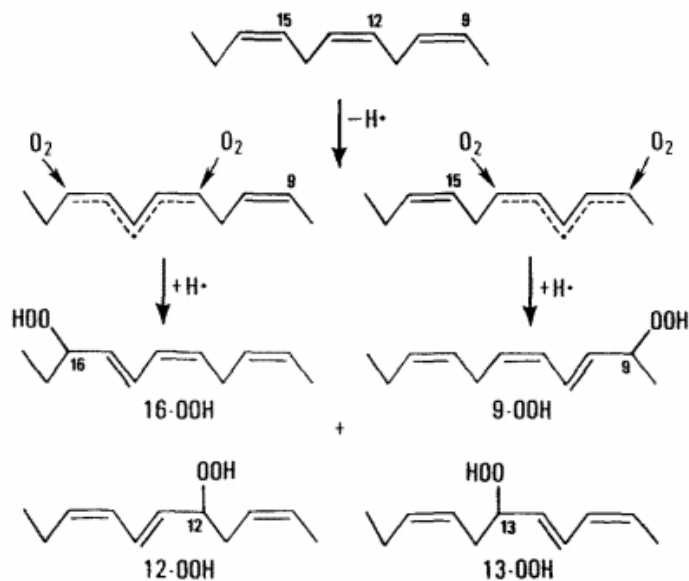
Ο μηχανισμός αυτοξειδωσης του λινολεϊκού οξέος προχωρά με την απόσπαση υδρογόνου από το διπλό αλλυλικό μεθυλένιο στη θέση C-11 για να παραχθεί μία ρίζα πενταδιενυλίου. Το οξυγόνο αντιδρά στις τελευταίες θέσεις δημιουργώντας ένα ίσο μείγμα συζευγμένων ισομέρων 9, και 13- υπεροξειδίων με διαμόρφωση cis και trans. Πειραματικά διαπιστώθηκε ότι ένα ποσοστό των συζευγμένων υπεροξειδίων αυξάνει με την θερμοκρασία της αυτοξειδωσης.



**Εικόνα 1.4.3 : Μηχανισμός αυτοξειδωσης λινολεϊκού οξέος**

#### Αυτοξειδωση λινολενικού οξέος

Στο λινολενικό οξύ το υδρογόνο αφαιρείται από το διπλό αλλυλικό μεθυλένιο στις θέσεις C-11 και C-14 παράγοντας 2 πενταδιενικές ρίζες. Το οξυγόνο προσβάλλει τις ρίζες στο τέλος της θέσης τους δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες οι οποίες με την πρόσληψη υδρογόνου δημιουργούν ένα μίγμα από 9-, 12-, 13-, 16- συζευγμένα ισομερή υδροϋπεροξειδία διενίου και τριενίου. Μετά από έρευνες με υγρή και αέρια χρωματογραφία τα εξωτερικά υδροϋπεροξειδία 9 και 16 βρίσκονται σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό απ' ότι τα εσωτερικά 12 και 13. Αυτή η άνιση κατανομή των ισομερών υδροϋπεροξειδίων φαίνεται να οφείλεται στην 1.3 κυκλοποίηση των εσωτερικών 12,13 υδροϋπεροξειδίων σε υδροϋπεροξυκυκλικό υπεροξειδίο (Frankel, 1977, Neff, W.E., 1981). Αυτή η κυκλοποίηση μπορεί να συνοδεύεται από μία άλλη κυκλοποίηση δικυκλοενδοϋπεροξειδίων (O'Connor, 1981).



**Εικόνα 1.4.4: Μηχανισμός αυτοξειδωσης λινολενικού οξέος**

## 1.5 Προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων

### Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης

Η υπεροξειδική ρίζα που σχηματίζεται είτε στο στάδιο της έναρξης είτε στο στάδιο της διάδοσης αντιδρά αργά και επομένως αφαιρεί εκλεκτικά το πιο αδύναμο συνδεδεμένο άτομο-Η από ένα μόριο λιπαρού οξέος. Η Εικόνα 1.5.1 απεικονίζει τις ενεργειακές εισροές που απαιτούνται για την αφαίρεση ατόμου Η από τμήματα ή ομάδες της ανθρακικής αλυσίδας που βρίσκονται στα λιπαρά οξέα. Η υπεροξειδική ρίζα αφαιρεί υδρογόνο ευκολότερα από μία ομάδα μεθυλενίου ενός 1,4-πενταδιενικού συστήματος απ' ό,τι από μία μεμονωμένη αλλυλική ομάδα. Στην προηγούμενη θεώρηση, η 1,4 διενική ρίζα που παράγεται, σταθεροποιείται αποτελεσματικότερα με συντονισμό, δηλαδή μετατόπιση ηλεκτρονίου σε πάνω από 5 C-άτομα. Τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) από την αυτοξειδωση του ελαϊκού, λιγνελικού και λινολενικού οξέος έχουν προσδιοριστεί πλήρως. Η αντίδραση με το  $O_2$  οδηγεί στο σχηματισμό συζυγών υδροϋπεροξειδίων από την αντίδραση του με την ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος.

	$D_{R-H}$ (kJ/mole)
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_2- \end{array}$	422
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}- \end{array}$	410
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}- \end{array}$	322
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}- \end{array}$	272

**Εικόνα 1.5.1: Ενεργειακές απαιτήσεις για την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου**

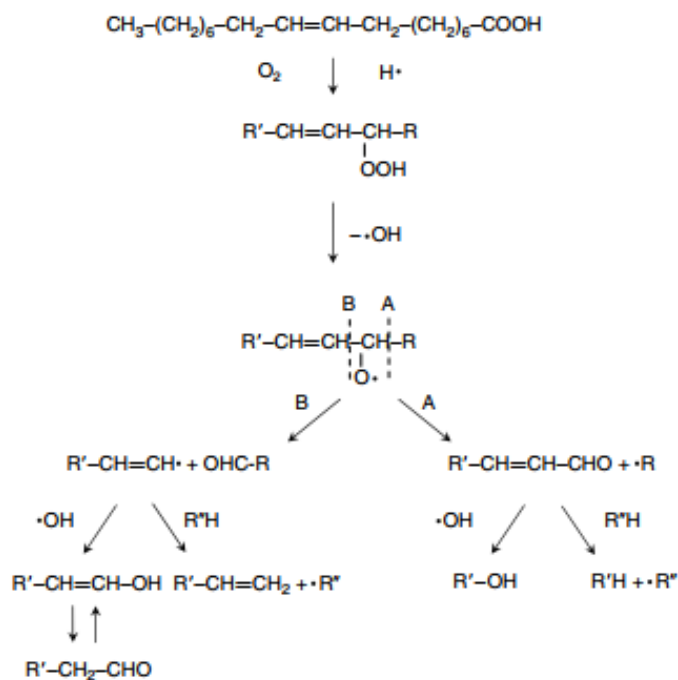
#### Δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης

Τα υδροϋπεροξειδία που αναπτύσσονται κατά την αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι σχετικά σταθερές ενώσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο παρουσία ιόντων μετάλλων ή υψηλής θερμοκρασίας, διασπώντας σε αλκοξυλικές ρίζες ( $\text{RO}\cdot$ ) οι οποίες αντιδρούν περαιτέρω προς το σχηματισμό των δευτερογενών προϊόντων οξειδωσης. Πρόκειται για πτητικές ενώσεις, όπως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, υδρογονάνθρακες (Frankel, 1984). Τα πρωτογενή προϊόντα οξειδωσης είναι άοσμα και άγευστα, οπότε η ποιότητα των τροφίμων δεν επηρεάζεται από αυτά. Η οξειδωση των τροφίμων γίνεται αντιληπτή όταν σχηματιστούν τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης και κυρίως τα πτητικά προϊόντα, ορισμένα από τα οποία παρουσιάζουν δυσάρεστη οσμή και γεύση ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Μάλιστα είναι υπεύθυνα για πολλές ασθένειες όπως καρκίνο, αθηροσκλήρωση, καρδιακές παθήσεις και αλλεργικές αντιδράσεις (Simic & Karel, 1980).

Η διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων ξεκινά σχεδόν από τη στιγμή που αυτά σχηματίζονται. Στα πρώτα στάδια της αυτοοξειδωσης, ο ρυθμός σχηματισμού τους υπερβαίνει το ρυθμό διάσπασης τους, γεγονός που αντιστρέφεται στα επόμενα στάδια της οξειδωσης. Ωστόσο ο χρόνος που αρχίζουν να σχηματίζονται τα δευτερογενή προϊόντα οξειδωσης ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών ελαίων. Έτσι

μπορεί να σχηματίζονται άμεσα από τη στιγμή που δημιουργούνται τα υδροϋπεροξειδία στο ελαιόλαδο και την ελαιοκράμβη, ενώ στο ηλιέλαιο, ο σχηματισμός τους ξεκινά από τη στιγμή που ο αριθμός των υδροϋπεροξειδίων έχει φτάσει σε μια ικανοποιητική συγκέντρωση (Guillen & Cabo, 2002).

Η αποσύνθεση των υδροϋπεροξειδίων παρουσιάζεται στο σχήμα 4. Οι Hiatt et al., 1968 ανέφεραν ότι η ενέργεια ενεργοποίησης για την διάσπαση του δεσμού μεταξύ των δύο οξυγόνων του υδροϋπεροξειδίου είναι 44 kcal/mol ενώ για τον δεσμό οξυγόνου υδρογόνου 90 kcal/mol. Επομένως τα υδροϋπεροξειδία διασπώνται ομολυτικά στο δεσμό μεταξύ των ατόμων οξυγόνου, οπότε παράγονται μια αλκοξυ- (RO $\cdot$ ) και μία υδροξυ-ρίζα (HO $\cdot$ ). Στην συνέχεια η αλκοξυομάδα διασπάται με ομολυτική β-σχάση με δύο μηχανισμούς A και B. Στη B περίπτωση η σχάση γίνεται μεταξύ του άνθρακα-άνθρακα από την πλευρά του ατόμου άνθρακα με το οξυγόνο παράγοντας καρβονυλικές ενώσεις και ρίζες αλκυλίου ή αλκυλενίου οι οποίες αντιδρώντας με ρίζα υδροξειλίου παράγουν αλκοόλη. Αντίστοιχα στην A περίπτωση η σχάση γίνεται μεταξύ του διπλού δεσμού των ατόμων άνθρακα και παράγεται μία ρίζα ολεφίνης και μία αλκυλοένωση. Η ρίζα ολεφίνης διασπάται σε 1-ενόλη.



**Εικόνα 1.5.2: Μηχανισμός αποσύνθεσης υδροϋπεροξειδίων για το σχηματισμό πτητικών ενώσεων (Frankel 2005)**



**Πίνακας 1.5: Δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης του ελαϊκού, λινολεϊκού και λινολενικού οξέος (Choe, 2006).**

	<b>Ελαϊκό οξύ</b>	<b>Λινολεϊκό οξύ</b>	<b>Λινολενικό οξύ</b>
<b>Αλδεΐδες</b>	Οκτανάλη	Πεντανάλη	Προπανάλη
	Εννεανάλη	Εξανάλη	Βουτανάλη
	2-Δεκανάλη	2-Οκτανάλη	2-Βουτενάλη
	Δεκανάλη	2-Εννεανάλη	2-Πεντανάλη
		2,4-Δεκανάλη	2-Εξανάλη
			3,6-Εννεανεδιάλη
			Δεκατριενάλη
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>	Επτανοϊκό μεθύλιο	Επτανοϊκό μεθύλιο	Επτανοϊκό μεθύλιο
	Οκτανοϊκό μεθύλιο	Οκτανοϊκό μεθύλιο	Οκτανοϊκό μεθύλιο
	8-οξοοκτανοϊκό μεθύλιο	8-οξοοκτανοϊκό μεθύλιο	8-οξοοκτανοϊκό μεθύλιο
	9-όξοεννεανοϊκό μεθύλιο	9-όξοεννεανοϊκό μεθύλιο	9-όξοεννεανοϊκό μεθύλιο
	10-όξοδεκανοϊκό μεθύλιο	10-όξοδεκανοϊκό μεθύλιο	10-όξοδεκανοϊκό μεθύλιο
	10-οξο-8-δεκανοϊκό μεθύλιο		
<b>Αλκοόλες</b>	1-επτανόλη	1-πεντανόλη	
		1-οκταν-3-όλη	
<b>Υδρογονάνθρακες</b>	Επτάνιο	Πεντάνιο	Αιθάνιο
	Οκτάνιο		Πεντάνιο

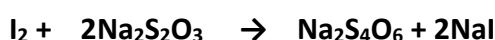
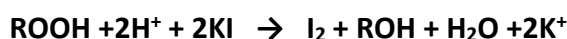
#### 1.6. Μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης λιπιδίων

Προκειμένου να παρακολουθείται η εξέλιξη της αυτοοξείδωσης των τροφίμων έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των προϊόντων της τόσο των πρωτογενών όσο και των δευτερογενών έτσι ώστε να προβλέπεται η αναμενόμενη διατηρησιμότητα.

### Αριθμός υπεροξειδίων (PV)

Στην οξείδωση λιπών και ελαίων ο αρχικός ρυθμός σχηματισμού των υπεροξειδίων υπερβαίνει το ρυθμό αποσύνθεσης τους. Αυτό όμως αντιστρέφεται σε μεταγενέστερα στάδια. Επομένως η παρακολούθηση του αριθμού των υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου αποδεικνύει αν ένα λιπίδιο είναι σε αρχικό στάδιο οξείδωσης ή όχι. Μάλιστα μελετώντας την φάση επαγωγής μπορεί να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της προσθήκης αντιοξειδωτικού στη σταθερότητα του λιπιδίου.

Η πιο κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων είναι η ιωδιομετρική. Βασίζεται στην αναγωγή της υδροϋπεροξειδικής ομάδας με ιόν ιωδίου ( $I^-$ ). Η ποσότητα του απελευθερωμένου  $I_2$  είναι ανάλογη της υπάρχουσας συγκέντρωσης υπεροξειδίου. Το απελευθερωμένο  $I_2$  προσδιορίζεται με τιτλοδότηση έναντι με πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου ( $Na_2S_2O_3$ ). Οι χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται είναι :



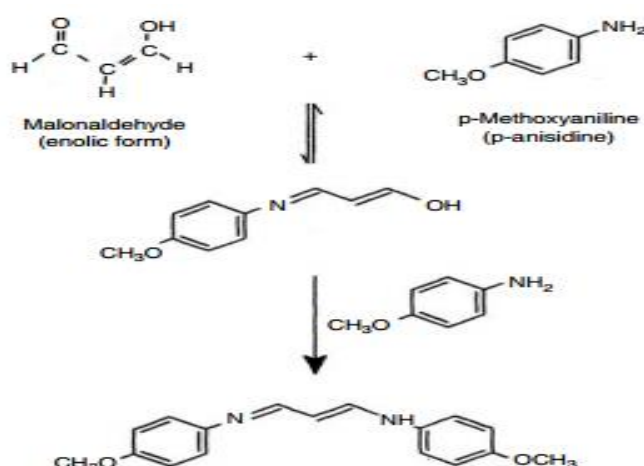
Τα δυνητικά μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η απορρόφηση του ιωδίου από θέσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων και η απελευθέρωση ιωδίου από το ιωδιούχο κάλιο παρουσία του οξυγόνου που υπάρχει στο διάλυμα που πρόκειται να τιτλοδοτηθεί (Gray, 1978).

Τα αποτελέσματα μπορεί επίσης να επηρεαστούν από τη δομή και την αντιδραστικότητα των υπεροξειδίων, καθώς και από τη θερμοκρασία και τον χρόνο αντίδρασης. Η ιωδιομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του PV εφαρμόζεται σε όλα τα λίπη και έλαια, αλλά είναι εξαιρετικά εμπειρική και οποιαδήποτε μεταβολή στη διαδικασία μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Αυτή η μέθοδος επίσης έχει μικρή ακρίβεια σε χαμηλές τιμές PV λόγω δυσκολιών που συναντώνται στον προσδιορισμό του τελικού σημείου τιτλοδότησης.

### Ανισιδίνη (p-Anisidine Value)

Η τιμή π-ανισιδίνης (p-AV) ορίζεται ως 100 φορές η οπτική πυκνότητα που μετράται στα 350 nm σε κυψελίδα 1,0 cm ενός διαλύματος που περιέχει 1,0 g

ελαίου σε 100 mL ενός μίγματος διαλύτη και αντιδραστηρίου, σύμφωνα με τη IUPAC Μέθοδο C. (Paquot et al. 1987). Αυτή η μέθοδος καθορίζει την ποσότητα αλδεΐδων σε ένα έλαιο και συγκεκριμένα εκείνες που είναι ακόρεστες (κυρίως 2-αλκενάλες). Οι αλδεΐδες σε ένα έλαιο αντιδρούν με το αντιδραστήριο *p*-ανισιδίνης υπό όξινες συνθήκες. Οι List et al., 1978 ανέφεραν μια εξαιρετικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών *p*-AV και της αποδοχής της γεύσης από έλαια σαλάτας από σόγια.



**Εικόνα 1.6.1 : Πιθανές αντιδράσεις μεταξύ της *p*-ανισιδίνης και της μηλονικής αλδεΐδης**

### Δείκτης TOTOX

Η τιμή *p*-AV χρησιμοποιείται συχνά στη βιομηχανία σε συνδυασμό με το PV για να υπολογίσει την αποκαλούμενη τιμή ολικής οξείδωσης ή TOTOX που δίνεται από την παρακάτω σχέση :

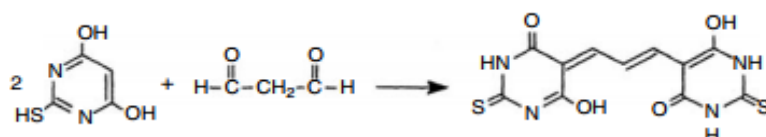
$$\text{TOTOX} = p\text{-AV} + 2\text{PV}$$

Η τιμή TOTOX θεωρείται συχνά ότι έχει το πλεονέκτημα ότι συνδυάζει τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης (όπως το PV) με τα δευτερογενή (όπως αντικατοπτρίζεται στο *p*-AV) παρέχοντας τελικά μία συλλογική εικόνα της πορείας της οξείδωσης.

### Άλλες μέθοδοι

Υπάρχουν πολλές ακόμα μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παρακολούθηση της οξείδωσης των λιπιδίων. Τα πτητικά δευτερογενή προϊόντα,

π.χ. αλδεΐδες, κετόνες, μπορούν να προσδιοριστούν αρκετά εύκολα με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η οποία συχνά συνδυάζεται με φασματοόμετρο μάζας (Mass Spectrometer, MS). Το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει ο αναλυτής είναι η επιλογή και βελτιστοποίηση της τεχνικής ανάκτησης των πτητικών ενώσεων από την οξειδωμένη λιπαρή ύλη. Μερικές ήδη διαθέσιμες τεχνικές είναι η ταυτόχρονη απόσταξη και εκχύλιση (Simultaneous Distillation and Extraction, SDE), η στατική απελευθέρωση της υπερκείμενης φάσης (Static Headspace, SH), η δυναμική απελευθέρωση της υπερκείμενης φάσης (Dynamic Headspace, DH), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME) και η ροφητική εκχύλιση υπό ανάδευση (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), (Steele, 2004). Επίσης, εκτός του αριθμού π-ανισιδίνης, χρησιμοποιούνται και άλλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των καρβονυλικών ενώσεων, με την πιο δημοφιλή να περιλαμβάνει την αντίδραση με το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Συγκεκριμένα, δύο μόρια του 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος αντιδρούν με ένα μόριο μηλονικής αλδεΐδης (Εικόνα 1.6.2). Η μηλονική αλδεΐδη αποτελεί ένα σημαντικό δευτερογενές προϊόν της οξείδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν τουλάχιστον τρεις διπλούς δεσμούς, όπως το λινολενικό οξύ. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 532 nm και προσδιορίζεται η πορεία της οξείδωσης (Kolakowska, 2003, Frankel, 1991). Ωστόσο, έχει πλέον διαπιστωθεί ότι το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), εκτός της μηλονικής αλδεΐδης, αντιδρά και με άλλα δευτερογενή κυρίως προϊόντα, στα οποία δίνεται η ονομασία TBARS (Steele, 2004). Λόγω της μη επιλεκτικότητας της μεθόδου, τα αποτελέσματά της απεικονίζουν την οξείδωση του τροφίμου σε καλύτερο βαθμό από άλλες μεθόδους, και κυρίως έχουν μεγάλη συσχέτιση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον οργανοληπτικό έλεγχο του τροφίμου (Kolakowska, 2003).



**Εικόνα 1.6.2: Αντίδραση μηλονικής αλδεΐδης με θειοβαρβιτουρικό οξύ**

## 2. ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 2.1 Γενικά-Ορισμός

Για να προστατευτούν τα τρόφιμα από την οξείδωση είναι απαραίτητο να ελαχιστοποιείται η έκθεσή τους στον αέρα, στο φως και στις υψηλές θερμοκρασίες κατά την παρασκευή και αποθήκευσή τους. Σημαντικό ρόλο στην προφύλαξη των τροφίμων από την οξείδωση διαδραματίζει και η χρήση των αντιοξειδωτικών. Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιαδήποτε ουσία, η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με εκείνες του οξειδωμένου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση του εν λόγω υποστρώματος (Antolovich et al., 2001; Shahidi, 1997).

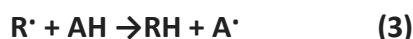
Τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στα συστήματα τροφίμων πρέπει να είναι φθηνά, μη τοξικά, αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σταθερά και ικανά να αντέξουν στις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης των τροφίμων. Το χρώμα, η γεύση και η οσμή, επίσης, πρέπει να είναι ελάχιστα. Ανάλογα με το μηχανισμό της δράσης τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα πρωτογενή (primary or chain-breaking) και τα δευτερογενή (secondary or preventive). Επίσης, υπάρχει και μία άλλη ταξινόμηση, η οποία κατηγοριοποιεί τα αντιοξειδωτικά σε φυσικά και συνθετικά (Gunstone, 1996).

### 2.2. Πρωτογενή αντιοξειδωτικά

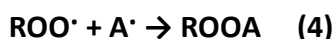
Τα υδροϋπεροξειδία που παράγονται κατά την αυτοοξείδωση είναι ασταθή και μπορούν να αποικοδομηθούν για να παράγουν ρίζες που επιταχύνουν περαιτέρω το στάδιο της διάδοσης. Η αποικοδόμηση του υδροϋπεροξειδίου επίσης οδηγεί στις ανεπιθύμητες οσμές και τις γεύσεις που σχετίζονται με την τάγγιση σε μεταγενέστερα στάδια οξείδωσης.

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά αντιδρούν με ρίζες αλκυλίου και υπεροξειδίου και τις μετατρέπουν σε πιο σταθερά, μη ριζικά προϊόντα. Συγκεκριμένα δίνουν άτομα υδρογόνου στις ρίζες των λιπιδίων και σχηματίζουν παράγωγα λιπιδίων και αντιοξειδωτικές ρίζες (A·) οι οποίες είναι πιο σταθερές και λιγότερο άμεσα διαθέσιμες στην περαιτέρω αυτοοξείδωση. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά έχουν υψηλότερες συγγένειες με τις υπεροξειδικές ρίζες από ότι των λιπιδίων. Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διάδοσης και των

παράπλευρων αντιδράσεων δεσμεύονται από τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά (Εξισώσεις 1,2). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν απευθείας με ρίζες λιπιδίων (Εξίσωση 3)



Η αντιοξειδωτική ρίζα που παράγεται έχει χαμηλή αντιδραστικότητα με το οξυγόνο ή με τα λιπαρά οξέα και ο ρυθμός διάδοσης της οξείδωσης μειώνεται κατά πολύ. Οι αντιοξειδωτικές ρίζες συμμετέχουν επίσης σε αντιδράσεις τερματισμού με ρίζες υπεροξειδίου, αλκαλικές και αντιοξειδωτικές (εξισώσεις 4,5,6).



Πριν από την έναρξη της αυτοοξείδωσης, πρέπει να υπάρχει περίοδος επαγωγής στην οποία τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται και δημιουργούνται οι ελεύθερες ρίζες. Ως εκ τούτου τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά αν προστίθενται κατά την διάρκεια της επαγωγής και της έναρξης. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα λίπη που περιέχουν ήδη σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίων οδηγούν γρήγορα σε απώλεια αντιοξειδωτικής δράσης (Buck, 1991).

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι μονο- ή πολυ-φαινόλες με ποικίλες υποκαταστάσεις στους δακτυλίους. Η υποκατάσταση με ομάδες στις θέσεις όρθο και πάρα που δίνουν ηλεκτρόνια στην ομάδα υδροξυλίου της φαινόλης αυξάνει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα της ένωσης. Επιπλέον υποκαταστάσεις διακλαδισμένων αλκυλομάδων σε ορθο- θέσεις ενισχύουν την ικανότητα του φαινολικού αντιοξειδωτικού να σχηματίζει δομές σταθερού συντονισμού και να μειώνει περαιτέρω την αντιοξειδωτική ριζική ικανότητα. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτογενή αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα είναι συνθετικές ενώσεις. Παραδείγματα τέτοιων αντιοξειδωτικών περιλαμβάνουν βουτυλιωμένη

υδροξυανισόλη (BHA), βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), γαλλικό προπυλεστέρα (PG) και τριτοταγή βουτυλδροκινόνη (TBHQ). Ωστόσο, μερικά φυσικά συστατικά των τροφίμων λειτουργούν επίσης ως πρωταρχικά αντιοξειδωτικά και προστίθενται συνήθως στα τρόφιμα. Οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυσικά πρωτογενή αντιοξειδωτικά (W.L. Porter, 1980).

### 2.3. Δευτερογενή αντιοξειδωτικά

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά δρουν με πολλούς μηχανισμούς για την μείωση του ρυθμού της αυτοοξειδωσης χωρίς να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε σταθερά προϊόντα όπως τα πρωτογενή. Ορισμένοι από τους μηχανισμούς είναι η δέσμευση ιόντων μετάλλων, η δέσμευση οξυγόνου και η καθυστέρηση του ρυθμού έναρξης των αλυσιδωτών αντιδράσεων μετατρέποντας τα υδροϋπεροξειδία σε σταθερά προϊόντα που δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Shahidi et al., 1992, Antolovich et al., 2001). Παραδείγματα δευτερογενών αντιοξειδωτικών συνιστούν το θειοδιπροπιονικό οξύ (thiodipropionate acid) και το διλαυρυλικό θειοδιπροπιονικό οξύ (dilauryl thiodipropionate acid) (Shahidi et al., 1992). Το θείο, οι θειόλες, τα σουλφίδια και τα δισουλφίδια αποτελούν ενεργούς παρεμποδιστές της οξειδωσης και ανήκουν στην κατηγορία των δευτερογενών αντιοξειδωτικών. Επίσης, το σελήνιο και οι ενώσεις του διασπούν τα υδροϋπεροξειδία σε σταθερά τελικά προϊόντα και έτσι δεν συμμετέχουν στις αντιδράσεις που ακολουθούν προς την παραγωγή πτητικών ενώσεων. Τα φωσφολιπίδια αποτελούν δευτερογενή αντιοξειδωτικά και προστατεύουν τα εδώδιμα έλαια από την οξειδωση διασπώντας τα υδροϋπεροξειδία αλλά και συμμετέχοντας σε διεργασίες σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με ίχνη μετάλλων. Εκτός από τα φωσφολιπίδια, πολλοί ακόμα χηλικοί παράγοντες μετάλλων υπάρχουν στα τρόφιμα, όπως το φωσφορικό, κιτρικό, τρυγικό και ασκορβικό οξύ.

Τα ένζυμα έχουν αξιολογηθεί ως νέα είδη αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα. Για παράδειγμα, η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD) καταλύει την αποσύνθεση του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), ενώ το ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σεληνίου (Seleno enzyme Glutathione peroxidase, GSH) καταλύει

την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων παράγοντας γλουταθειόνη (Pokorny et al., 2001).

#### 2.4. Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά προστίθενται σκόπιμα σε τρόφιμα για να αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων. Συνθετικά αντιοξειδωτικά που έχουν εγκριθεί για χρήση σε τρόφιμα είναι: το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT-Butylated hydroxytoluene), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA-Butylated hydroxyanisole), τεταρτοταγής βουτυλιωμένη υδροκινόνη (TBHQ-tert Butylhydroquinone) και οι εστέρες του γαλλικού οξέος (π.χ. προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος, PG-propyl gallate) (Antolovich et al., 2001, Pokorny et al., 2001). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά ανήκουν στην κατηγορία των πρωτογενών αντιοξειδωτικών (Gunstone, 1996).

Η χρήση των συνθετικών αντιοξειδωτικών ρυθμίζεται από τις κυβερνήσεις των χωρών, μέσω νομοθεσιών για τη χρήση των πρόσθετων στα τρόφιμα. Οι κανονισμοί για τα επιτρεπόμενα όρια των αντιοξειδωτικών διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Το TBHQ ενώ χρησιμοποιείται στις Η.Π.Α., στις ευρωπαϊκές χώρες σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2015/647 επιτρέπεται μόνο σε αφυδατωμένο κρέας.

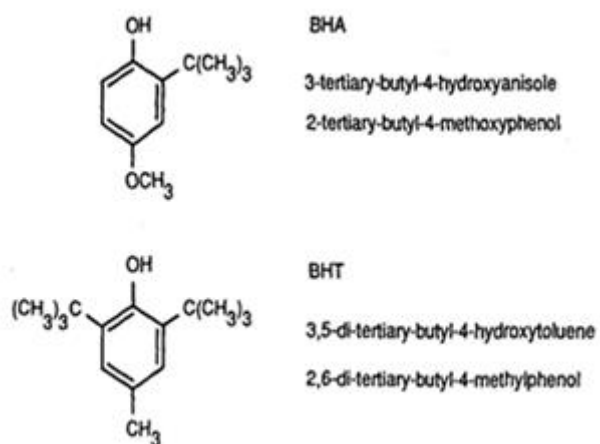
Τα BHA και BHT είναι εξαιρετικά διαλυτά σε λίπη και αδιάλυτα στο νερό. Είναι αρκετά σταθερά σε υψηλή θερμοκρασία και για αυτό συχνά χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση των λιπών σε ψημένα και τηγανισμένα προϊόντα (Pokorny et al., 2001; Gunstone, 1996). Οι δομές τους απεικονίζονται στην Εικόνα 2.4.1. Τα BHA και BHT είναι σημαντικά πρόσθετα σε υλικά που χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία των τροφίμων, καθώς είναι ικανά να μεταναστεύουν στο τρόφιμο (Shahidi et al., 1992). Συνεργιστικά τα δύο αντιοξειδωτικά παρέχουν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Το BHA είναι συνεργιστικό και με το PG (Pokorny et al., 2001; Gunstone, 1996). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι συνεργιστικές, ανταγωνιστικές ή προσθετικές. Ως συνέργεια ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο η αντιοξειδωτική δράση της συνδυασμένης χρήσης δύο ή περισσότερων αντιοξειδωτικών είναι υψηλότερη σε σχέση με το αποτέλεσμα του αθροίσματος των μεμονωμένων αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Αντίθετα, στον ανταγωνισμό η



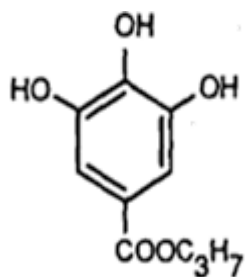
αντιοξειδωτική δράση περισσότερων του ενός αντιοξειδωτικού είναι μικρότερη από εκείνη που παρέχει το άθροισμα των επιμέρους αντιοξειδωτικών, ενώ στις προσθετικές αλληλεπιδράσεις το αποτέλεσμα είναι του ίδιου βαθμού (Choe & Min, 2009). Το BHT είναι καταλληλότερο για την προστασία ζωικών λιπιδίων παρά φυτικών. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο και το πλέον κατάλληλο για την προστασία της οσμής και του χρώματος των αιθέριων ελαίων, ενώ είναι και αρκετά αποτελεσματικό στον έλεγχο της οξείδωσης λιπαρών οξέων με μικρή ανθρακική αλυσίδα.

Το PG, του οποίου η χημική δομή φαίνεται στην Εικόνα 2.4.2, είναι λιγότερο διαλυτό από τα BHA και BHT, και δεν είναι κατάλληλο για διαδικασίες μαγειρέματος, καθώς οι εστέρες του γαλλικού οξέος παρουσιάζουν ευαισθησία στις υψηλές θερμοκρασίες (Gunstone, 1996). Το PG είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρεμποδίσει την οξείδωση φυτικών ελαίων, ζωικών λιπών, προϊόντων κρέατος συμπεριλαμβανομένων νωπών και κατεψυγμένων αλλαντικών και snacks. Επίσης, είναι ένα αντιοξειδωτικό αρκετά αποτελεσματικό για την προστασία ξηρών φυτικών ελαίων (Shahidi et al., 1992). Το πιο κατάλληλο αντιοξειδωτικό για τα φυτικά έλαια είναι το TBHQ. Χρησιμοποιείται σε εφαρμογές τηγανίσματος με εξαιρετικά ακόρεστα φυτικά έλαια με καλύτερα αποτελέσματα από τα BHA και BHT. Το TBHQ έχει καλή διαλυτότητα και είναι σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες (Gunstone, 1996). Είναι επαρκώς διαλυτό σε λίπη και δε συμπλοκοποιείται με σίδηρο ή χαλκό, όπως παρατηρείται στο PG. Επίσης, δεν αποχρωματίζει τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Χρησιμοποιείται μόνο του ή σε συνδυασμό με το BHA ή το BHT, αλλά όχι με το PG (Shahidi et al., 1992). Στην Εικόνα 2.4.3 φαίνεται η δομή του TBHQ.

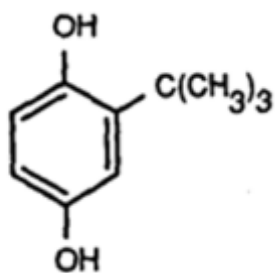
Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και περιλαμβάνονται στη διατροφή του ανθρώπου. Ωστόσο, από το 1980 έχουν εμφανιστεί τα φυσικά αντιοξειδωτικά και η χρήση τους φαίνεται συνεχώς να αυξάνεται. Αυτό οφείλεται στις ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει τοξικότητα μερικών συνθετικών αντιοξειδωτικών (Antolovich et al., 2001, Pokorny et al., 2001), ενώ υπάρχουν θεωρίες για τη δράση τους ως υποκινητές για καρκινογεννήσεις (Iverson, 1999, Williams, 1999).



**Εικόνα 2.4.1: Χημικές δομές των αντιοξειδωτικών BHA, BHT**



**Εικόνα 2.4.2: Χημική δομή του αντιοξειδωτικού PG**



**Εικόνα 2.4.3 : Χημική δομή του αντιοξειδωτικού TBHQ**

## 2.5. Φυσικά αντιοξειδωτικά

Η υγεία των καταναλωτών και τα περιβαλλοντικά προβλήματα έστρεψε τις έρευνες στην χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών (Surraikul et al., 2003). Εκτενής έρευνα έχει αφιερωθεί στην ταυτοποίηση των αντιοξειδωτικών από διάφορες φυσικές πηγές. Τα φλαβονοειδή και οι τοκοφερόλες είναι σημαντικά εμπορικά φυσικά αντιοξειδωτικά ακολουθούμενα και από άλλες κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών όπως καροτενοειδή, αμινοξέα, πρωτεΐνες, προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών, προϊόντα αντίδρασης Maillard (MRP), φωσφολιπίδια και στερόλες. Πολυάριθμα φυσικά φαινολικά αντιοξειδωτικά έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτικές πηγές και φυτικά εκχυλίσματα.

Το κύριο πλεονέκτημα των ουσιών που απαντώνται φυσιολογικά στα τρόφιμα είναι ότι η απόδειξη της ασφάλειας τους μπορεί να είναι λιγότερο αυστηρή από εκείνη που απαιτείται για τα συνθετικά προϊόντα. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα από τα βασικότερα αντιοξειδωτικά με σημαντική εμπορική αξία.

### 2.5.1. Τοκοφερόλες

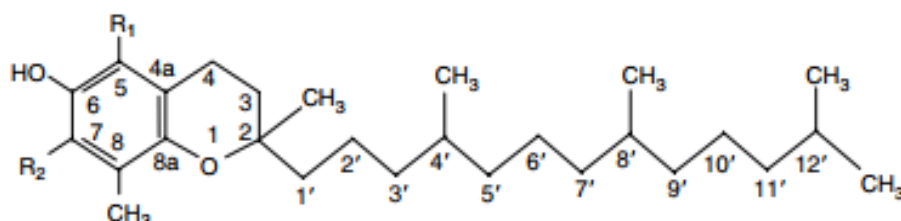
Οι τοκοφερόλες, οι οποίες βρίσκονται σε πολλά τρόφιμα, είναι τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά. Είναι μονοφαινολικά συστατικά. Μπορούν να διακριθούν σε τοκόλες και τοκοτριενόλες, όπου και οι δύο ομάδες συναντώνται σε τέσσερα ισομερή (α, β, γ, δ), ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των μεθυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο. Στις τοκόλες, οι οποίες αναφέρονται ως τοκοφερόλες, η πλευρική ανθρακική αλυσίδα είναι κορεσμένη, ενώ στις τοκοτριενόλες ακόρεστη. Η δομή των τεσσάρων ισομερών φαίνεται στην Εικόνα 2.5.1.

Οι τοκοφερόλες (TH) λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά προσφέροντας ένα υδρογόνο από την υδροξυλική ομάδα τους στις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων (ROO<sup>•</sup>), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Pokorny et al., 2001):



Οι ρίζες τοκοφερόλης (T<sup>•</sup>) είναι δομές συντονισμού οι οποίες είναι πιο σταθερές από τις ρίζες υπεροξειδίου (ROO<sup>•</sup>). Ο ρυθμός αντίδρασης της α-

τοκοφερόλης με την υπεροξειδική ρίζα λιπιδίου είναι  $107 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  και 105-106 φορές πιο γρήγορη σε σχέση με κείνη του ακόρεστου λιπαρού οξέος προς τη ρίζα. Ένα μόριο τοκοφερόλης μπορεί να προστατεύσει 103-108 μόρια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με χαμηλό αριθμό υπεροξειδίων. Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματικά η δομή της τοκοφερόλης καθώς και οι ομάδες  $R_1$  και  $R_2$  ανάλογα τη τοκοφερόλη.



**Σχήμα 2.5.1: Δομή τοκοφερόλης**

**Πίνακας 2.5.1 : Ονομασίες για τους αντίστοιχους υποκαταστάτες**

Κοινό όνομα	$R_1$	$R_2$
<b>α-τοκοφερόλη</b>	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$
<b>β-τοκοφερόλη</b>	$\text{CH}_3$	H
<b>γ-τοκοφερόλη</b>	H	$\text{CH}_3$
<b>δ-τοκοφερόλη</b>	H	H

## 2.5.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικές ουσίες που απομονώνονται από ένα ευρύ φάσμα φυτών με πάνω από 9000 γνωστές μεμονωμένες ενώσεις σήμερα. Εμφανίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών ως σύνθετα μείγματα διαφορετικών συστατικών. Συγκεκριμένα σχηματίζονται στα φυτά από τα αρωματικά αμινοξέα φαιτυλαλανίνη και τυροσίνη (Jonanovic, 1994).

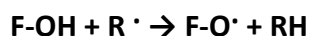
Η βασική φλαβονοειδής δομή είναι η φλαβάνη, που αποτελείται από δύο υδροξυ υποκατεστημένους αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με έναν δεσμό τριών ατόμων άνθρακα (διαμόρφωση C6-C3-C6) που τις καθιστά δότες ηλεκτρονίου

και υδρογόνου. Έτσι είναι αποτελεσματικοί δεσμευτές ελευθέρων ριζών επιβραδύνοντας τις αντιδράσεις οξειδωσης (Tsimogiannis et al., 2007).

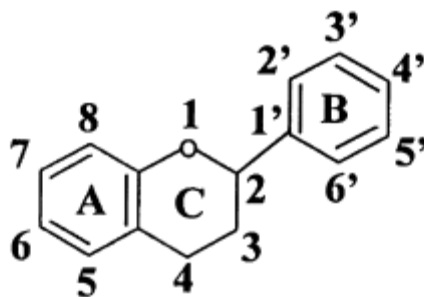
Οι διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών διαφέρουν ως προς το επίπεδο οξειδωσης τους και τον τρόπο υποκατάστασης του δακτυλίου C, ενώ οι μεμονωμένες ενώσεις σε μία κατηγορία διαφέρουν ως προς τον τρόπο υποκατάστασης των δακτυλίων A,B (Εικόνα 2.5.2). Μεταξύ των πολλών κατηγοριών φλαβονοειδών εκείνες που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι οι φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβάν-3-ολες και ανθοκυανιδίνες.

Τα φλαβονοειδή βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς, κρασιά, στο τσάι και το κακάο (Hernández et al. 2009; Shahidi, 1997). Τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματά τους πηγάζουν από την ικανότητα να αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και στην περίπτωση αυτή την LDL χοληστερίνη (Heim et al., 2002). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως έχουν αντιφλεγμονώδη, αγγειοδιασταλτική, αντιαλλεργική, ανοσοδιεγερτική και αντιική δράση (Rice-Evans et al., 1997).

Τα φλαβονοειδή δρουν ως αντιοξειδωτικά κυρίως με την δυνατότητα αναγωγής των ελευθέρων ριζών λόγω της υψηλής αντιδραστικής ικανότητας των ομάδων υδροξυλίου που συμμετέχει στην παρακάτω αντίδραση :



Η δραστηριότητα τους ως αντιοξειδωτικά εξαρτάται από την δομή και κυρίως τη διαμόρφωση του B δακτυλίου και είναι άμεσα ανάλογη με τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου που περιέχουν (Cao et al., 1997).



**Εικόνα 2.5.2 : Βασική δομή φλαβονοειδούς**

Άλλοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης ορισμένων φλαβονοειδών περιλαμβάνουν την αποδιέγερση του οξυγόνου απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen quenching) και το σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με μέταλλα (metal chelation).

Έχει αποδειχθεί πως τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρέχουν τα φλαβονοειδή με την εξής δομή (Pokorny et al., 2001; Tsimogiannis et al., 2007):

1. 3'-4'-διυδροξυδική δομή στο Β-δακτύλιο
2. 2,3-διπλό δεσμό σε συνδυασμό με μια 4-οξο-ομάδα (ομάδα =O στη θέση 4 στο C-δακτύλιο
3. παρουσία μιας 3-υδροξυλικής ομάδας στο C-δακτύλιο και μιας 5-υδροξυλικής ομάδας στον Α-δακτύλιο.

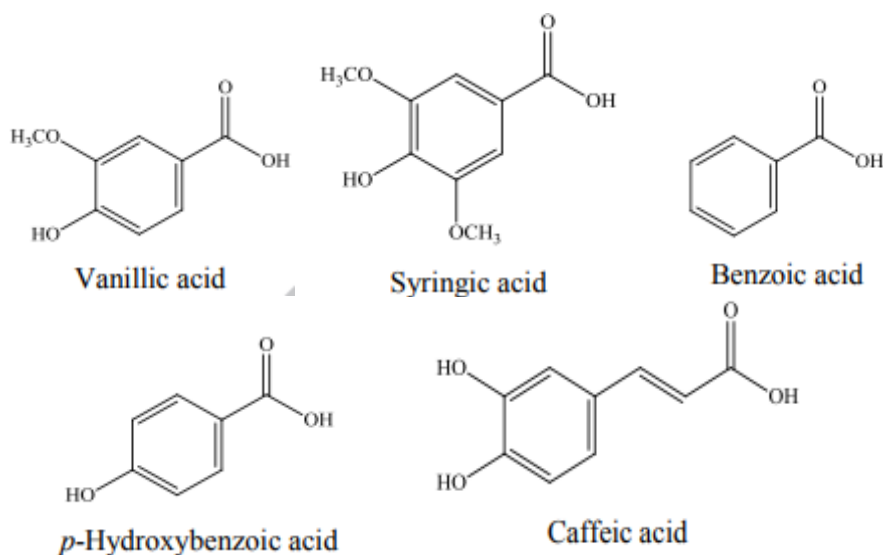
Σύμφωνα με τους Rice-Evans et al. (1997) ισχυρή αντιοξειδωτική δράση προσφέρει και η δομή μετα-5,7-διυδροξυδικής ομάδας στον Α-δακτύλιο (π.χ. καμφερόλη).

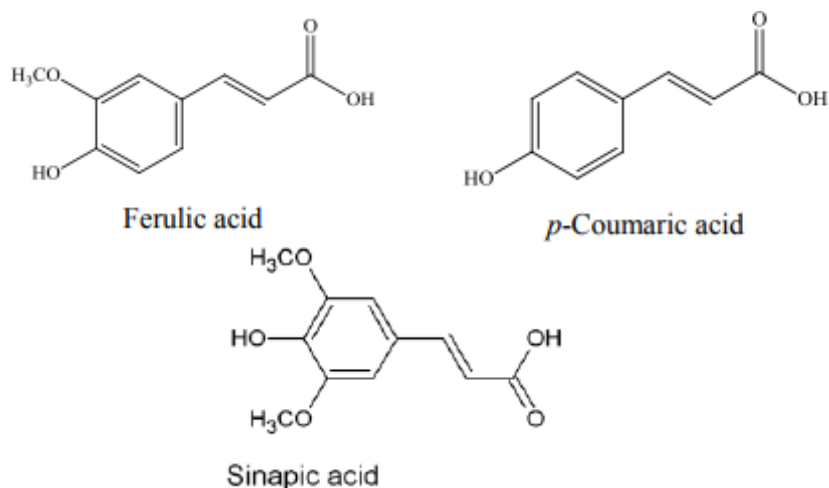
### 2.5.3. Φαινολικά οξέα

Τα φυτά συνθέτουν μια ποικιλία οργανικών μορίων, που αναφέρονται ως δευτερεύοντες μεταβολίτες. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια τέτοια ομάδα μεταβολιτών ευρέως διαδεδομένη σε ολόκληρο το φυτικό βασίλειο (Harborne et al., 2000). Τα ροσμαρινικό, καφεϊκό, π-κουμαρικό, φερουλικό, σιναπικό, χλωρογενικό, συριγγικό, βανιλλικό, π-υδροξυβενζοϊκό και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό είναι μερικά από τα πιο σημαντικά φαινολικά οξέα. Η θέση και ο βαθμός της υδροξυλίωσης είναι σημαντικοί παράγοντες της αντιοξειδωτικής ικανότητας των

φαινολικών οξέων. Σύμφωνα με μελέτες, τα μονοφαινολικά φαίνεται να είναι λιγότερο αποτελεσματικά από τα πολυφαινολικά. Η εισαγωγή μιας δεύτερης υδροξυλομάδας στην όρθο (π.χ. καφεϊκό) ή στην πάρα θέση (π.χ. πρωτοκατεχουϊκό οξύ) αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση, κάνοντας τα φαινολικά αυτά οξέα πιο αποτελεσματικά από τα αντίστοιχα μονοφαινολικά π-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ και π-κουμαρικό οξύ. Επιπροσθέτως, φάνηκε πως η αντιοξειδωτική δράση των μονοφαινολών αυξάνεται σημαντικά με ένα ή δύο μεθοξυ- υποκαταστάτες στις όρθο θέσεις του υδροξυλίου. Για παράδειγμα, το σιναπικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικό από το φερουλικό, το οποίο με τη σειρά του δείχνει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από το π-κουμαρικό, ενώ το συριγγικό είναι πιο αποτελεσματικό από το βανιλικό και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Pokorny et al., 2001, Rice-Evans et al., 1996).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων εξαρτάται από το pH. Εμφανίζουν καλή αποτελεσματικότητα σε pH που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 7-8. Η χρήση των φαινολικών οξέων ως αντιοξειδωτικά σε έλαια είναι περιορισμένη λόγω των προβλημάτων της διαλυτότητάς τους (Choe & Min, 2009).





**Εικόνα 2.5.3: Δομή βασικών μονοφαινολικών και πολυφαινολικών οξέων**

## 2.6 Αρωματικά φυτά ως πηγές αντιοξειδωτικών

Τα μπαχαρικά είναι κοινά συμπληρώματα διατροφής, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως καρυκεύματα και μερικές φορές και ως συντηρητικά σε όλο τον κόσμο για χιλιάδες χρόνια ειδικά στην Ινδία, την Κίνα και σε πολλές άλλες χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας (Frankel, 2014). Τα αρωματικά φυτά που δίνουν τα μπαχαρικά ανήκουν στις αρκετές βασικές οικογένειες, όπως Lamiaceae (π.χ. δεντρολίβανο, ρίγανη και φασκόμηλο), Lauraceae (π.χ. κανέλα), Peperaceae (π.χ. μαύρο πιπέρι), Myrtaceae (π.χ. γαρίφαλο), Umbelliferae (π.χ. κύμινο), κλπ. Η καλλιέργεια των φυτών αυτών ευνοείται σε τροπικές και εύκρατες περιοχές. Εκτός από το να δίνουν άρωμα και γεύση τα μπαχαρικά χρησιμοποιήθηκαν ανά τους αιώνες και ως παραδοσιακά φάρμακα. Οι ευεργετικές ιδιότητες των αρωματικών φυτών αποδίδονται κυρίως στη σύστασή τους σε πολυφαινόλες και κατ' επέκταση στην αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική αυτή ικανότητά τους, οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση αρωματικών φυτών ωφέλιμων για την υγεία του ανθρώπου, καθώς και σε μελέτες για τη δυνατότητα της χρήσης τους για την επέκταση της διάρκειας ζωής των λιπαρών τροφίμων (Dorman et al., 2003).

Τα αντιοξειδωτικά συστατικά από τα αρωματικά φυτά μπορούν να ανακτηθούν και να συμπυκνωθούν ως αιθέρια έλαια, εκχυλίσματα ή ελαιορητίνες. Τα αιθέρια έλαια είναι εξαιρετικά πολύπλοκα μίγματα που αποτελούνται από πτητικές λιπόφιλες ουσίες, κυρίως υδρογονάνθρακες ή μονολειτουργικές ενώσεις που προέρχονται από το μεταβολισμό των μονο- και σεσκιτερπενίων,



φαινυλοπροπανοειδών, αμινοξέων και λιπαρών οξέων (Bauer, Garbe & Surburg, 2001). Η ανάκτηση τους επιτυγχάνεται με ατμοαπόσταξη, με εκχύλιση (με οργανικό διαλύτη ή υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>) ή μηχανική συμπίεση. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων καρβακρόλη και θυμόλη έχουν σχετιστεί τόσο με αντιμικροβιακή δράση (Tongnuanchan & Benjakul, 2014), όσο και με αντιοξειδωτική (Tsimogiannis et al., 2017). Όσον αφορά τα εκχυλίσματα των εν λόγω φυτών έχει αποδειχθεί ότι δίνουν υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το νερό, η ακετόνη ο οξικός αιθυλεστέρας, οι αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανάλη) και μίγματα αυτών (Oniszczuk et al, 2014). Ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη ανακτούν τις μη πολικές ενώσεις όπως τα άγλυκα φλαβονοειδή (κερκετίνη, λουτεολίνη, απιγενίνη, εριοδικτυόλη) και τερπενοειδή (καρνοσόλη, καρβακρόλη, θυμόλη) ενώ οι αλκοόλες, το νερό και μείγματα τους ανακτούν φαινολικά οξέα (καφεϊκό, ροσμαρινικό, σαλβιανολικό) και γλυκοζίτες φλαβονοειδών (ρουτίνη, γλυκοζίτης απιγενίνης). Τέλος οι ελαιορητίνες ανακτώνται από οργανικούς διαλύτες (οξικό αιθυλεστέρα, εξάνιο, αλκοόλες) και περιέχουν μη πτητικές, λιπόφιλες ενώσεις όπως ρητίνες, κηρούς και λιπαρά έλαια (Rajamma, Bai & Nambisan, 2012). Συνήθως χρησιμοποιούνται ως γευστικοί ή αντιμικροβιακοί παράγοντες (Singh et al, 2014; Upadhyay & Mishra, 2014).

Μια από τις κύριες οικογένειες αρωματικών φυτών της Ελλάδας αποτελεί η οικογένεια Lamiaceae (ή Lamiales ή *χειλανθή*). Φύεται σε όλη την ελληνική επικράτεια και ευδοκίμει σε θερμά και ξηρά κλίματα. Περιλαμβάνει 180 γένη και 3500 είδη, ενώ τα μέλη της είναι φυτά ποώδη, ετήσια ή πολυετή, φρύγανα, θάμνοι και σπανίως δένδρα και αναρριχόμενα. Πολλά φυτά της συγκεκριμένης οικογένειας έχουν μελετηθεί ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση. Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) και το θρούμπι (*Satureja thymbra*) αποτελούν αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae με μεγάλο ενδιαφέρον ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και τη χρήση τους σε λιπαρά τρόφιμα. Σε έρευνα από τους V. Exarchou et al. 2002 & Tsimogiannis et al. 2016 αποδείχθηκε η υψηλή ικανότητα στην δέσμευση ελευθέρων ριζών των αιθανολικών εκχυλισμάτων ρίγανης, φασκόμηλου και θρουμπιού η οποία συνάδει με την υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά στοιχεία και φλαβονοειδή που έδειξαν.

### 2.6.1. Θρούμπι (*Satureja Thymbra*)

Τα είδη της *Satureja* απαντώνται, όπως και εκείνα των *Origanum* και *Thymus*, σε μεγάλο ποσοστό στις μεσογειακές χώρες. Έχουν βρεθεί περίπου 200 είδη (Tere, 2015). Μερικά από αυτά, όπως η *Satureja thymbra*, έχουν εμπορική σημασία λόγω της χρήσης τους ως μπαχαρικά. Το θρούμπι



χαρακτηρίζεται από μια μυρωδιά παρόμοια με εκείνη της ρίγανης. Πρόκειται για ξυλώδη θάμνο που συναντάται σε ξηρές και βραχώδεις τοποθεσίες (Skoula, 2005). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα είδη *Satureja* έχουν αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές (D.Tsimogiannis et al., 2016), αντιμυκητιακές (Müller-Riebau, Berger, & Yegen, 1995), αντικές (Loizzo et al., 2008) και αναλγητικές ιδιότητες (Ulku-Karabay Yavasoglu et al., 2006). Ο Öztürk (2012) ανίχνευσε 25 συστατικά στο αιθέριο έλαιο της *Satureja thymbra* με τα κυριότερα να είναι: καρβακρόλη (34.6%), γ-τερπινένιο (22.9%), π-κυμένιο (13.0%), θυμόλη (12.8%), β-θυμόλη-μεθυλοαιθέρας (4.40%) και β-καριοφυλλένιο (3.96%). Επίσης, εντοπίστηκαν το α-τερπινένιο και η λιναλοόλη σε ποσοστά 2.33% και 1.67%, αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη έρευνα προσδιορίστηκε και η αντιοξειδωτική δράση τόσο του αιθέριου ελαίου όσο και του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού.

Επιπροσθέτως, έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη τοκοφερολών σε εκχύλισμα και σε ξηρά φύλλα της *Satureja thymbra*. Σύμφωνα με τους Lagouri et al. 1996, η περιεκτικότητα σε γ-τοκοφερόλη, που βρέθηκε να είναι η επικρατέστερη και όπως έχει αναφερθεί αποτελεί τη δεύτερη σε σειρά αποτελεσματικότητας, ανέρχεται σε ποσοστό 0.95% για το εκχύλισμα και 456 ppm για το ξηρό φυτό, σε σύγκριση με τις τιμές 0.71% και 500 ppm, που βρέθηκαν για τη ρίγανη, αντίστοιχα. Οι Skoula et al. 2005 αναφέρουν συγκέντρωση φλαβονοειδών 3.26 mg/g ξηρού φυτού με φλαβανόνες τις: ναριγγενίνη, αρωμαδενδρίνη, εριοδικτυόλη, ταξιφολίνη και

κυριότερες флаβόνες: λαδανεινή και 6-υδροξυ-λουτεολινο-7,3',4'-τριμεθυλο-αιθέρα.

Τόσο το αιθέριο έλαιο όσο και τα εκχυλίσματα του φυτού *Satureja thymbra* έχουν δείξει μια καλή ανασταλτική δραστικότητα έναντι της οξειδωσης. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του αιθέριου ελαίου έναντι της ρίζας DPPH έχει επιβεβαιωθεί και από τους Giweli et al., 2012. Επιπλέον σε πρόσφατη έρευνα οι D. Tsimogiannis et al., 2016 μελέτησαν την επίδραση εκχυλίσματος οξικού αιθλεστέρα παλαιωμένου φυτού συγκέντρωσης 500 ppm σε 110 g φοινικέλαιου σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξειδωσης 70 °C και διαπίστωσαν μειωμένο ρυθμό παραγωγής υπεροξειδίων κατά 43% συγκριτικά με το δείγμα αναφοράς. Τέλος οι ίδιοι στην έρευνα τους βρήκαν από ανάλυση υγρής χρωματογραφίας την σύσταση των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων του φυτού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6.1.

**Πίνακας 2.6.1: Συγκέντρωση βιοδραστικών συστατικών του φυτού *Satureja Thymbra* σε υδατικό, αιθανολικό και οξικού αιθυλεστέρα εκχύλισμα.**

Εκχυλίσματα	Υδατικό (Aq)	Οξικού ιαθυλεστέρα (EAc)	Αιθανολικό (EtOH)
<b>Βιοδραστικά συστατικά (g/kg ξηρού εκχυλίσματος)</b>			
Cafeic acid	1.75± 0.01	-	2.69± 0.1
Apigenin 6,8-di-C-glycoside	11.0 ± 0.1	-	23.7± 0.2
Luteolin 7,4-di-O-glucuronide	3.43 ± 0.02	-	2.44± 0.39
Luteolin 7-O-rutinoside	20.09± 0.7	-	57.0 ±0.7
Aromadendrin	-	-	-
Rosmarinic acid	62.0±0.6	24.6± 0.5	133.7±1.2
Apigenin 7-O-glycoside	3.10± 0.58	1.24 ± 0.25	10.2± 2.4
Eriodictyol	3.28± 0.12	6.7 ± 0.2	0.68± 0.03
Unidentified phenolic acid	9.09±0.20	-	-
Lithospermic acid	13.6± 0.30	-	8.0±0.8
Salvanolic acid A	21.1±1.00	20.8± 0.9	66.4±1.7
Naringenin	-	4.5 ± 0.3	-
Quercetin	-	2.22±0.30	-
Luteolin	-	10.5±1.6	-
Apigenin	2.81± 0.27	5.4±1.2	28.4±0.5
Carvacrol	0.21± 0.12	17.0± 1.6	-
6-OH luteolin 7,3'-demethyl ether	-	30.8± 3.3	21.7 ± 1.2
6-OH luteolin 7,3' 4'- trimethyl ether	-	15.2± 2.6	7.1± 0.6

### 3. ΕΝΕΡΓΟΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

#### 3.1 Γενικά-Ορισμός

Παραδοσιακά η συσκευασία τροφίμων προορίζεται για την μηχανική υποστήριξη των τροφίμων και την προστασία από εξωτερικές επιδράσεις, όπως μικροοργανισμούς, οξυγόνο, οσμές, φως κ.λπ. ενώ συμβάλει στην ευκολία διαχείρισης των τροφίμων και στη διατήρηση της ποιότητας για μεγαλύτερη χρονική περίοδο.

Οι νέες μορφές της ενεργού και έξυπνης συσκευασίας διαδραματίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο, προσφέροντας πολλές και καινοτόμες λύσεις για την παράταση της διάρκειας ζωής, τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και τη συμβολή στην υγεία των καταναλωτών διατηρώντας παράλληλα την ποιότητα του τροφίμου. Οι κινητήριες δυνάμεις που οδήγησαν στην ανάπτυξη της τεχνολογίας των ενεργών συσκευασιών είναι παράγοντες όπως οι αυστηρές απαιτήσεις για την υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, η ζήτηση για ελάχιστα μεταποιημένα τρόφιμα και οι αλλαγές στον τρόπο διανομής και στις συνθήκες λιανικής.

Ως ενεργός συσκευασία ορίζεται το σύστημα συσκευασίας που ενσωματώνει σκόπιμα συστατικά, τα οποία απελευθερώνονται ή απορροφούν ουσίες προς το συσκευασμένο τρόφιμο ή το περιβάλλον που περιβάλλει το τρόφιμο ώστε να παραταθεί ή να διατηρηθεί η διάρκεια ζωής του προϊόντος ή να βελτιωθεί η κατάσταση του (αριθμός κανονισμού 450/2009 (29/05/2009)).

Η ενεργός συσκευασία μπορεί να φέρει αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακούς παράγοντες, και/ή θρεπτικά συστατικά. Οι βασικοί κανόνες ασφάλειας για τα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα απαιτούν να είναι όσο το δυνατόν πιο αδρανή, δηλαδή να υπάρχει ελάχιστη αλληλεπίδραση μεταξύ τροφής και συσκευασίας. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες, μία από τις πιο καινοτόμες τεχνολογίες στον τομέα της συσκευασίας τροφίμων είναι η «ενεργή και έξυπνη» συσκευασία (Active & Intelligent), που βασίζεται σε σκόπιμες αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον των τροφίμων ή τα ίδια τα τρόφιμα. Οι συσκευασίες αυτές κρίνονται σημαντικές ιδιαίτερα για ωμά τρόφιμα καθώς και για τρόφιμα με μεγάλη διάρκεια ζωής (Labusa and Breene 1989).

Όσον αφορά στη διάθεση τους στο εμπόριο, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα συστήματα απορρόφησης οξυγόνου, υγρασίας, αιθυλενίου και CO<sub>2</sub> καθώς και συστήματα απελευθέρωσης αντιοξειδωτικών, αιθανόλης και CO<sub>2</sub> τα οποία θα αναπτυχθούν εκτενώς σε παρακάτω ενότητες.

## 3.2. Κατηγορίες ενεργών συσκευασιών

### 3.2.1 Δέσμευση οξυγόνου

Η παρουσία του οξυγόνου σε συσκευασμένα τρόφιμα είναι ένας παράγοντας που συχνά μειώνει τον χρόνο ζωής τους. Συγκεκριμένα ευνοεί την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών καθώς επίσης μπορεί να προκαλέσει οξείδωση υποβαθμίζοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, μειώνοντας την θρεπτικότητα, την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου. Επομένως η αφαίρεση του οξυγόνου από τον υπερκείμενο χώρο συσκευασμένων τροφίμων, διαλυμάτων από υγρά τρόφιμα καθώς και από αλκοολούχα ποτά αποτελεί εδώ και καιρό στόχο των επιστημόνων των τροφίμων.

Οι υπάρχουσες τεχνολογίες απομάκρυνσης O<sub>2</sub> ποικίλουν και μπορεί να αφορούν στην οξείδωση ουσιών όπως σκόνη σιδήρου, ασκορβικό οξύ, φωτοευαίσθητες χρωστικές, ένζυμα (όπως οξειδάση της γλυκόζης και οξειδάση της αιθανόλης), ακόρεστα λιπαρά οξέα (όπως ελαϊκό, λινολεϊκό και λινολενικά οξέα), εκχύλισμα ρυζιού ή ακινητοποιημένης ζύμης σε ένα στερεό υπόστρωμα (Floros et al., 2000). Επιπλέον αντιοξειδωτικές ουσίες όπως οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το υπεροξειδικό ανιόν του οξυγόνου O<sub>2</sub><sup>-</sup> και την ρίζα υδροξυλίου OH<sup>·</sup> είτε με την λήψη ενός ηλεκτρονίου είτε με την παροχή ενός υδρογόνου από το μόριο τους (Masek, 2017). Τονίζεται πως για να είναι αποτελεσματικός ένας σαρωτής οξυγόνου πρέπει να αφαιρεί το οξυγόνο από την συσκευασία μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως εντός ωρών ή λίγων ημερών έτσι ώστε το ευαίσθητο στο οξυγόνο προϊόν να προστατεύεται πριν ξεκινήσει η οξειδωτική βλάβη (Solovyon, 2014).

Τα πρώτα βήματα αυτής της τεχνολογίας ξεκίνησαν στην Ιαπωνία το 1977 με τις ουσίες δέσμευσης σε ένα σακουλάκι μέσα στη συσκευασία. Στην πορεία όμως προωθήθηκε μια εναλλακτική μέθοδος ενσωμάτωσης των ουσιών στην ίδια την συσκευασία μειώνοντας έτσι το κόστος στην παραγωγή τροφίμων και

αυξάνοντας την αρέσκεια και την ασφάλεια των καταναλωτών εφόσον το σακουλάκι αποτελούσε ένα μη εδώδιμο προϊόν. Η ενσωμάτωση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ετικέτες, φύλλα, ή ταινίες στο εσωτερικό της συσκευασίας είτε με την ανάμειξη στα πολυμερή υλικά της συσκευασίας όπως πολυολεφίνες ή πολυεστέρες.

Διάφοροι αλληλένδετοι παράγοντες επηρεάζουν την επιλογή του τύπου και του μεγέθους του απορροφητικού υλικού που απαιτείται. Οι πιο σημαντικοί είναι:

- η φύση του τροφίμου (δηλ. το μέγεθος, το σχήμα, το βάρος)
- η υγρασία του τροφίμου
- η ποσότητα διαλυμένου O<sub>2</sub> στο τρόφιμο
- η επιθυμητή διάρκεια ζωής
- το αρχικό επίπεδο O<sub>2</sub> στην περιοχή του υπερκείμενου χώρου
- η διαπερατότητα σε οξυγόνο του υλικού συσκευασίας

Τεχνολογίες απορρόφησης O<sub>2</sub> έχουν χρησιμοποιηθεί για μια σειρά από τρόφιμα όπως ωμά, μαγειρεμένα και κατεψυγμένα κρέατα, προϊόντα πουλερικών, αποξηραμένα ψάρια, καφές, πίτσες, είδη αρτοποιίας, αποξηραμένα συστατικά τροφίμων, κέικ, ψωμιά, μπισκότα, κρουασάν, φρέσκα ζυμαρικά, τσάι, μπαχαρικά, βότανα, είδη ζαχαροπλαστικής και σνακ (Ozdemir, 2010).

Έχει διαπιστωθεί πως οι σαρωτές οξυγόνου διατηρώντας την συγκέντρωση του οξυγόνου 0,1% v/v αποτελούν αποτελεσματικό μέτρο για την αποφυγή της ανάπτυξης βακτηρίων και μούχλας σε προϊόντα γάλακτος και αρτοσκευάσματα (Rooney, 1995).

Σε πείραμα των Mohan et al. 2004 η προσθήκη φακελίσκων με σίδηρο σε συσκευασία πολυαθυλενίου με φιλέτα ψαριού μείωσε το περιεχόμενο οξυγόνο σε 0,42% σε διάστημα μιας μέρας και παρεμπόδισε την οξείδωση με αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας ζωής κατά 10 μέρες.

Επίσης σε έρευνα που έχει διεξαχθεί από τους Gomes et. al. 2009, η ενσωμάτωση λεπτού στρώματος σιδήρου σε πολυστρωματική πλαστική-αλουμινένια συσκευασία που περιείχε τρόφιμο γεμιστό με ζεστό τυρί έτοιμο προς

κατανάλωση είχε θετικά αποτελέσματα εφόσον μείωσε τα επίπεδα οξυγόνου σε συγκέντρωση <0.5% σε 11 μέρες.

Τέλος πολυφαινόλες από υδατικό εκχύλισμα πράσινου τσαγιού απεδείξαν ισχυρή απορροφητική δράση σε ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) κατά την δοκιμή τους σε μοντέλο ακτινοβολίας ριφοφλαβίνης που παρήγαγε καθαρό ανιόν υπεροξειδίου με απορρόφηση 70% αυτών (Zhao et al. 1989).

### 3.2.2 Παγίδευση ή απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα

Υψηλά επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή οργανοληπτικού και ποιοτικού χαρακτήρα σε ορισμένα τρόφιμα και γι' αυτό η δέσμευση του κρίνεται απαραίτητη. Οι δεσμευτές  $CO_2$  μπορεί να αποτελούνται είτε από φυσικό υλικό απορρόφησης όπως ο ζεόλιθος και η σκόνη ενεργού άνθρακα είτε από χημικές ουσίες όπως το  $Ca(OH)_2$  και το  $Mg(OH)_2$  τα οποία τυπικά συσκευάζονται σε μικρούς φακελίσκους χαρτιού επικαλυμμένους με διάτρητο πολυπροπυλένιο (PP).

Φακελίσκοι που περιέχουν  $Ca(OH)_2$  σε συνδυασμό με σκόνη σιδήρου απορροφούν εξίσου  $CO_2$  και  $O_2$  και βρίσκουν εφαρμογή στην συσκευασία καβουρδισμένου ή αλεσμένου καφέ. Ο φρέσκος καβουρδισμένος καφές απελευθερώνει σημαντικά ποσά  $CO_2$  (εξαιτίας της αντίδρασης Malliard κατά τη διάρκεια του ψησίματος) με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος διόγκωσης ή και διάρρηξης της συσκευασίας αν δεν απομακρυνθεί (Robertson, 2009).

Ορισμένες φορές ωστόσο η απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα κρίνεται χρήσιμη είτε για μηχανικούς παράγοντες προς την συσκευασία είτε για προστατευτικούς προς το τρόφιμο. Συγκεκριμένα υπάρχουν φακελίσκοι που περιέχουν ασκορβικό οξύ και ανθρακικό σίδηρο ή ασκορβικό οξύ με όξινο ανθρακικό νάτριο οι οποίοι απορροφούν  $O_2$  και απελευθερώνουν ισοδύναμο όγκο  $CO_2$  αποτρέποντας την κατάρρευση της συσκευασίας, ένας κίνδυνος σε περιπτώσεις ευέλικτης συσκευασίας που γίνεται μόνο απορρόφηση του οξυγόνου.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις σε διοξείδιο του άνθρακα (60-80%) παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροβίων και κατ' επέκταση παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του τροφίμου. Ως εκ τούτου μια συμπληρωματική προσέγγιση στους μηχανισμούς απορρόφησης οξυγόνου είναι η απελευθέρωση διοξειδίου του



άνθρακα. Δεδομένου ότι το διοξείδιο του άνθρακα έχει 3 ως 5 φορές μεγαλύτερη διαπερατότητα στις περισσότερες πλαστικές μεμβράνες πρέπει να παράγεται συνεχώς ώστε να διατηρείται στην επιθυμητή συγκέντρωση μέσα στη συσκευασία. Συνεπώς μηχανισμοί παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα είναι χρήσιμοι σε εφαρμογές όπως κρέας, πουλερικά, ψάρια και τυριά (Floros et al. 1997).

### 3.2.3 Απορρόφηση αιθυλενίου (Ethylene Absorbers)

Η φυτική ορμόνη αιθυλενίου ( $C_2H_4$ ) παράγεται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των φρούτων και των λαχανικών και μπορεί να έχει τόσο θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα στα φρέσκα προϊόντα. Οι θετικές επιδράσεις αφορούν στην καταλυτική διαδικασία ωρίμανσης, ενώ οι αρνητικές περιλαμβάνουν την αύξηση του ρυθμού αναπνοής (που οδηγεί σε μαλάκωμα του ιστού του καρπού και σε πρόωρη γήρανση), αποικοδόμηση της χλωροφύλλης και πρόκληση διαταραχών μετά τη συγκομιδή.

Οι απορροφητικές ουσίες του αιθυλενίου που έχουν διατεθεί στο εμπόριο βασίζονται στο υπερμαγγανικό κάλιο ( $KMnO_4$ ), το οποίο οξειδώνει το αιθυλένιο σε μια σειρά αντιδράσεων προς ακεταλδεΐδη και στη συνέχεια προς οξικό οξύ, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να οξειδωθεί προς  $CO_2$  και  $H_2O$ . Επειδή το υπερμαγγανικό κάλιο αποτελεί μία τοξική ουσία δεν μπορεί να έρχεται σε άμεση επαφή με το τρόφιμο στη συσκευασία. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αδρανείς ουσίες με μεγάλη επιφάνεια επαφής όπως το silica gel, ο περλίτης, η αλουμίνα, ο ενεργός άνθρακας και ο σελίτης στις οποίες προστίθεται 4-6% υπερμαγγανικό κάλιο και τοποθετούνται σε σακουλάκι το οποίο είναι ασφαλές πλέον στη συσκευασία (Robertson, 2007).

### 3.2.4. Απορρόφηση υγρασίας

Στα συσκευασμένα τρόφιμα μπορεί να παγιδευτεί ορισμένη ποσότητα υγρασίας είτε την ώρα που συσκευάζονται είτε μετά μέσω της διάχυσης από το περιβάλλον καθώς επίσης μπορεί να παραχθεί από το ίδιο το τρόφιμο. Τα προβλήματα υγρασίας μπορούν να προκύψουν από ποικίλες περιστάσεις όπως η αναπνοή φυτικών προϊόντων, η τήξη του πάγου, οι διακυμάνσεις θερμοκρασίας σε

τρόφιμα με υψηλή σχετική υγρασία ή το στάγδην του υγρού ιστού από τα κομμένα κρέατα. Αν αυτό το νερό αφήνεται να συσσωρευτεί μέσα στην συσκευασία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μούχλας και βακτηρίων ή θολότητα στα φιλμς.

Για την μείωση της υγρασίας χρησιμοποιούνται απορροφητικά φύλλα που αποτελούνται από δύο στρώματα μιας μικροπορώδους ή ανοιχτής δομής (nonwoven) πλαστικής μεμβράνης, όπως χαμηλής πυκνότητας πολυπροπυλένιο (LDPE) ή πολυπροπυλένιο (PP), μεταξύ του οποίου τοποθετείται ένα υπεραπορροφητικό πολυμερές ικανό να απορροφήσει έως και 500 φορές το δικό του βάρος σε νερό. Τα τυπικά υπεραπορροφητικά πολυμερή περιλαμβάνουν πολυακρυλικά άλατα, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) και συμπολυμερή μοσχευμάτων αμύλου, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή συνάφεια προς το νερό (Rooney 1995).

Πολλές εταιρείες κατασκευάζουν απορροφητικά φύλλα όπως Thermarite® ή Peaksorb® (Αυστραλία) ή Torran™ (Ιαπωνία) για τον έλεγχο υγρού νερού σε τρόφιμα με υψηλή ενεργότητα νερού όπως το κρέας, τα ψάρια, τα πουλερικά και τα φρέσκα προϊόντα. Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί σακουλάκια με NaCl στις ΗΠΑ στο εμπόριο τομάτας. Άλλες εφαρμογές θέλουν ξηραντικές ουσίες να απορροφούν την υγρασία όπως silica gel, μοριακά κόσκινα, φυσικοί άργιλοι, ζεόλιθο και οξείδιο του ασβεστίου σε φάσμα τροφίμων όπως τυριά, κρέατα, τσιπς, καρύδια, κόμμεα και μπαχαρικά.

### 3.2.5. Αντιοξειδωτικές συσκευασίες

Η χρήση αντιοξειδωτικών σε ενεργό συσκευασία έχει μεγάλο ενδιαφέρον για τους τεχνολόγους τροφίμων, καθώς η διαδικασία αυτή μπορεί να μειώσει την οξείδωση λιπιδίων και άλλων ευαίσθητων ουσιών (π.χ βιταμίνες ευαίσθητες στην φωτοοξείδωση) ενώ παράλληλα μπορεί να αυξήσει τη θρεπτική αξία των τροφίμων (Barbosa-Pereira et al., 2013 ; Pereira de Abreu et al., 2012).

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι δράσης των αντιοξειδωτικών συσκευασιών, η δέσμευση ανεπιθύμητων ενώσεων όπως το οξυγόνο, τα ριζικά οξειδωτικά είδη ή τα μεταλλικά ιόντα από τον περιβάλλοντα χώρο ή από το ίδιο το τρόφιμο και η απελευθέρωση αντιοξειδωτικών στο τρόφιμο.

Η πρώτη περίπτωση αφορά στους σαρωτές οξυγόνου από υλικά όπως οι σκόνες σιδήρου και οξειδίου του σιδήρου, το ασκορβικό οξύ, τα θειώδη άλατα, η κατεχόλη και τα ένζυμα όπως η οξειδάση της γλυκόζης (Brody et al., 2008). Πιο ειδικά οι παραπάνω ουσίες αντιδρούν, τροποποιούν ή παγιδεύουν ουσίες που εμπλέκονται σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας οξείδωσης. Δεδομένου ότι οι ουσίες αυτές δεν απελευθερώνονται στο τρόφιμο, η συσκευασία θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να επιτρέπει την πρόσβαση των προ-οξειδωτικών ουσιών στη θέση όπου ενσωματώνονται οι σαρωτές-αντιοξειδωτικά.

Όσον αφορά στα υλικά συσκευασίας που απελευθερώνουν αντιοξειδωτικά, ένα από τα κύρια οφέλη, σε σύγκριση με την άμεση προσθήκη αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα, είναι ότι τα ενεργά υλικά μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγή αντιοξειδωτικών με ελεγχόμενους ρυθμούς απελευθέρωσης στο τρόφιμο, έτσι ώστε να διατηρείται στην τροφή μία καθορισμένη συγκέντρωση δραστικής ένωσης, αντί να υπάρχει μία αυξημένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών στην αρχή της αποθήκευσης (Mastromatteo et al., 2010).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να προστεθούν είτε στο πολυμερές της συσκευασίας κατά τη διάρκεια της χύτευσης του είτε ως επικάλυψη στο εσωτερικό της. Η κατάλληλη επιλογή του αντιοξειδωτικού που θα ενσωματωθεί είναι κρίσιμη αφού πρέπει να είναι συμβατό με την συσκευασία και να επιτυγχάνεται ομογενής κατανομή στο χώρο. Επίσης η κατάλληλη επιλογή άπτεται στη συμβατότητα με το τρόφιμο καθώς αφού απελευθερωθούν η διαλυτότητα τους κρίνει την αποτελεσματικότητά τους. Συγκεκριμένα τα άπολα αντιοξειδωτικά φαίνονται πιο αποδοτικά σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα λιπιδίων και αντίστροφα. Ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψιν το “αντιοξειδωτικό παράδοξο” σύμφωνα με το οποίο τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά είναι πιο αποδοτικά σε χύδην έλαια ενώ τα υδρόφοβα είναι πιο αποτελεσματικά σε γαλακτωματοποιημένα έλαια. Αυτή η παρατήρηση αποδόθηκε στην ικανότητα του πολικού αντιοξειδωτικού να συγκεντρώνεται στη διεπαφή λαδιού και αέρα όπου η οξείδωση ήταν πιο έντονη και στην ικανότητα των μη πολικών ουσιών να συγκεντρώνονται στη λιπιδική φάση των γαλακτωμάτων, ενώ το πολικό να χωρίζεται τόσο στην λιπόφιλη όσο και στην υδρόφιλη φάση. (McClements , 2000).

### 3.2.5.1. Προσθήκη αντιοξειδωτικού στο πολυμερές της συσκευασίας

Η προσθήκη στο ίδιο το πολυμερές συχνά μειώνει την τελική συγκέντρωση αντιοξειδωτικού λόγω θερμικής αποικοδόμησης, εξάτμισης αν είναι πτητικό και αντίδρασης ως προστατευτικό του πολυμερούς. Οι Soto-Cantú et al., 2008 παρουσίασε μείωση 29.7, 48.8, και 57.3% του βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT) κατά την επεξεργασία μονοστρωματικού φιλμ LDPE για αντίστοιχες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού 0.5, 1, 2 mg/g φιλμ.

Ωστόσο έρευνες για την ικανότητα μεταφοράς του βουτυλιωμένου υδροξυτολουολίου (BHT) και της βουτυλιωμένης υδροξυανισόλης (BHA) από μονοστρωματικό φιλμ πολυολεφίνης κατέδειξαν πως αυτές οι ενώσεις έχουν μεγάλη κινητικότητα προς τα λίπη και αυτό οδήγησε στην εφαρμογή τους σε αντιοξειδωτικές συσκευασίες. Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί εμπορικά συσκευασία πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας (HDPE) με προσθήκη BHT για την προστασία από οξείδωση δημητριακών και κράκερ (Miltz et al., 1988).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η απελευθέρωση των BHA και BHT από την εσωτερική πλαστική επένδυση έχει εφαρμοστεί σε δημητριακά πρωινού και προϊόντα σνακ. Έχει επίσης υπάρξει ενδιαφέρον για τη χρήση της βιταμίνης E ως αντικαταστάτη των BHA και BHT καθώς είναι εξίσου αποτελεσματική (Day, 2008).

Σε έρευνα που διεξήχθη από τους Diana Granda-Restrepo et al. 2008 συγκρίθηκε η προσθήκη BHT, BHA, α-τοκοφερόλης και ο συνδυασμός α-τοκοφερόλης- BHA σε πολυστρωματική μεμβράνη (HDPE- EVOH- LDPE) που συσκευάζει σκόνη γάλακτος για την προστασία από φωτοξείδωση και οξειδωτικό ταγγισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η διάχυση των αντιοξειδωτικών συσχετιζόταν με το μέγεθος, το σχήμα των μορίων και τον βαθμό σύνδεσης τους με το πολυμερές. Έτσι η α-τοκοφερόλη έδειξε ένα πιο αργό ρυθμό μεταφοράς λόγω μεγαλύτερου μεγέθους σε αντίθεση με τα άλλα δυο και καλύτερη προστασία της βιταμίνης A της σκόνης.

Σε πείραμα που έγινε από τους Lee et al. 2003 μελετήθηκε η διάχυση νισίνης και α-τοκοφερόλης από τη συσκευασία σε γαλάκτωμα απεσταγμένου νερού και παραφινέλαιου. Η συσκευασία ήταν χάρτινη και η επικάλυψη των αντιοξειδωτικών παραγόντων έγινε με τη βοήθεια ενός συ πολυμερούς οξικού

βινυλίου-αιθυλενίου ως συνδετικού παράγοντα. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στον δεύτερο νόμο του Fick για άπειρη πλάκα σε επαφή με άπειρο όγκο διαλύτη (Crank 1975). Μετά το πέρας της διάχυσης διαπιστώθηκε πως η νισίνη που απελευθερώθηκε στο διάλυμα αποτελούσε το 9% της αρχικής περιεκτικότητας που ενσωματώθηκε ενώ η α-τοκοφερόλη το 6%. Ο ρυθμός διάχυσης βρέθηκε μεγαλύτερος για την α-τοκοφερόλη με τιμή  $2,91 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  ενώ για την νισίνη  $9,34 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ , γεγονός που συνδέεται με τις μοριακές ιδιότητες καθώς και με την αλληλεπίδραση του συνδετικού μέσου με αυτά (Kim et al., 2000; Wessling et al., 2000).

Σε μια ακόμα έρευνα οι Restrepo et al. 2009 ανέπτυξαν μια πολυστρωματική ενεργή συσκευασία (πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας, συμπολυμερές αιθυλενίου και βινυλικής αλκοόλης, πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας) στην οποία ενσωμάτωσαν 4% α-τοκοφερόλη. Η συσκευασία αυτή περιείχε σκόνη γάλακτος με 26% λιπαρά και κατά την αποθήκευση της στους 30 °C η διατηρησιμότητα αυξήθηκε κατά 20 μέρες ενώ στους 40 °C κατά 50 ημέρες αποδεικνύοντας την αντιοξειδωτική δράση της α-τοκοφερόλης. Η διαφορά στην επέκταση του χρόνου ζωής αποδόθηκε στον υψηλό ρυθμό αντιδράσεων της οξείδωσης που συμβαίνουν όσο αυξάνει η θερμοκρασία.

Η απελευθέρωση ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους από πολυμερή υλικά επηρεάζεται από την περιεκτικότητα των τροφίμων σε λιπαρά, αλκοόλ, ιχνοστοιχεία και οργανικά οξέα (Chung et al., 2001; Wessling et al., 2000). Η μετανάστευση πρόσθετων από πλαστικά υλικά είναι πολύ μεγαλύτερη όταν έρχονται σε επαφή με λιπαρά τρόφιμα παρά με τρόφιμα που έχουν ως βάση το νερό (Figge et al., 1991).

### *3.2.5.2 Προσθήκη αντιοξειδωτικού ως επικάλυψη στη συσκευασία*

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να επικαλυφθούν στο εσωτερικό της συσκευασίας δρώντας έτσι άμεσα με το προϊόν χωρίς μεταφορά μάζας στο υλικό συσκευασίας. Δεδομένου ότι οι δραστικές ουσίες δεν μεταναστεύουν η δραστηριότητα περιορίζεται στην επιφάνεια επαφής μόνο. Επομένως φαίνεται αυτό το είδος ανάπτυξης να είναι κατάλληλο για υγρά προϊόντα όπως είναι τα λάδια. Σε στερεά ή ημιστερεά η δράση περιορίζεται μόνο στα σημεία επαφής οπότε βρίσκει εφαρμογή σε συσκευασίες κενού και στη κατασκευή διαχωριστικών διαφανειών. Οι

Arrua, Strumia και Nazareno 2010 ακινητοποίησαν καφεϊκό οξύ σε τροποποιημένη επιφάνεια συσκευασίας πολυπροπυλενίου εμβολιασμένη με μεθακρυλικό υδροξυαιθύλιο ως μονομερές. Οι συσκευασίες που δημιουργήθηκαν απέδειξαν ότι είχαν διαθέσιμες φαινολικές ομάδες σύμφωνα με την μέθοδο Foline-Ciocalteu και αντιοξειδωτική δράση σύμφωνα με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Επιπλέον το πολυμερές με την επικάλυψη διαπιστώθηκε πως έχει καλή αντιοξειδωτική δράση στην οξείδωση ασκορβικού οξέος σε χυμό πορτοκαλιού.

Σε πείραμα που έγινε από τους Claudia contini et al., 2013 πραγματοποιήθηκε επίστρωση με ψεκάσμο μεθανολικού εκχυλίσματος εσπεριδοειδών σε συσκευασία PET μαγειρεμένου κρέατος γαλοπούλας και παρατηρήθηκε μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων, με τιμές TBARS, 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος, μικρότερες από τις μισές των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στις συσκευασίες ελέγχου μετά από 2 και 4 ημέρες αποθήκευσης .

Σε άλλο πείραμα των Camo et al., 2008 έγιναν επικαλύψεις σε φιλμ προπολυνένιου με εκχυλίσματα δενδρολίβανου (4%) και ρίγανης (4%), (Amexol) για την αποθήκευση νωπών μπριζολών αρνιού στους  $1\pm 1$  °C υπό φωτισμό. Επίσης εφαρμόστηκε εκχύλισμα δενδρολίβανου απευθείας στο κρέας με ψεκάσμο (2 mL αραιωμένου εκχ./ 50 g κρέατος). Τα αποτελέσματα στην οξείδωση του κρέατος με μέθοδο ανάλυσης TBARS έδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για το εκχύλισμα ρίγανης καθώς και για το ψεκάσμο με δενδρολίβανο διατηρώντας τη φρέσκια οσμή και το φρέσκο χρώμα για 5 ημέρες παραπάνω από το δείγμα αναφοράς.

Επιπρόσθετα σε φιλμ προπυλενίου οι Nerín et al., 2006 ακινητοποίησαν εκχύλισμα δενδρολίβανου (Amexol) και συσκέυασαν βόειο κρέας σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (70% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>) στους  $2\pm 1$  °C και σε φωτεινό περιβάλλον. Στις συνθήκες αυτές διαπίστωσαν μείωση στις τιμές TBARS στις 14 ημέρες από 2.74 mg μαλονικής αλδεΐδης/ kg κρέατος για το control σε 1.5 mg μαλονικής αλδεΐδης/ kg κρέατος για το δείγμα με το εκχύλισμα αποδεικνύοντας την ικανότητα προστασίας του εκχυλίσματος από την οξείδωση του κρέατος.

Σε άλλη έρευνα οι Pereira de Abreu et al., 2010 χρησιμοποίησαν φιλμ πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE) για να ενσωματώσουν εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα κριθαριού και να συσκευάσουν κατεψυγμένα φιλέτα σολωμού.

Το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις 7 και 24 mg /dm<sup>2</sup> και με μεθόδους όπως π-ανισιδίνη και αριθμό υπεροξειδίων ελέγχθηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύσει από την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα οποία είναι πλούσιο το ψάρι αυτό. Μετά από 12 μήνες επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 20 °C το δείγμα με το εκχύλισμα έδειξε να προστατεύει από την οξείδωση δίνοντας χαμηλότερες τιμές από το control στις μεθόδους που προαναφέρθηκαν με βέλτιστα αποτελέσματα για την συγκέντρωση 24 mg /dm<sup>2</sup>. Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος κριθαριού επιβεβαιώθηκε όταν οι Pereira de Abreu et al., 2011 επανέλαβαν το πείραμα με άλλο ψάρι εξίσου πλούσιο σε λιπαρά (Atlantic halibut) και διαπιστώσαν πως τα δείγματα με εκχύλισμα κριθαριού είχαν κατά 30-50% μικρότερη συγκέντρωση μηλονικής αλδεΐδης από το control δείγμα.

Σε πιο πρόσφατη έρευνα από τους Bolumar et al., 2016 συγκρίθηκαν τρία διαφορετικά συστήματα συσκευασίας: συσκευασία κενού, ενεργός συσκευασία με εκχύλισμα δενδρολίβανου και συσκευασία με φακελάκια απορροφητών οξυγόνου ως προς τη βέλτιστη προστασία κατά της οξείδωσης χοιρινού κρέατος που έχει υποστεί υπερυψηλή πίεση (700 MPa, 10 min, 5 °C). Το υλικό συσκευασίας ήταν από πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας, το εκχύλισμα είχε συγκέντρωση 0.45 mg/συσκευασία κρέατος ενώ τα φακελάκια απορρόφησης οξυγόνου ήταν εμπορίου με ικανότητα μείωσης του οξυγόνου σε 24 ώρες στο 0.1 %. Μετά την αποθήκευση τους στους 5 °C για 60 ημέρες βέλτιστα αποτελέσματα έδωσε η χρήση της συσκευασίας με την επικάλυψη εκχυλίσματος δενδρολίβανου επεκτείνοντας τον χρόνο ζωής του κρέατος κατά 25 ημέρες.

### 3.2.6. Αντιμικροβιακές συσκευασίες

Οι παραδοσιακές μέθοδοι προστασίας των τροφίμων από την μικροβιακή ανάπτυξη (θερμική επεξεργασία, κατάψυξη, ξήρανση, ακτινοβολία) δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε όλα τα συστήματα τροφίμων όπως τα νωπά κρέατα, και τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα. Έχουν λοιπόν επινοηθεί και εδραιωθεί κυρίως στις ΗΠΑ και στην Ιαπωνία και λιγότερο στην Ευρώπη συστήματα που στόχο έχουν την αποφυγή της ανάπτυξης και εξάπλωσης αλλοιώσεων από παθογενείς μικροοργανισμούς στα τρόφιμα, οι αντιμικροβιακές συσκευασίες. Οι τελευταίες

περιλαμβάνουν συστήματα όπως η προσθήκη φακελίσκου στη συσκευασία, η διασπορά βιοδραστικών παραγόντων, η κάλυψη με βιοδραστικούς παράγοντες στην επιφάνεια του υλικού συσκευασίας ή η χρήση μικροβιολογικών μακρομορίων με ιδιότητες σχηματισμού εδώδιμου φιλμ.

Όσον αφορά στην προσθήκη φακελίσκων στη συσκευασία οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε αέρια αντιδραστήρια όπως το διοξείδιο του άνθρακα, η αιθανόλη και το διοξείδιο του θείου (Han, 2005). Μεταξύ του οξυγόνου και του αζώτου που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα το διοξείδιο του άνθρακα είναι το μόνο αέριο με άμεση αντιμικροβιακή δράση μειώνοντας την φάση υστέρησης στην ανάπτυξη τόσο αερόβιων μικροοργανισμών όσο και μυκητών.

Για τις περισσότερες εφαρμογές στη διατήρηση του κρέατος και των πουλερικών είναι επιθυμητά υψηλά επίπεδα CO<sub>2</sub> (10-80%) τα οποία αναστέλλουν την επιφανειακή μικροβιακή ανάπτυξη (Vermeiren et al., 1999). Η δέσμευση οξυγόνου είναι χρήσιμη να δρά σε συμπληρωματικό επίπεδο με μία τροποποιημένη συσκευασία ώστε να απορροφά το υπολειμματικό οξυγόνο και να αποτρέπει φαινόμενα φωτοξείδωσης όπως μπορεί να συμβεί στις φρυγανιές που καλύπτονται από διάφανη συσκευασία.

Η ενσωμάτωση ουσιών στο ίδιο το πολυμερές της συσκευασίας είναι επίσης μία εμπορική πρακτική με μεγάλη αποδοχή. Ουσίες όπως οργανικά οξέα ή άργυρος θεωρούνται ισχυρά αντιμικροβιακά. Τα αντιμικροβιακά προϊόντα μπορούν να προστεθούν σε χύδην πολυμερή, να ενσωματωθούν στις ίνες κατά τη διάρκεια της νηματοποίησης και να αναμιχθούν σε μια ποικιλία επικαλύψεων. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η ουσία Triclosan (2,4,40-τριχλωρο-20-υδροξυδιφαινυλαιθέρας) που για περισσότερα από 20 χρόνια, αυτή η χημική ένωση έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής, όπως οδοντόκρεμα, στοματικό διάλυμα, αποσμητικό και σαπούνι, καθώς και αντιβακτηριακό παράγοντα στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Αυτή η προστασία επιτυγχάνεται συνδυάζοντας το Triclosan με οποιοδήποτε από τα κύρια πολυμερή (π.χ., PE, PP, PVC). Ο Cutter 1999 διερεύνησε την αποτελεσματικότητα της ουσίας triclosan ενσωματώνοντας 1500 ppm ουσίας σε πλαστική συσκευασία (TIP) κατά των μικροβίων που αναπτύσσονται στα φαγητά και ιδίως στο κρέας και διαπίστωσε πως αναστέλλει την ανάπτυξη



διαφόρων στελεχών των *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri* και *Staphylococcus aureus*.

Η επικάλυψη της συσκευασίας με αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι μια εναλλακτική πρακτική που έχει ως πλεονέκτημα την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών και διατηρήσεων στους δραστικούς παράγοντες. Για τα συστήματα που στηρίζονται στη διάχυση αντιμικροβιακών παραγόντων στο τρόφιμο ο ζεόλιθος υποκατεστημένος με άργυρο έχει αποτελεσματική δράση με την αποδέσμευση των επιφανειακών ατόμων αργύρου και την μεταφορά τους στο τρόφιμο. Αντίστοιχα για πτητικές ουσίες που απελευθερώνονται με εξάτμιση τα αιθέρια έλαια είναι μία φυσική εναλλακτική λύση. Οι Skandamis & Nychas 2001 δοκίμασαν επικάλυψη αιθέριου έλαιου ρίγανης σε συσκευασία κρέατος που δεν έρχεται σε άμεση επαφή με αυτό και διαπίστωσαν πως αυξάνεται η διάρκεια ζωής του αλλά όχι περισσότερο από το να γίνει επικάλυψη πάνω στο ίδιο το κρέας. Επιπλέον έρευνα από τους Nadarajah et al., το 2005 κατέδειξε το ισοθειοκυανικό αλλύλιο (AIT), το οποίο βρίσκεται σε σπόρους φυτών, ως μια μικροβιακά δραστική ένωση αφού κατάφερε να μειώσει το *E.coli* 0157:H7 σε βοδινό αλεσμένο κρέας κατά την αποθήκευση του σε ψύξη ή κατάψυξη.

### 3.2.7. Απορρόφηση και απελευθέρωση γεύσεων και οσμών

Η απορρόφηση ή η απελευθέρωση οσμών σε συσκευασίες βελτιώνει οργανοληπτικά το τρόφιμο αφού απορροφά έντονες δυσάρεστες οσμές ή απελευθερώνει έντονα ευχάριστα αρώματα. Η εμπορική χρήση απορρόφησης και απελευθέρωσης αρωματικών ουσιών έχει αμφισβητηθεί λόγω ανησυχιών που προκύπτουν από την ικανότητά τους να καλύπτουν τις φυσικές αντιδράσεις αλλοίωσης και έτσι να παραπλανούν τους καταναλωτές σχετικά με την κατάσταση των συσκευασμένων τροφίμων (Day, 2008). Ωστόσο ενεργές συσκευασίες με κατάλληλα υλικά απορρόφησης εμφανίστηκαν τον περασμένο αιώνα για να απορροφήσουν τις πτητικές αμίνες από την διάσπαση των μυών των ψαριών, καθώς και τις αλδεΐδες από την αυτοξείδωση των λιπών και των ελαίων. Πρόσφατα, οι López-de-Dicastillo et al. 2011 ανέφεραν τη χρήση νέων ταινιών συμπολυμερούς αιθυλικής βυναλκοόλης (EVOH) που περιέχουν β-κυκλοδεξτρίνες

για τη μείωση της παρουσίας αλδεϋδών σε συσκευασμένα τηγανητά αράπικα φυσίκια.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 4.1 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετασθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος από θρούμπι κατά την προσθήκη του ως επικάλυψη στη συσκευασία. Επίσης, να προσδιορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για την προστασία τσιπς πατάτας. Για τον σκοπό αυτό έγινε μία σειρά πειραμάτων που αναλύεται εκτενώς στη συνέχεια.

Αρχικά παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα από θρούμπι με οργανικούς διαλύτες για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών. Πριν την παραλαβή του αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος από το φυτό είχε πραγματοποιηθεί απόσταση, ώστε να απομακρυνθεί το αιθέριο έλαιο που χαρακτηρίζεται από έντονο άρωμα και θα άλλαζε τη γεύση και την οσμή του τροφίμου. Για να παραληφθούν και να εξετασθούν χωριστά κλάσματα των αντιοξειδωτικών συστατικών πλούσια σε άπολα φαινολικά συστατικά (φλαβονόλες, φλαβόνες) και πλούσια σε πολικότερα συστατικά (φαινολικά οξέα, γλυκοζίτες των φλαβονοειδών) έγιναν δύο διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα και αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η δράση τόσο του εκχυλίσματος με οξικό αιθυλεστέρα όσο και με αιθανόλη σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις το καθένα προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη σε κάθε εκχύλισμα και να συγκριθούν τα δύο εκχυλίσματα ως προς την προστασία έναντι της οξείδωσης.

Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε για το τηγάνισμα είναι το φοινικέλαιο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία παραγωγής chips. Οι πατάτες τηγανίστηκαν στους 180 °C και παρασκευάστηκαν 7 σειρές συσκευασμένων δειγμάτων chips. Συγκεκριμένα 3 σειρές αφορούσαν την επικάλυψη της συσκευασίας με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, Es 200, Es 300 mg GAE/L), 3 σειρές με το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcS 100, EAcS 200, EAcS 300 mg GAE/L) και μία σειρά χωρίς καμία επικάλυψη. Όλα τα δείγματα συσκευάστηκαν σε ατμοσφαιρικό αέρα και υπέστησαν πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης σε κλίβανο στους 70 °C για 54 ημέρες.

Για την μελέτη της πορείας της οξείδωσης λαμβάνονταν δείγματα στα οποία γίνονταν οι κατάλληλες αναλύσεις. Για τον προσδιορισμό των πρωτογενών

προϊόντων οξείδωσης των chips μετρήθηκε ο αριθμός υπεροξειδίων (PV). Για τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης μετρήθηκε ο αριθμός π-ανισιδίνης (p-AV), ενώ συμπληρωματικά έγιναν αναλύσεις σε αέριο χρωματογράφο για τον προσδιορισμό των πτητικών δευτερογενών προϊόντων. Επίσης, σε κάθε δειγματοληψία μετρήσαν η περιεκτικότητα του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας, για να αξιολογηθεί η συσχέτισή της με το στάδιο της οξείδωσης.

Στις αναλύσεις για την πορεία της οξείδωσης προστίθενται και εκείνες που αφορούν την πορεία των αντιοξειδωτικών ως προς τη συγκέντρωσή τους πάνω στην επιστρώση και στα ίδια τα chips. Για την πραγμάτωση αυτής της μέτρησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu σε κομμάτια συσκευασίας και στο λάδι των chips.

#### 4.2. Πρώτες ύλες -Αντιδραστήρια

Το έλαιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν το φοινικέλαιο. Η προμηθευτική εταιρεία ήταν η «ΑΓΡΟΤΙΚΗ Α.Ε.» ενώ οι πατάτες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προέλευση καλλιέργειας την Χαλκίδα.

Το αρωματικό φυτό που μελετήθηκε ήταν το θρούμπι. Παραλήφθηκε από τον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό Δήμητρα (ΕΛΓΟ).

Οι εκχυλίσσεις των αρωματικών φυτών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των διαλυτών οξικού αιθυλεστέρα (analytical reagent grade, Fisher Chemical, Loughborough, United Kingdom) και αιθανόλης (95°).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των δειγμάτων ήταν τα εξής: οξικό οξύ (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), χλωροφόρμιο (analytical reagent grade, Fisher Chemical, Loughborough, United Kingdom), ιωδιούχο κάλιο (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France) διαλυτό άμυλο (Panreac, Barcelona, Spain), θειοθειικό νάτριο (0.1N, for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), ισοοκτάνιο (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), π-ανισιδίνη (Panreac, Barcelona, Spain), εξάνιο (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany) και ανθρακικό νάτριο (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri).

### 4.3. Συσκευές

Για τις εκχυλίσεις των αρωματικών φυτών χρησιμοποιήθηκε συστοιχία συσκευών Soxhlet. Οι αποστάξεις των ελαιοδιαλυμάτων έγιναν με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστή κενού Büchi RE 111 με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi 461 (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland).

Τα πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης των chips πραγματοποιήθηκαν σε φούρνο κυκλοφορίας αέρα Thermawatt. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των διαλυτών των εκχυλισμάτων κατά τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος τους.

Οι μετρήσεις των απορροφήσεων όλων των δειγμάτων για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών συστατικών αλλά και για τον αριθμό της π-ανισιδίνης έγιναν με χρήση του φασματοφωτόμετρου HITACHI U29000.

Για τη μέτρηση της ποσότητας του O<sub>2</sub> που περιεχόταν εντός της συσκευασίας των δειγμάτων των chips χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Gas-analyser CheckMate 9900 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> PBI Dansensor (Ringsted, Denmark).

Το πάχος των τεμαχισμένων πατατών μετρήθηκε με ψηφιακό παχύμετρο από ανοξείδωτο χάλυβα D-74167 με οθόνη LCD (Neckarsulm, Germany). Κατά την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών από τα πατατάκια χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge.

Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων στην συσκευασία των chips έγινε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα HP 6890 GC (plus +) συζευγμένο με ανιχνευτή επιλεκτικής μάζας HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, California). Ενώ η αναγνώριση και η ποσοτικοποίηση των εκχυλισμάτων έγινε σε χρωματογράφο Varian212-LC και λογισμικό Varian Workstation (Varian Inc., Palo Alto, California).

### 4.4. Πειραματικές Τεχνικές

#### 4.4.1. Εκχύλιση από το αρωματικό φυτό θρούμπι

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Soxhlet με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Συγκεκριμένα πρώτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα και κατόπιν με αιθανόλη. Για το σκοπό αυτό ποσότητα του απελαιωμένου κονιοποιημένου αρωματικού φυτού ζυγίστηκε σε προζυγισμένη φύσιγγα πεπιεσμένου χαρτιού και τοποθετήθηκε στον εκχυλιστήρα της

συσκευής. Κατάλληλη ποσότητα διαλύτη προστέθηκε στη σφαιρική φιάλη της διάταξης, καθώς και στον εκχυλιστήρα. Η εκχύλιση διεξήχθη περίπου 6 ώρες, κάτω από ήπια αναρροή, μέχρις ότου ο παραλαμβανόμενος διαλύτης έγινε άχρωμος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη σφαιρική φιάλη και στον εκχυλιστήρα της συσκευής ο δεύτερος διαλύτης, η αιθανόλη και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία. Τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν συμπλήρωσαν τα ήδη υπάρχοντα στο εργαστήριο Τροφίμων και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

#### 4.4.2 Αντιριζική δραστηριότητα εκχυλισμάτων με μέθοδο DPPH

Η αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε έναντι του αντιδραστηρίου DPPH. Αρχικά κατασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας εκχυλισμάτων σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL. Στα διαλύματα αυτά πραγματοποιήθηκαν 3 αραιώσεις για τα δύο εκχυλίσματα: στην αιθανόλη 1:5, 2:5, 3:5 και στον οξικό αιθυλεστέρα 1:10, 2:10, 3:10 με μικροπιπέτα των 1000  $\mu$ L σε υποδοχείς Eppendorf. Κατόπιν παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH με την προσθήκη 0.0025 g DPPH σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και 50 mL μεθανόλης. Αφού ανακινήθηκε καλά το διάλυμα έγινε πλήρωση της φιάλης με 50 mL. Τέλος σε δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη 100 $\mu$ l διαλύματος των εκχυλισμάτων και 3.9 mL δ/τος DPPH και γίνεται φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της αντίδρασης στα 515 nm μέχρις ότου η παρατηρούμενη μείωση της απορρόφησης σταματήσει να δημιουργεί πλατώ.

#### 4.4.3 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος

Μεταφέρθηκαν 5 mL εκχυλίσματος σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης. Για το κάθε εκχύλισμα η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 70 °C, μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης τους. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα ώστε να ψυχθούν και ακολούθησε η ζύγισή τους. Από τη διαφορά των ζυγίσεων του κάθε φιαλιδίου υπολογίστηκε η περιεκτικότητα κάθε εκχυλίσματος σε στερεά συστατικά (g/L), καθώς και η % κατά βάρος σύσταση κάθε φυτού σε εκχυλισθέντα κλάσματα.

#### 4.4.4 Δοκιμή εκχυλισμάτων για την προστασία chips από την οξείδωση

##### 4.4.4.1 Επεξεργασία πατάτας

Αρχικά, οι πατάτες που παραλήφθηκαν καθαρίστηκαν, πλύθηκαν με νερό και κόπηκαν με οικιακή συσκευή σε λεπτές φέτες πάχους 1.1–1.3 cm. Για τη μέτρηση του πάχους χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό παχύμετρο. Οι τεμαχισμένες πατάτες τοποθετήθηκαν σε λεκάνη με νερό μέχρι να τηγανιστούν για αποφυγή αμαύρωσης. Στη συνέχεια απλώνονταν ανά ποσότητες σε διηθητικό χαρτί ώστε να στραγγίσουν και τηγανίζονταν σε οικιακή φριτζά. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν ως ότου τηγανιστεί η απαιτούμενη ποσότητα.

##### 4.4.4.2. Τηγάνισμα

Πραγματοποιήθηκαν 64 τηγανιές ώστε να καλυφθούν όλες οι σειρές συσκευασιών από περίπου 25 g chips. Σε κάθε τηγανιά χρησιμοποιήθηκαν 167 g ωπής πατάτας. Το κάθε τηγάνισμα διήρκεσε περίπου 1 min στους 180 °C, ενώ ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών τηγανισμάτων ήταν επίσης 1 min. Μετά το τηγάνισμα, όλα τα chips τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί, ώστε να στραγγίσουν από το έλαιο (εικόνα 4.4.4.2a). Κατόπιν, τοποθετήθηκαν σε μια μεγάλη συσκευασία, αναμείχθηκαν ώστε να ομογενοποιηθούν και παρέμειναν σε αυτή μέχρι να ολοκληρωθεί η περαιτέρω επεξεργασία τους. Κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος λήφθηκαν 3 δείγματα ελαίου: στην έναρξη, στη μέση του αριθμού των τηγανιών και στη λήξη (εικόνα 4.4.4.2b).



**Εικόνα 4.4.4.2a : Πατατάκια μετά το τηγάνισμα σε διηθητικό χαρτί για την απορρόφηση του ελαίου**



**Εικόνα 4.4.4.2b: Μορφή φοινικελαίου στην αρχή, τη μέση και το τέλος του τηγανίσματος**

#### 4.4.4.3. Επίστρωση εκχυλισμάτων σε υλικό συσκευασίας (ενεργός συσκευασία)

Τα chips που βρίσκονταν αποθηκευμένα σε συνθήκες περιβάλλοντος συσκευάζονται σε υλικό το οποίο έχει πρώτα επιστρωθεί με εκχύλισμα της *Satureja thymbra*. Παρασκευάστηκαν 6 σειρές επιστρώσεων και για την κάθε σειρά 8 συσκευασίες. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις επίστρωσης του αιθανολικού εκχυλίσματος (100, 200, 300 TP/m<sup>2</sup>) και άλλες 3 όμοιες του οξικού αιθυλεστέρα. Από την μέτρηση των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα προέκυψαν συγκεντρώσεις ολικών φαινολών (TP εκφρασμένες σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE) 3506 mg GAE/L για το αιθανολικό και 1252 mg GAE/L για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα. Προκειμένου να επιτευχθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις των 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup> έγιναν αραιώσεις σε ογκομετρικές φιάλες των 250 mL. Από εκεί καταναλώνονταν 12 mL για την επίστρωση της συνολικής επιφάνειας της κάθε συσκευασίας με τη βοήθεια roll on. Αφού έμειναν ανοιχτές προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης και να είναι πλήρως στεγνές κόπηκαν σε διαστάσεις 21 cm x 42 cm.

#### 4.4.4.4. Κλείσιμο συσκευασίας - Αποθήκευση

Το πολυστρωματικό υλικό συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν OPP 20 μm/ink/adhesive/PET MET 12 μm/adhesive//PE 75 μm STC. Η κάθε συσκευασία είχε διαστάσεις 42 cm x 21 cm. Για την κάθε σειρά δειγμάτων ζυγίζονταν 25 g τηγανισμένης πατάτας τα οποία κλείνονταν σε ατμοσφαιρικό αέρα με την βοήθεια



θερμοκολλητικής συσκευής. Ακολούθως αποθηκεύονταν σε φούρνο στους 70 °C. Τα δείγματα έμπαιναν στον φούρνο ανά 3 ή 4 ώστε την ημέρα ώστε η εξαγωγή τους να γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο και ο χρόνος ανάλυσής τους να είναι επαρκής. Έτσι πραγματοποιήθηκαν διπλές δειγματοληψίες σε όλα τα δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετρήθηκαν ο αριθμός υπεροξειδίων, η π-ανισιδίνη, η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά τόσο στο λάδι των chips όσο και στη συσκευασία καθώς και η περιεκτικότητα O<sub>2</sub> και πτητικών σε αυτή.

#### 4.4.5. Αναλυτικές μέθοδοι

##### 4.4.5.1. Προσδιορισμός σύστασης αέρα της συσκευασίας των chips πατάτας

Η περιεκτικότητα του O<sub>2</sub> εντός της κάθε συσκευασίας chips προσδιοριζόταν με τη συσκευή Gas Analyser CheckMate 9900 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> PBI Dansensor (Ringsted, Denmark).

##### 4.4.5.2. Διαδικασία ανάκτησης ελαίου από τα chips πατάτας

Η διαδικασία της ανάκτησης ξεκινούσε με την άλεση των chips σε οικιακό μίξερ για μερικά δευτερόλεπτα. Κατόπιν τα αλεσμένα chips μεταφέρονταν σε ποτήρι ζέσεως των 200 mL υψηλής φόρμας στο οποίο γινόταν προσθήκη 40 mL εξανίου. Ακολουθούσε ανάδευση 5 min και γινόταν διήθηση του εκχυλίσματος σε σφαιρικές φιάλες των 250 mL. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβανόταν συνολικά 3 φορές ενώ στο τέλος της τρίτης φοράς η σφαιρική φιάλη μεταφερόταν σε εξατμιστή κενού και πραγματοποιούνταν εξάτμιση σε θερμοκρασία 30 °C για 30 min προκειμένου να ληφθεί το έλαιο. Στο έλαιο γίνονταν μετρήσεις του αριθμού υπεροξειδίων, της π-ανισιδίνης καθώς και ανάκτηση των φαινολικών συστατικών τους για την μέτρηση τους.



**Εικόνα 4.4.5.2α: Αλεσμένα chips σε οικιακό μίξερ**



**Εικόνα 4.4.5.2b: Διαδικασία διήθησης του εκχυλίσματος εξανίου από το έλαιο των chips από δείγμα με επίστρωση εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα συγκέντρωσης 300 mg GAE/L.**

#### 4.4.5.3. Διαδικασία ανάκτησης φαινολικών συστατικών από την συσκευασία

Αφού αφαιρεθούν τα chips η συσκευασία χρησιμοποιείται για την μέτρηση των φαινολικών συστατικών που απέμειναν. Κόβονται δύο κομμάτια και από τις δύο πλευρές της διαστάσεων 10 cm x 10 cm. Ακολούθως, εκπλένονται με διαλύτη (αναλόγως αν είναι εκχύλισμα αιθανόλης ή οξικού αιθυλεστέρα) και το διάλυμα που είναι πλούσιο στα φαινολικά συστατικά συλλέγεται σε μικρό ποτήρι ζέσεως. Κατόπιν μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και συμπληρώνεται μέχρι την χαραγή με διαλύτη.

#### 4.4.5.4. Μέθοδος μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων

Ο προσδιορισμός του αριθμού των υπεροξειδίων έγινε σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο της AOCS, Cd 8-53. Κατάλληλη ποσότητα λιπαρής ύλης (περίπου 1 g) ζυγίζοταν σε κωνική φιάλη των 100 mL και καταγραφόταν η ακριβής της μάζα. Έπειτα, προστίθενται 20 mL διαλύματος οξικού οξέος-χλωροφορμίου σε αναλογία 3:2 v/v και στη συνέχεια 500 mL κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Αφού αναδεύονταν για 1 min, γινόταν προσθήκη 20 mL απιονισμένου νερού και 500 mL διαλύματος αμύλου (1% w/v). Ακολουθούσε τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0.01 N και καταγραφόταν ο όγκος του διαλύματος που χρειαζόταν. Πραγματοποιούταν τιτλοδότηση και σε ένα τυφλό δείγμα, έτσι ώστε να ελεγχθεί τυχόν ανάπτυξη αριθμών υπεροξειδίων στο διάλυμα του ιωδιούχου καλίου και στο μίγμα διαλυτών. Έπειτα από αυτή τη διαδικασία υπολογίζεται ο αριθμός των υπεροξειδίων (Peroxide Value, PV) σύμφωνα με τον τύπο :

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

Όπου:

- S - ο όγκος του Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του δείγματος ελαίου (mL)
- B - ο όγκος του Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος (mL)
- N - η κανονικότητα του διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- m - η μάζα του δείγματος (g)

#### 4.4.5.5. Μέθοδος μέτρησης π-ανισιδίνης

Για τη μέτρηση του αριθμού της π-ανισιδίνης χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη μέθοδος της AOCS, Cd 18-90. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL ζυγίζοταν ποσότητα ελαιοδιαλύματος ίση με 0.5 g, σημειώνοντας κάθε φορά την ακριβή μάζα της. Το κάθε δείγμα αραιωνόταν μέχρι την χαραγή με ισοοκτανίο, αναδευόταν για πλήρη ομογενοποίησή του και προσδιοριζόταν η απορρόφησή του στα 350 nm ( $A_b$ ). Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιούνταν διαλύτης ισοοκτανίου. Στη συνέχεια, παραλαμβάνονταν 5 mL από το κάθε αραιωμένο ελαιοδιάλυμα και εισάγονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου και ακολουθούσε προσθήκη 1 mL αντιδραστηρίου π-ανισιδίνης. Όμοια παρασκευαζόταν το τυφλό δείγμα, προσθέτοντας 1 mL διαλύματος π-ανισιδίνης σε 5 mL καθαρού ισοοκτανίου. Ακολουθούσε ανακίνηση όλων των δειγμάτων και αφού παρέμεναν στην ηρεμία για 10 min, μετρίοταν η απορρόφησή τους στα 350 nm ( $A_s$ ). Ο υπολογισμός του αριθμού της π-ανισιδίνης (p-anisidine value, p-AV) γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$p - AV = \frac{25 * (1,2A_s - A_b)}{m}$$

όπου :

- $A_s$  – η απορρόφηση του αραιωμένου ελαιοδιαλύματος μετά την αντίδρασή του με την π-ανισιδίνη
- $A_b$  – η αρχική απορρόφηση του αραιωμένου ελαιοδιαλύματος
- $m$  – η μάζα του ελαιοδιαλύματος (g)

#### 4.4.5.6. Αέρια χρωματογραφία (GC) για την ανάλυση των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης

Τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης αποτελούν πτητικές ενώσεις και έτσι ακολουθήθηκε η μέθοδος μικροεκχύλισης σε στερεά κατάσταση (Solid Phase MikroExtraction, SPME) και η ανάλυση του δείγματος σε αέριο χρωματογράφο. Στην τεχνική αυτή για την μεταφορά των πτητικών συστατικών χρησιμοποιείται μια ίνα από πορώδη τηγμένη síλικά και διαβρεγμένη με σιλικονούχο έλαιο ή πολυμερές. Στην διαδικασία αυτή το δείγμα συσκευασίας με chips τοποθετείται σε φούρνο 40

°C προκειμένου να αυξηθεί η προσροφητική ικανότητα της ίνας και αφού γίνει μικρή οπή με απλή σύριγγα εμπορίου τοποθετείται απευθείας η σύριγγα με την ίνα όπου παραμένει για μισή ώρα πιασμένη σε ράβδο στήριξης. Μετά το χρονικό διάστημα αυτό η ίνα φέρεται στον αέριο χρωματογράφο. Η ανάλυση εκτελείται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα HP 6890 GC (plus +) συζευγμένο με ανιχνευτή επιλεκτικής μάζας HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, California). Η θερμοκρασία του φούρνου αυξήθηκε από 50 °C ως 100 °C με ρυθμό 10 °C/min και από τους 100 °C ως τους 220 °C με ρυθμό 15° C/min και διατηρήθηκε για 7 min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ροή 1 mL/min με θερμοκρασία εισόδου 220 °C και διάσπαση 20:1. Το εύρος μάζας ήταν 40-400 και οι ενώσεις εντοπίστηκαν με την σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με πρότυπα φάσματα μαζών (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg; Wiley, New York).

#### 4.4.5.7. Μέτρηση των φαινολικών συστατικών (Folin and Ciocalteu method)

Πρόκειται για μία φωτομετρική μέθοδο που μετρά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος. Η μέθοδος αυτή ξεκινά με την προσθήκη 7.9 mL απιονισμένου νερού σε δοκιμαστικούς σωλήνες για κάθε δείγμα και 8 mL για το πρότυπο-τυφλό δείγμα. Κατόπιν προστίθενται 100  $\mu$ L δείγματος. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη 500  $\mu$ L αντιδρατηρίου Folin-Ciocalteu, ενός διαλύματος σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφο-βολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατόπιν το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς σε Vortex και αφού προστεθούν 500  $\mu$ L  $Na_2CO_3$  ώστε να ρυθμιστεί η αλκαλικότητα αναδεύονται έντονα και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 40 °C. Μετά την παραμονή τους μετρούνται σε φωτόμετρο στα 765 nm όπου και παρουσιάζεται μέγιστη απορρόφηση του κυανού χρώματος των οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ), προϊόντων αναγωγής του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Η απορρόφηση των δειγμάτων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Εκχυλίσματα από το φυτό θρούμπι (*Satureja Thymbra*)

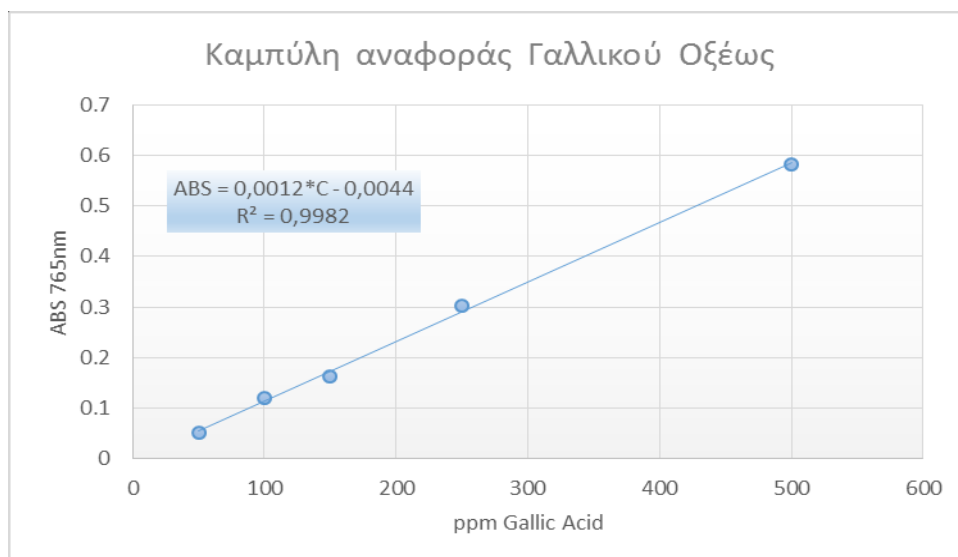
#### 5.1.1. Απόδοση εκχύλισης φαινολικό περιεχόμενο και αντιριζική δράση εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα από το αρωματικό φυτό θρούμπι (*Satureja Thymbra*) αναλύθηκαν ως προς το στερεό υπόλειμμα, για να προσδιοριστεί η απόδοση της εκχύλισης ως προς τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες, την αιθανόλη και τον οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.1.a. Το εκχύλισμα αιθανόλης (Es) είναι πλουσιότερο σε εκχυλισθέντα συστατικά συγκρινόμενο με το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcS) γεγονός που σημαίνει ότι το υπό μελέτη αρωματικό φυτό είναι πλουσιότερο σε πολικές βιοδραστικές ενώσεις.

**Πίνακας 5.1.1.a: Στερεό υπόλειμμα εκχυλίσματος αιθανόλης (Es) και οξικού αιθυλεστέρα (EAcS).**

Εκχύλισμα	Στερεό υπόλειμμα (mg/mL εκχυλίσματος ± SD)	Απόδοση εκχύλισης (mg ξηρού εκχ./g ξηρού φυτού ± SD)
Αιθανόλης (Es)	15.05 ± 0.45	176.77 ± 2.16
Οξικού αιθυλεστέρα (EAcS)	9.58 ± 0.18	53.38 ± 2.52

Στα εκχυλίσματα από το θρούμπι πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις για την εύρεση του συνόλου των φαινολικών συστατικών, που συσχετίζονται με την αντιοξειδωτική τους δράση, με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Με χρήση της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος όπως φαίνεται παρακάτω, υπολογίστηκε η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, η οποία εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/L εκχυλίσματος). Στον Πίνακα 5.1.1.b παρουσιάζονται η περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH των δύο εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν.



**Διάγραμμα 5.1.1:** Καμπύλη αναφοράς Γαλλικού οξέος ως προς τις μονάδες απορρόφησης ABS.

**Πίνακας 5.1.1.b:** Περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH του εκχυλίσματος αιθανόλης (Es) και του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs) από θρούμπι.

Εκχύλισμα	Ολικές φαινόλες, TP (mg GAE / g ξηρού εκχυλίσματος) ± SD	Αντιρριζική δράση (mg trolox / g ξηρού εκχυλίσματος) ± SD
Αιθανόλης (Es)	233 ± 4.6	586 ± 140
Οξικού αιθυλεστέρα (EAcs)	131 ± 5.3	57 ± 18

Ως γνωστόν η αιθανόλη αποτελεί έναν αρκετά πολικό διαλύτη (πιο πολικό από τον οξικό αιθυλεστέρα), ενώ η ύπαρξη ομάδων υδροξυλίου στις φαινόλες τους προσδίδει έντονη πολικότητα καθώς και μεγαλύτερη διαλυτότητα στην αιθανόλη αφού "τα όμοια διαλύουν όμοια". Αυτό επιβεβαιώνεται άλλωστε και από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.1.b καθόσον η συγκέντρωση ολικών φαινολών στο εκχύλισμα της αιθανόλης είναι σχεδόν η διπλάσια από αυτήν στον οξικό αιθυλεστέρα. Επιπλέον τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH έδειξαν πως το αιθανολικό εκχύλισμα έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από του οξικού αιθυλεστέρα, δηλαδή έχει περισσότερες υδροξυλομάδες ως δότες

υδρογόνου και πιθανώς θα μπορούσε να ανάγει και τις ελεύθερες ρίζες αλκυλίου (R<sup>•</sup>) και υπεροξειδίου (ROO<sup>•</sup>).

### 5.1.2. Ανάλυση των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων

Στον Πίνακα 5.1.2 παρουσιάζονται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων όπως αυτά αναλύθηκαν κατά την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

**Πίνακας 5.1.2.: Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των δραστικών συστατικών του εκχυλίσματος αιθανόλης (Es) και του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs) από θρούμπι.**

Βιοδραστικά συστατικά	EAcs			Es		
	C <sub>εκχυλίσματος</sub> (mg/L)	mg/kg ξηρού εκχυλίσματος	C <sub>φυτού εβ</sub> (mg/kg)	C <sub>εκχυλίσματος</sub> (mg/L)	mg/kg ξηρού εκχυλίσματος	C <sub>φυτού εβ</sub> (mg/kg)
	Φαινολικά οξέα					
rosmarinic acid	290±23	29317±496	1617±17	1033±72	68635±479	12133±710
salvianolic acid A <sup>a</sup>	2±1	200±37	11±2	36±3	2370±162	419±35
lithospermic acid <sup>a</sup>	-	-	-	12±2	811±56	143±69
caffeic acid <sup>a</sup>	-	-	-	8±3	532±85	94±26
Total phenolic acids <sup>a</sup>	304±12	30717±245	1694±89	1089±31	72384±396	12795±682
	Φαινολικά τερπένια					
Carvacrol	213±32	22276±812	1189±68	-	-	-
thymol <sup>b</sup>	170±10	17716±398	946±36	-	-	-
	Φλαβόνες-φλαβονόλες					
Quercetin	19±5	1945±113	104±3	-	-	-
apigenin <sup>c</sup>	122±57	12763±572	681±45	54±12	3582±478	633±85
apigenin glycoside <sup>c</sup>	17±7	1750±453	93±6	115±47	7650±519	1352±582
apigenin diglycoside <sup>c</sup>	-	-	-	105±9	6950±286	1228±101
luteolin <sup>c</sup>	14±1	1503±176	80±10	-	-	-
luteolin 7,4'-di-O-glucuronide <sup>c</sup>	-	-	-	155±36	10324±823	1825±559
6-OH luteolin 7,3'-dimethyl ether <sup>c</sup>	9±1	959±239	51±5	206±23	13676±512	2418±454
6-OH luteolin 7,3',4'-trimethyl ether <sup>c</sup>	8±2	875±148	47±4	81±11	5367±789	949±281
Total flavones/flavonols <sup>c</sup>	351±32	36663±419	1957±22	1420±67	94351±361	16679±579
	Φλαβανοειδή / dihydroflavonols					
Eriodictyol	52±17	5401±36	288±71	7±1	455±27	81±12
naringenin <sup>d</sup>	81±14	8464±86	452±21	-	-	-
Total flavanones/dihydroflavonols <sup>d</sup>	141±11	14668±104	783±36	7±1	455±27	81±12

<sup>a</sup> εκφρασμένα σε ισοδύναμα ροσμαρινικού οξέος, <sup>b</sup> εκφρασμένα σε ισοδύναμα καρβακρόλης, <sup>c</sup> εκφρασμένα σε ισοδύναμα κερκετίνης, <sup>d</sup> εκφρασμένα σε ισοδύναμα εριοδικτιόλης

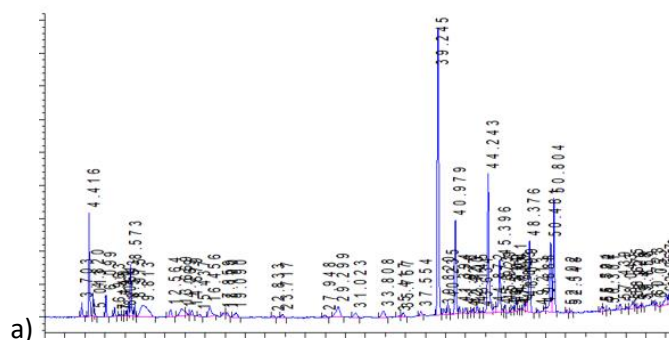


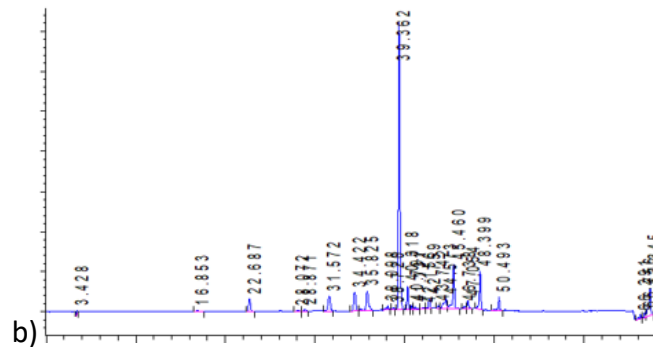
Παρατηρούμε ότι αναλόγως την πολικότητα του διαλύτη τα εκχυλίσματα περιέχουν είτε υψηλότερης είτε χαμηλότερης πολικότητας βιοδραστικά συστατικά. Συγκεκριμένα ο οξικός αιθυλεστέρας έχει ανακτήσει σε μεγαλύτερο ποσοστό μη πολικά βιοδραστικά συστατικά (φαινολικά τερπένια, φλαβονοειδή) με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βάρος ξηρού φυτού, σε καρβακρόλη (18%), θυμόλη (14,4%) και απιγενίνη (10%). Αντίστοιχα το εκχύλισμα της αιθανόλης περιέχει πιο πολικά συστατικά (φαινολικά οξέα, γλυκοζίτες φλαβονοειδών) και κυρίως ροσμαρινικό οξύ και με χαμηλότερες περιεκτικότητες 9-OH λουτεολίνη-7,3'-διμεθυλικός αιθέρας (8,1%) και γλυκοζίτης απιγενίνης (4,6%). Οι Tsimogianis et al. 2016 έχουν ταυτοποιήσει επίσης τα συστατικά αυτά σε αντίστοιχη έρευνα για τα εκχυλίσματα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα απειλαιωμένου φυτού *Satureja Thymbra*.

Το ροσμαρινικό οξύ, κύριο συστατικό του αιθανολικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε, εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Tsimogiannis et al. 2017). Επιπλέον έχει βρεθεί βιβλιογραφικά η αντιοξειδωτική δράση που προσφέρει το καφεϊκό οξύ και γενικότερα τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα που έχουν ταυτοποιηθεί στο εκχύλισμα αυτό (De Leonardis & Macciola 2003; Miron, Herrero, & Ibáñez 2013).

Αντιθέτως, το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, είναι φτωχότερο σε φαινολικά οξέα και πλουσιότερο σε καρβακρόλη και το ισομερές της, την θυμόλη. Τόσο η καρβακρόλη, όσο και η θυμόλη φαίνεται να έχουν ανταγωνιστική δράση με το ροσμαρινικό οξύ και τα φλαβονοειδή που ταυτοποιήθηκαν, όπως προκύπτει από μία μη δημοσιευμένη έρευνα του εργαστηρίου. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται η μικρότερη αντιοξειδωτική προστασία που προσφέρει το εκχύλισμα αυτό.

Στην εικόνα 5.1.2 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα από την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης των δύο εκχυλισμάτων.





**Εικόνα 5.1.2.: Χρωματογραφήματα (280 nm) εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (a) και αιθανόλης (b) του φυτού *Satureja Thymbra***

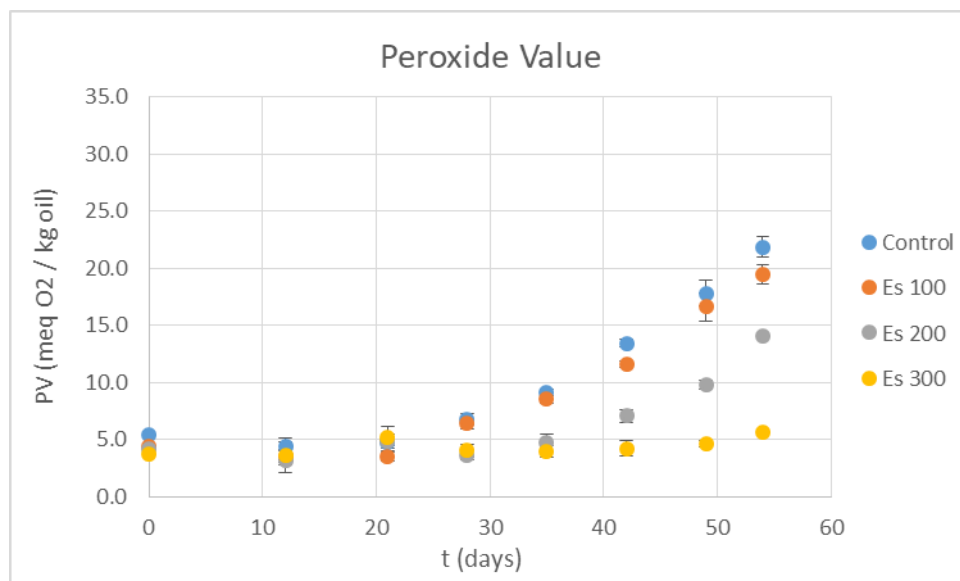
## 5.2. Μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων του φυτού *Satureja Thymbra* κατά την προσθήκη τους στην συσκευασία τηγανισμένων chips πατάτας

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δράσης των εκχυλισμάτων από θρούμπι κατά της οξειδωσης συσκευασμένων chips πατάτας. Η μελέτη αυτή περικλείει λοιπόν την συμπεριφορά και τον ρυθμό καταστροφής των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών σε συνθήκες οξειδωσης. Επιπλέον μελετάται η απορρόφηση του αντιοξειδωτικού από τα chips ως ένα δυνητικό όφελος για την υγεία των καταναλωτών.

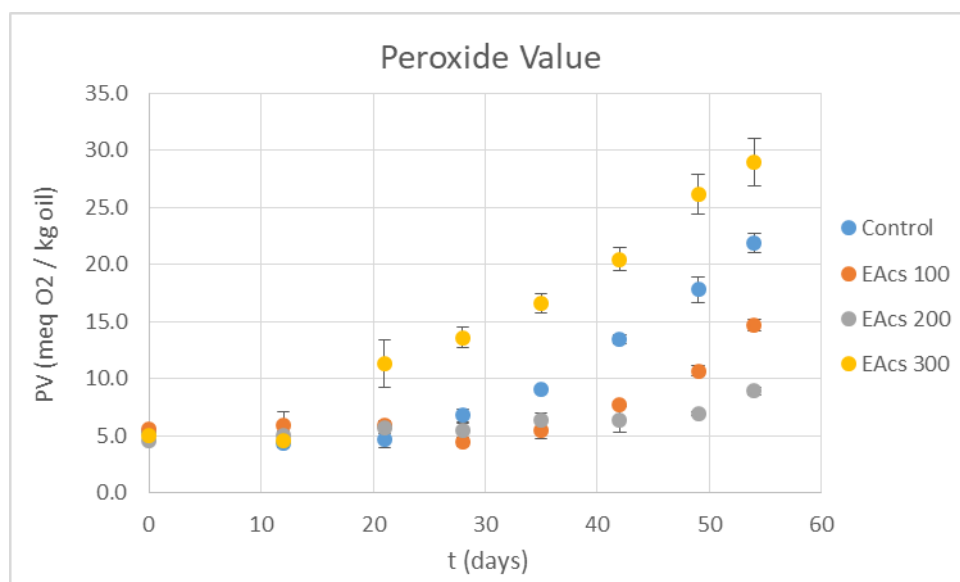
Ως μέσο τηγανίσματος επιλέχτηκε το φοινικέλαιο, του οποίου οι ιδιότητες το καθιστούν ένα κατάλληλο λάδι για την διαδικασία τηγανίσματος (Gunstone, 2002). Επίσης πρόκειται για ένα έλαιο το οποίο έχει πολύ μικρές περιεκτικότητες σε αντιοξειδωτικά, 100 με 150 ppm σε τοκοφερόλη και 620 με 650 ppm σε τοκοτριενόλη γεγονός που δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα ως προς την επίδραση του αντιοξειδωτικού που προστίθεται στην πειραματική διαδικασία (Al-Saqer et al., 2004). Το περιεχόμενό του στα κύρια λιπαρά οξέα ήταν με βάση την εταιρεία από την οποία παραλήφθηκε το ακόλουθο: ελαϊκό (42,99%), παλμιτικό (41,39%), λινολεϊκό (10,38%), στεατικό (4,10%), μυριστικό (1,03%), αραχιδικό (0,34%), παλμιτελαϊκό (0,20%) και λινολενικό (0,18%).

Η μέτρηση για τα πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης των chips έγινε με τον αριθμό υπεροξειδίων (PV) του ελαίου που έχει απορροφηθεί στο προϊόν. Από τα αποτελέσματα της μεθόδου του αριθμού υπεροξειδίων προκύπτουν τα

διαγράμματα 5.2.1 και 5.2.2, για προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος και οξικού αιθυλεστέρα αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 5.2.1:** Επίδραση της προσθήκης αιθανολικού εκχυλίσματος (Es) του φυτού *Satureja Thymbra* στην συσκευασία chips (σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) στην ανάπτυξη πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (PV) κατά την αποθήκευση τους στους 70 °C, για 54 ημέρες.



**Διάγραμμα 5.2.2:** Επίδραση της προσθήκης εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs) του φυτού *Satureja Thymbra* στην συσκευασία chips (σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) στην ανάπτυξη πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (PV) κατά την αποθήκευση τους στους 70 °C, για 54 ημέρες.

Στα διαγράμματα 5.2.1 και 5.2.2 είναι εμφανής αρχικά μία περίοδος επώασης και ύστερα περίοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 1.4 για την οξείδωση των ελαίων. Όσον αφορά στην περίοδο της επιταχυνόμενης ο αριθμός υπεροξειδίων των δειγμάτων αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με το χρόνο ικανοποιώντας το κινητικό μοντέλο :

$$C=k*t +C_0$$

Όπου

- C - η τιμή του δείκτη οξείδωσης μετά από χρόνο t επιταχυνόμενης οξείδωσης
- C<sub>0</sub> - αρχική τιμή του δείκτη οξείδωσης στην περίοδο επιταχυνόμενης οξείδωσης
- k - η σταθερά του ρυθμού επιταχυνόμενης οξείδωσης
- t - ο χρόνος επιταχυνόμενης οξείδωσης

Εκχύλισμα	Es			EAcs		
	100	200	300	100	200	300
mg GAE/m <sup>2</sup>						
%μείωση (-) –αύξηση (+) σταθεράς ρυθμού παραγωγής υπεροξειδίων	-7.67	-25.1	-78.4	-9.65	-61.84	+7.44
k (meq O <sub>2</sub> /kg oil*d)	0.4803	0.3896	0.1124	0.47	0.1985	0.5589
R <sup>2</sup>	0.9778	0.9274	0.8939	0.9606	0.8299	0.9872

**Πίνακας 5.2.1: Η ποσοστιαία μείωση ή αύξηση της σταθεράς του ρυθμού παραγωγής υπεροξειδίων, για αντίδραση 0<sup>ης</sup> τάξης κατά την επιταχυνόμενη οξείδωση, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς για τις συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup> των εκχυλισμάτων αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα.**

Η σταθερά του ρυθμού επιταχυνόμενης οξείδωσης (k), ο συντελεστής συσχέτισης (R<sup>2</sup>) της γραμμικής ευθείας και το ποσοστό άυξης ή μείωσης του της σταθεράς του ρυθμού παραγωγής υπεροξειδίων ως προς το δείγμα αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.1.

Από το διάγραμμα 5.2.1 παρατηρείται πως όλες οι συγκεντρώσεις εκχυλίσματος αιθανόλης παρεμπόδισαν την οξείδωση των chips, μειώνοντας τον ρυθμό αύξησης των υπεροξειδίων κατά την περίοδο της επιταχυνόμενης οξείδωσης του. Μάλιστα όσο αυξάνει η συγκέντρωση παρατηρούνται καλύτερα αποτελέσματα με την συγκέντρωση Es 300 mg GAE/m<sup>2</sup> να δίνει την βέλτιστη προστασία με μέγιστη περίοδο επώασης, περίπου 21 ημέρες παραπάνω από το control, και μείωση του ρυθμού παραγωγής υπεροξειδίων κατά 78.4% στο τέλος της περιόδου επιταχυνόμενης οξείδωσης. Η συγκέντρωση Es 200 mg GAE/m<sup>2</sup> παρουσίασε αύξηση του χρόνου επώασης κατά 7 ημέρες ενώ η Es 100 mg GAE/m<sup>2</sup> δεν παρουσίασε καμία αύξηση.

Η προσθήκη εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα φαίνεται να δίνει λίγο διαφορετικά αποτελέσματα. Οι συγκεντρώσεις 100 και 200 mg GAE/m<sup>2</sup> παρουσιάζουν μείωση του ρυθμού αύξησης των υπεροξειδίων σε σύγκριση με εκείνον των control δειγμάτων κατά 9.65% και 61.84%, στο τέλος της οξείδωσης και αύξηση χρόνου επώασης 15 και 21 ημέρες αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα (EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) εμφάνισε μείωση του χρόνου επώασης, σχεδόν 10 ημέρες, καθώς και αύξηση του ρυθμού παραγωγής των υπεροξειδίων (7.44%) και συνεπώς προοξειδωτική δράση. Έχει παρατηρηθεί από έρευνες πως η παρουσία χλωροφύλλης εμποδίζει την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων. Οι Wanasundara & Shahidi 1997 απέδειξαν πως το υδατικό και το αιθανολικό εκχύλισμα του πράσινου τσαγιού έχουν προοξειδωτική δράση κατά την προσθήκη τους σε εξευγενισμένο λάδι ψαριού (menhaden fish) σε συνθήκες αποθήκευσης στους 65 °C με πιθανή αιτία την παρουσία χλωροφύλλης. Αυτό βεβαιώθηκε αφού μετά την αφαίρεση της χλωροφύλλης σε στήλη με εξάνιο το εκχύλισμα παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Οι Endo et al. 1985 ανέφεραν επίσης ότι οι χλωροφύλλες και παράγωγα της χλωροφύλλης προάγουν την οξείδωση των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση της εργασίας, ο οξικός αιθυλεστέρας ως πιο άπολος από την αιθανόλη έχει παρασύρει κατά την εκχύλιση μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης. Στην εικόνα 5.2.1 φαίνονται τα ανακτημένα έλαια από τα chips δειγμάτων με επιστροφή οξικού αιθυλεστέρα και αναφοράς. Είναι εμφανές το

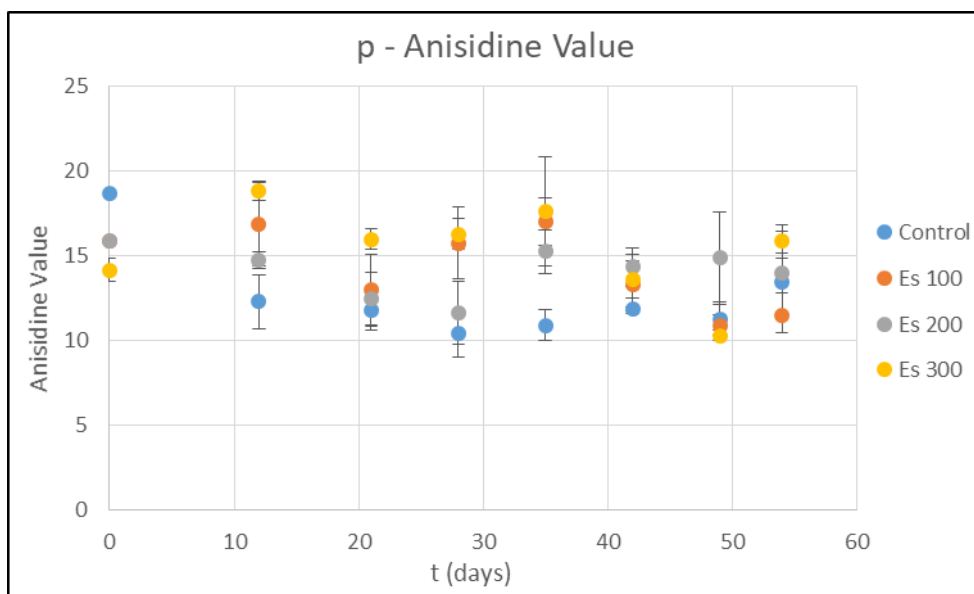
πράσινο χρώμα του ανακτημένου ελαίου των chips με επίστρωση οξικού αιθυλεστέρα που αποδεικνύει την ύπαρξη χλωροφυλλών. Είναι πιθανό λοιπόν η μεγάλη συγκέντρωση χλωροφύλλης να ευθύνεται για την επιτάχυνση της οξείδωσης κατά την επικάλυψη με συγκέντρωση EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup>.



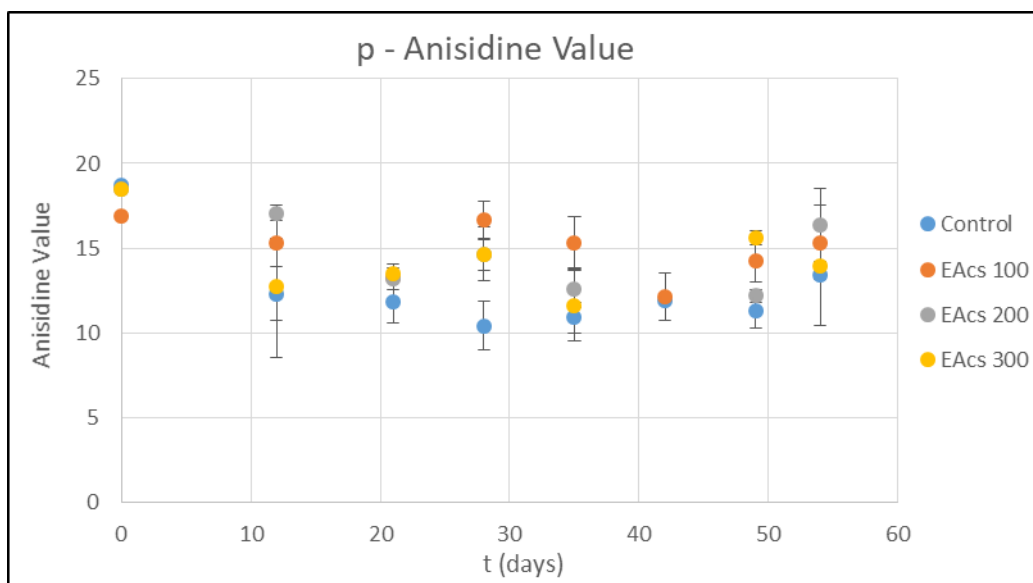
**Εικόνα 5.2.1 :** Δείγματα λαδιού chips πατάτας σε *ependorf*. Το σκούρο πράσινο αποτελεί δείγμα από συσκευασία με επίστρωση εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα ενώ το πιο ανοιχτό δείγματος αναφοράς.

Από άλλες έρευνες έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη αντιοξειδωτικών σε μεγάλες συγκεντρώσεις όχι μόνο δεν προστατεύει το τρόφιμο έναντι της οξείδωσης αλλά αντιθέτως επιταχύνει την οξείδωση αυτού. Οι Yen et al. 2003 παρακολούθησαν τις προοξειδωτικές ιδιότητες φλαβονοειδών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και ενώ η προσθήκη των φλαβονονών ναριγγενίνη και εσπεριδίνη σε εύρος συγκεντρώσεων 0-200 μΜ δεν εμφάνιζε παραγωγή υπεροξειδίων λιπιδίων (μέτρηση με την αντίδραση θειοβαρβιτουρικού οξέος) η προσθήκη των φλαβονολών κερκετίνη και μορίνη εμφάνισαν υπεροξειδία όταν προστέθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 20-200 Μμ και 125-200 Μμ αντίστοιχα. Επίσης οι Cillard et al. 1980 σε έρευνα τους διαπίστωσαν πως η προσθήκη α-τοκοφερόλης σε λινελαϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις πάνω από  $5 \cdot 10^{-3}$  mol α-τοκοφερόλης / mol λινελαϊκού οξέος ενίσχυε την αυτοοξείδωση του. Επομένως στην εν λόγω εργασία η συγκέντρωση EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup> αποτελεί υψηλή συγκέντρωση που έχει προοξειδωτική δράση.

Η ανάπτυξη των δευτερογενών προϊόντων της οξείδωσης μελετήθηκε με τη μέθοδο *p*-ανισιδίνης και της αέριας χρωματογραφίας (GC) για προσδιορισμό των επί μέρους αλδευδών που σχηματίζονται ως προϊόντα διάσπασης των πρωτογενών προϊόντων. Οι Tompkins & Perkins 1999 πραγματοποίησαν πείραμα τους σε τηγανισμένο σογιέλαιο και διαπίστωσαν μία συσχέτιση μεταξύ της *p*-ανισιδίνης και της ποσοτικοποίησης των πτητικών συστατικών (αλδευδών) από τον υπερκείμενο χώρο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων προσδιορισμού δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπως αυτά αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία.



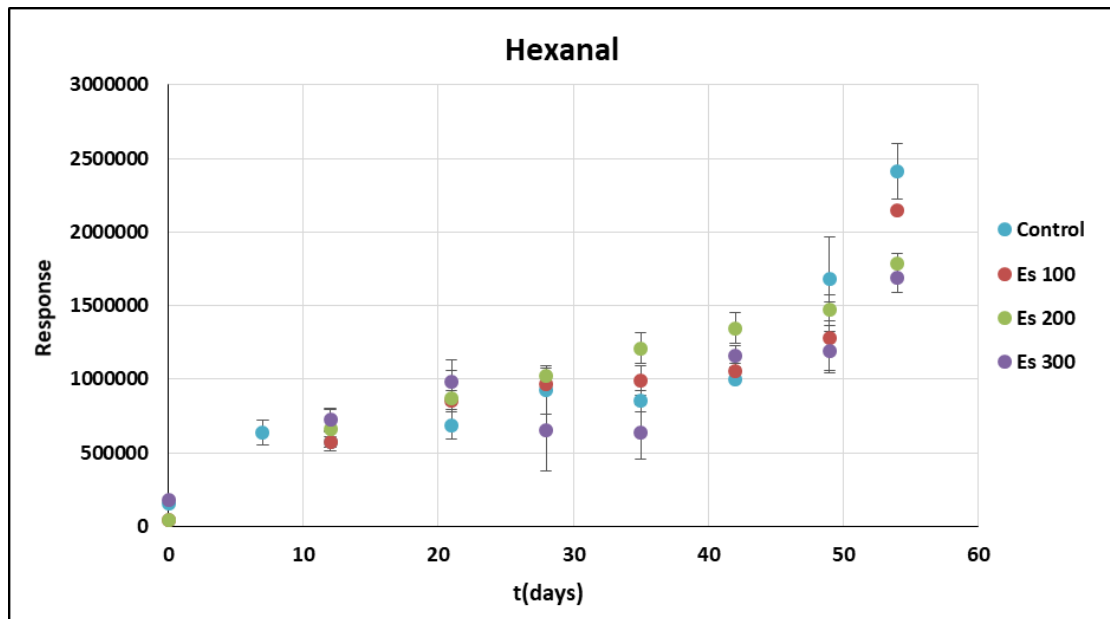
**Διάγραμμα 5.2.3: Μεταβολή του αριθμού *p*-ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου για τα αποθηκευμένα *chips* πατάτας στους 70 °C με επίστρωση συσκευασίας αιθανολικού εκχυλίσματος (*Es*) από θρούμπι (σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) και σε δείγμα αναφοράς.**



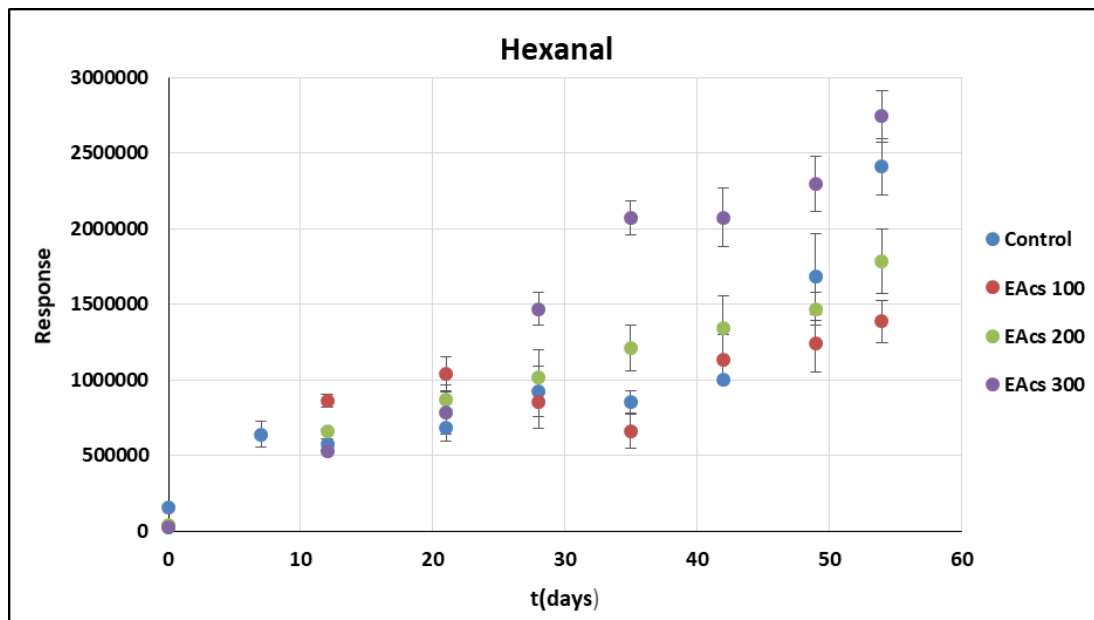
**Διάγραμμα 5.2.4: Μεταβολή του αριθμού π-ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου για τα αποθηκευμένα chips πατάτας στους 70 °C με επίστρωση συσκευασίας εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs) από θρούμπι (σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) και σε δείγμα αναφοράς.**

Σύμφωνα με τα διαγράμματα 5.2.3 και 5.2.4 οι τιμές του αριθμού π-ανισιδίνης κυμαίνονται μεταξύ 10.3 και 18.8 για όλα τα δείγματα, καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρείται δηλαδή ότι οι τιμές π-ανισιδίνης είναι σταθερές σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης και δεν υπάρχει σαφής επίδραση της προσθήκης των εκχυλισμάτων ενώ οι υψηλές αρχικές τιμές πιθανόν οφείλονται στην καταπόνηση του ελαίου κατά το τηγάνισμα. Η μέθοδος προσδιορισμού των πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία ποσοτικοποιεί τις πτητικές αλδεΐδες από τον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας. Ορισμένες από τις βασικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν είναι η εξανάλη, η επτανάλη, η οκτανάλη και η εννεανάλη. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα των συγκεντρώσεών τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης.

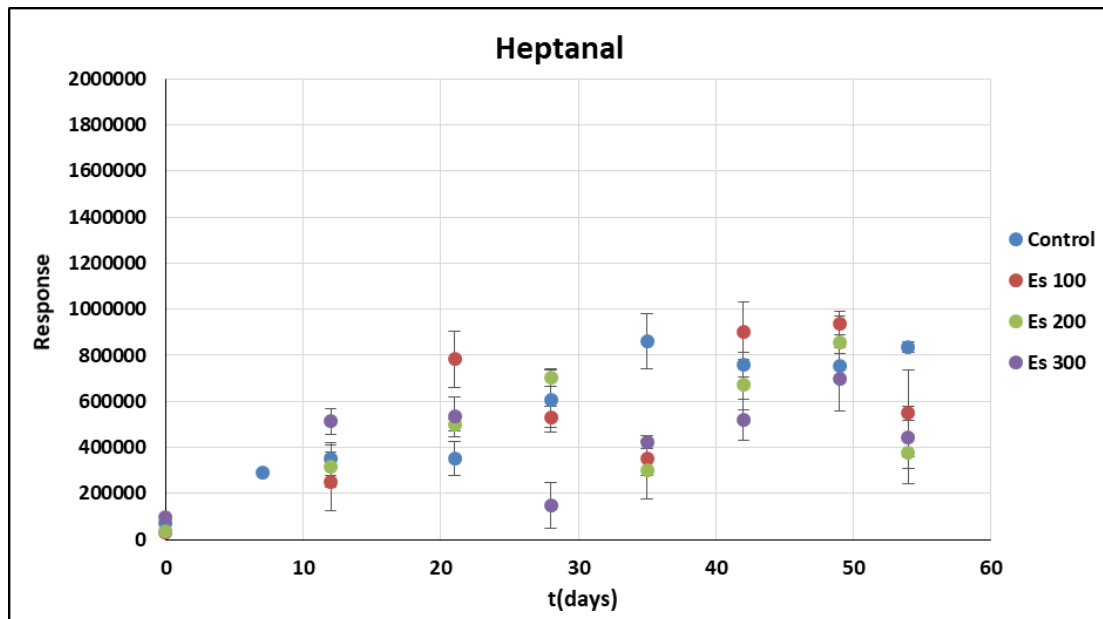




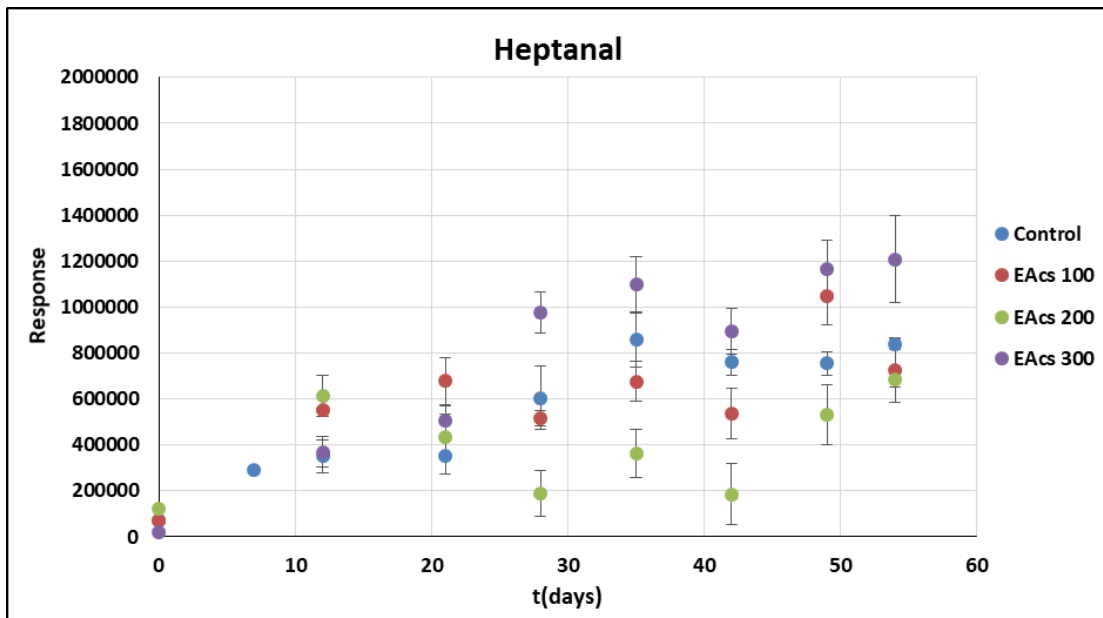
**Διάγραμμα 5.2.5:** Συγκέντρωση εξανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεϊ του χρόνου.



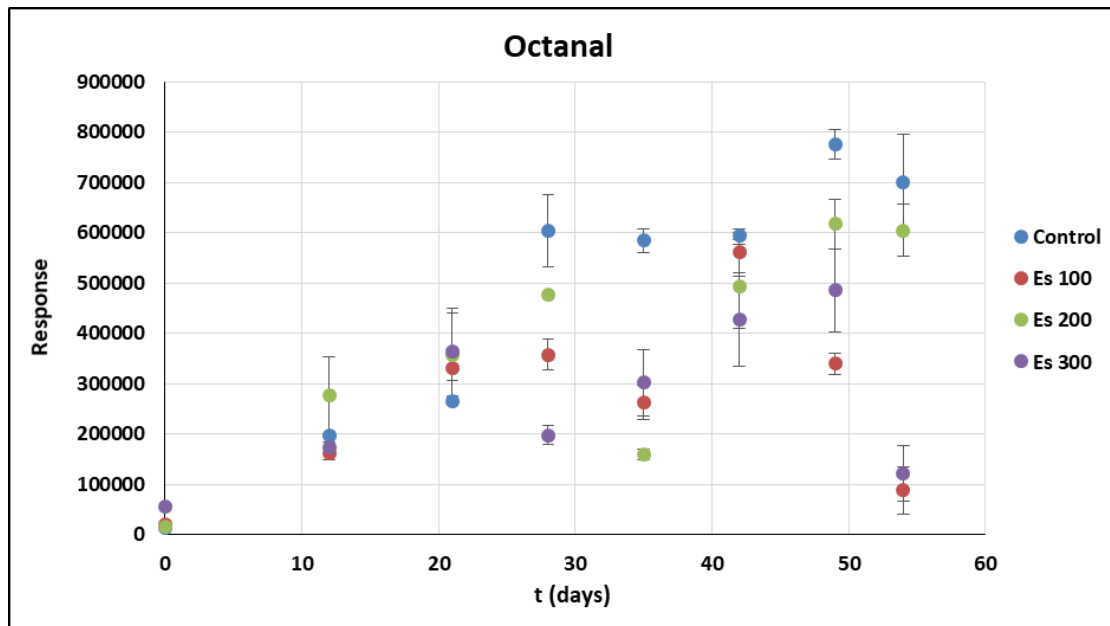
**Διάγραμμα 5.2.6:** Συγκέντρωση εξανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεϊ του χρόνου.



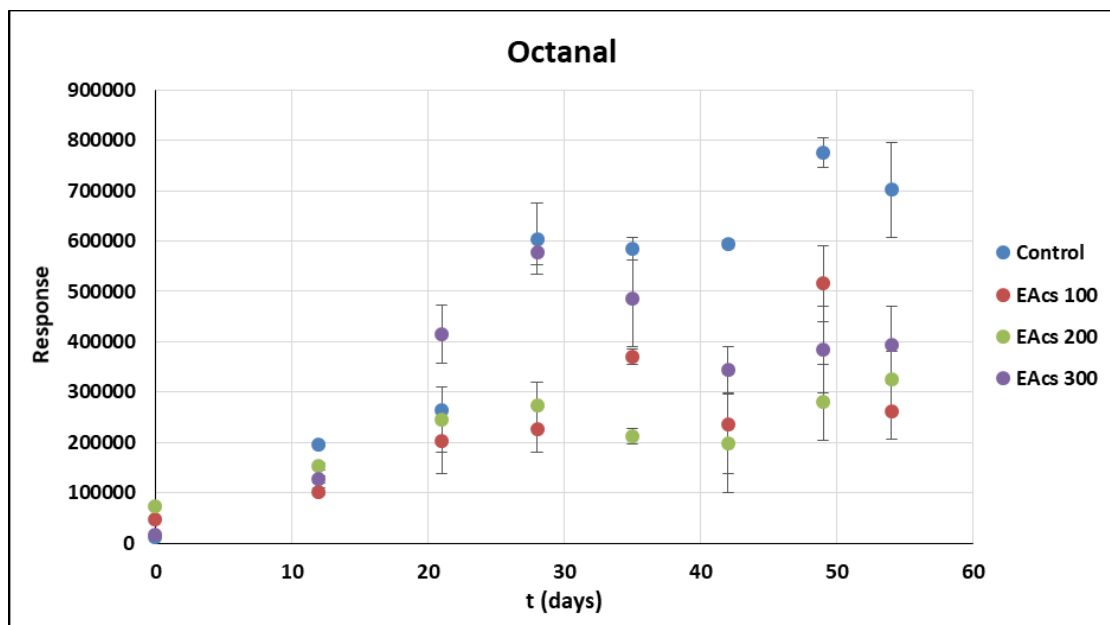
**Διάγραμμα 5.2.7:** Συγκέντρωση επτανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεως του χρόνου.



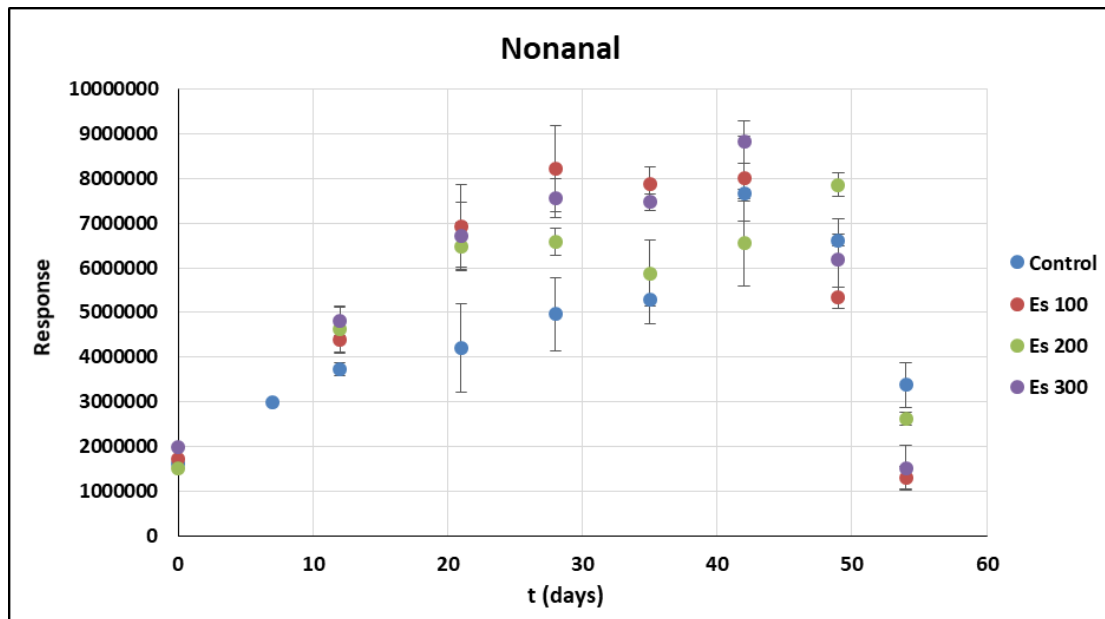
**Διάγραμμα 5.2.8:** Συγκέντρωση επτανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεως του χρόνου.



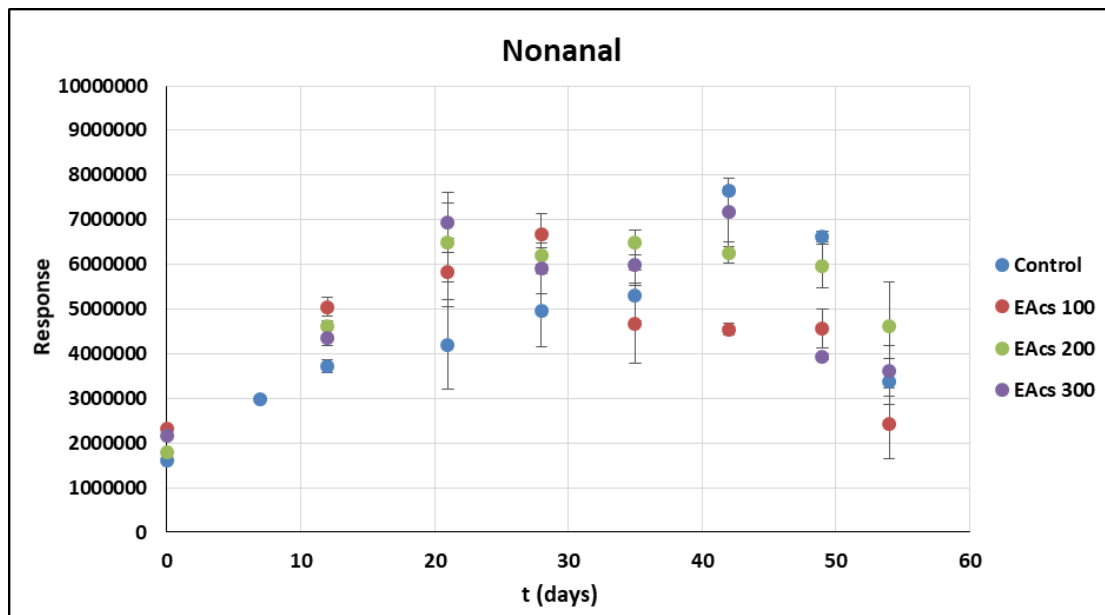
**Διάγραμμα 5.2.9:** Συγκέντρωση οκτανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των *chips*, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (*Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>*) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (*control*) συναρτήσει του χρόνου.



**Διάγραμμα 5.2.10:** Συγκέντρωση οκτανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των *chips*, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (*EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>*) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (*control*) συναρτήσει του χρόνου.



**Διάγραμμα 5.2.11:** Συγκέντρωση εννεανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεϊ του χρόνου.



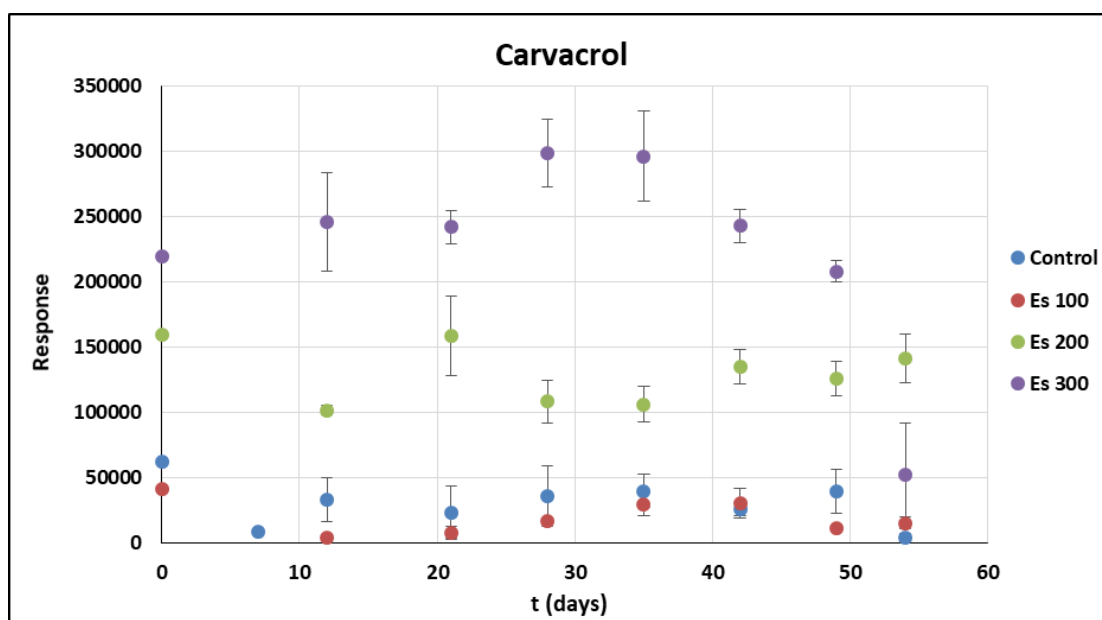
**Διάγραμμα 5.2.12:** Συγκέντρωση εννεανάλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεϊ του χρόνου.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται πως οι αλδεΐδες εμφανίζονται από τις πρώτες δειγματοληψίες γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως ένα μέρος των υπεροξειδίων διασπάται σχεδόν από την αρχή της οξείδωσης. Πιο συγκεκριμένα, από τα διαγράμματα 5.2.5 και 5.2.6 είναι εμφανής η υψηλότερη απόκριση της εξανάλης των δειγμάτων EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup> συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες σειρές δειγμάτων που μελετήθηκαν. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα διαγράμματα 5.2.1 και 5.2.2 όπου και τα σχηματιζόμενα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης για τα δείγματα EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup> είναι περισσότερα από εκείνα των control δειγμάτων. Αντίστοιχη εικόνα εμφανίζεται και στα διαγράμματα 5.2.7 και 5.2.8 της απόκρισης της επτανάλης. Στα διαγράμματα 5.2.9 και 5.2.10 εμφανίζεται η απόκριση της οκτανάλης. Παρατηρείται ότι όλες οι σειρές δειγμάτων που μελετήθηκαν είχαν χαμηλότερη απόκριση στην αλδεΐδη αυτή συμπεριλαμβανομένης και της συγκέντρωσης του EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup>. Αξιοσημείωτη είναι η υψηλή απόκριση της εννεανάλης των υπό μελέτη δειγμάτων συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες αλδεΐδες που προσδιορίστηκαν.

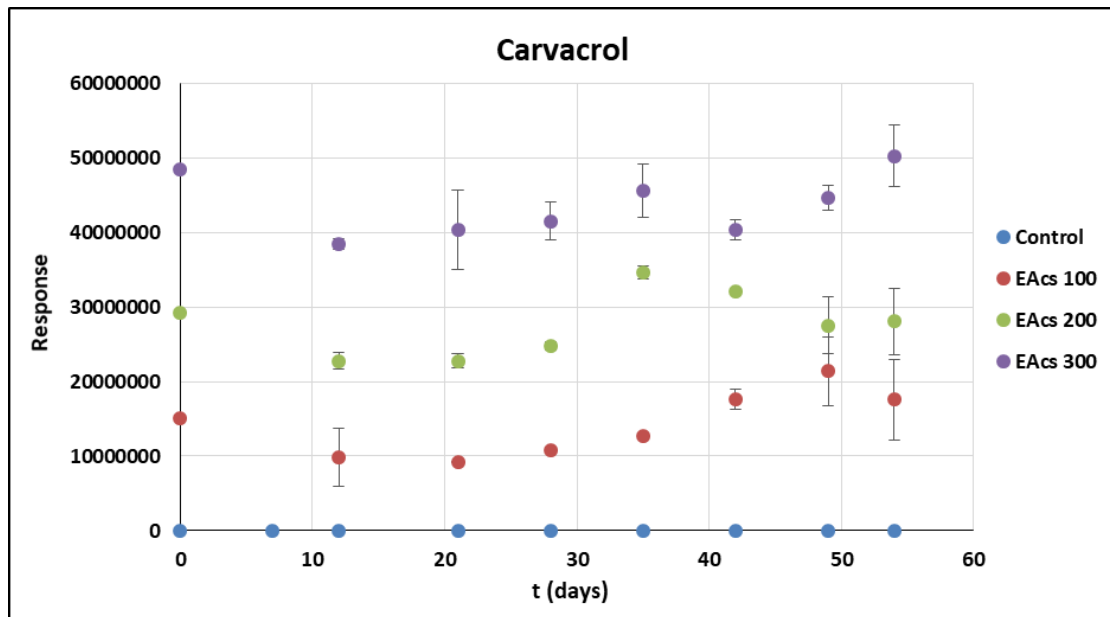
Το φοινικέλαιο στο παρόν πείραμα έχει υψηλότερη σύσταση σε ελαϊκό (42.99%), παλμιτικό (41.39%) και λινολεϊκό (10.38%) οξύ. Οι Choe et al., 2006 διαπίστωσαν πως η οξείδωση του ελαϊκού οξέος οδηγούσε στην παραγωγή οκτανάλης και εννεανάλης ενώ του λινολεϊκού οξέος σε εξανάλη και επτανάλη ανάμεσα σε άλλα δευτερογενή προϊόντα. Το παλμιτικό οξύ ως κορεσμένο οξειδώνεται πιο δύσκολα από τα ακόρεστα. Επιπλέον οι Romeas et al., 1999 κατά την φωτοκαταλυτική οξείδωση του παλμιτικού οξέος διαπίστωσαν με αέρια χρωματογραφία πως οι γραμμικές αλδεΐδες με άτομα άνθρακα C1-C6 αποτελούσαν το 22% ενώ C7-C15 μόλις το 1% των δευτερογενών προϊόντων τους. Επομένως η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε εννεανάλη και οκτανάλη δικαιολογείται από την υψηλή περιεκτικότητα στο ακόρεστο ελαϊκό οξύ που περιέχει το φοινικέλαιο που χρησιμοποιήθηκε.

Στην ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας εκτός από δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης ταυτοποιήθηκαν και ορισμένα πτητικά τερπενοειδή των εκχυλισμάτων όπως η καρβακρόλη και το καριοφυλλένιο των οποίων η απόκριση συναρτρήσει του χρόνου παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.2.13 - 5.2.16. Σε όλα τα διαγράμματα δεν παρουσιάζεται ουσιαστική μείωση αυτών κατά την πάροδο των

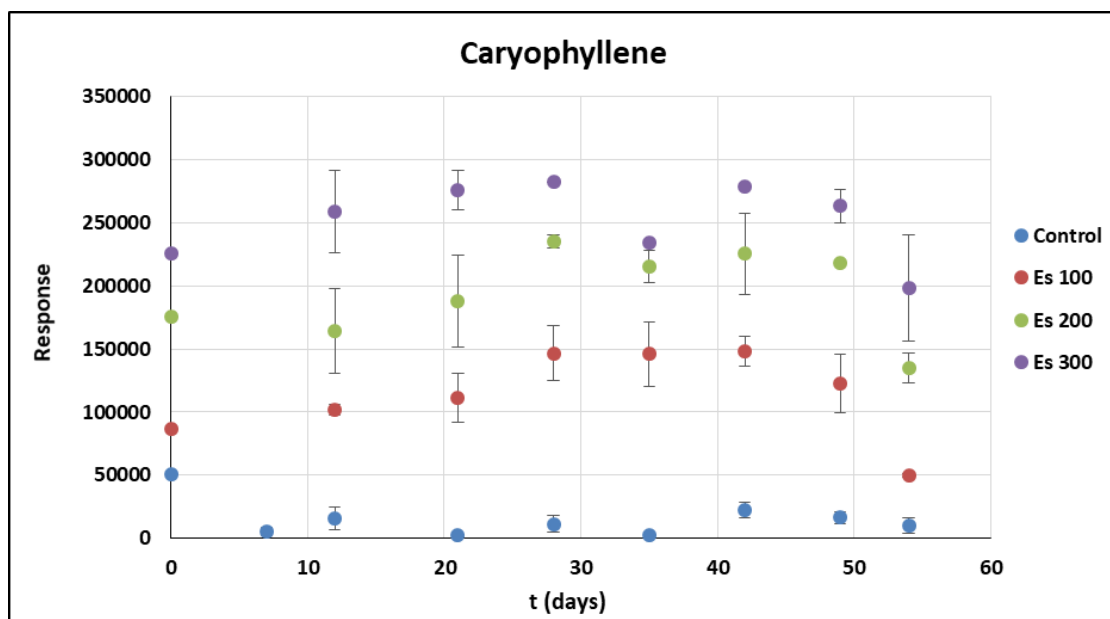
δειγματοληψιών. Οι Yanishlieva et al., 1999 διαπίστωσαν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση της καρβακρόλης τόσο στην οξείδωση χοιρινού λίπους όσο και στην οξείδωση ηλιελαίου κάτι που επιβεβαιώνεται και από το πείραμα αυτό αφού σύμφωνα με τα διαγράμματα 5.2.13-5.2.14 δεν παρατηρείται κατανάλωση της κατά την αποθήκευση του προϊόντος. Το καρυοφυλλένιο από την άλλη είναι ένα φυσικό δικυκλικό σισκετερπένιο με πολλές βιολογικές δραστηριότητες όπως αναλγητικές, αντιβακτηριακές, αντιβιοτικές, αντιφλεγμονώδεις και μυκητοκτόνες ιδιότητες αλλά όχι αντιοξειδωτικές (Kumar et al., 2010; Legault & Pichette 2007). Για τον λόγο αυτό δεν καταναλώθηκε κατά την οξείδωση του υπο μελέτη τροφίμου όπως γίνεται φανερό από τα διαγράμματα 5.2.15-5.2.16.



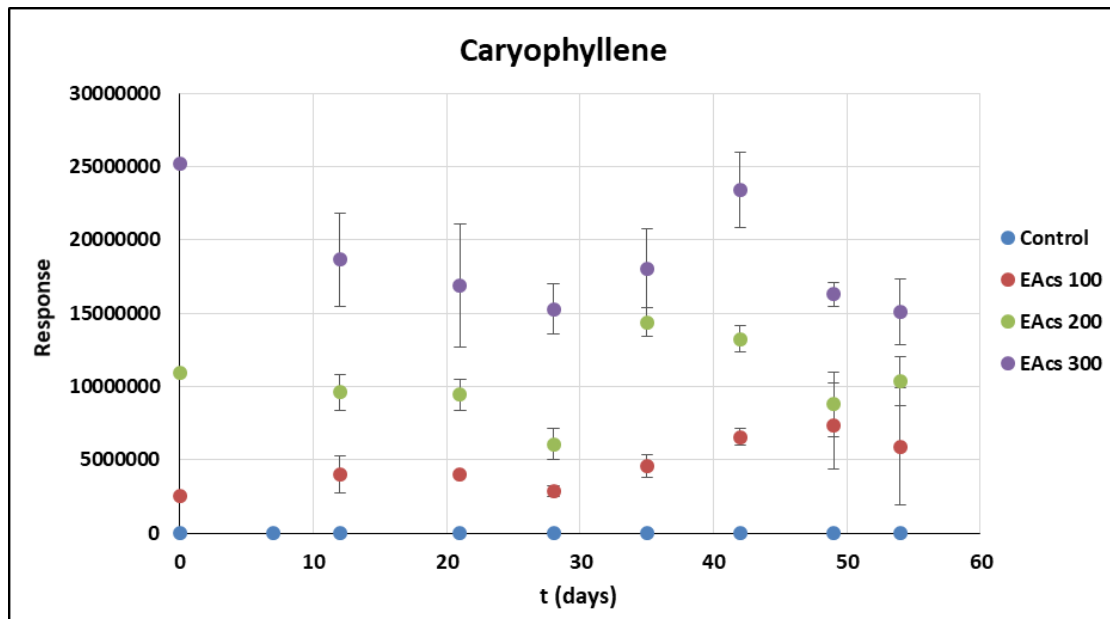
**Διάγραμμα 5.2.13:** Συγκέντρωση καρβακρόλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεσι του χρόνου.



**Διάγραμμα 5.2.14:** Συγκέντρωση καρβακρόλης στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσει του χρόνου.



**Διάγραμμα 5.2.15:** Συγκέντρωση καριοφυλλένιου στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα αιθανόλης (Es 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσει του χρόνου.

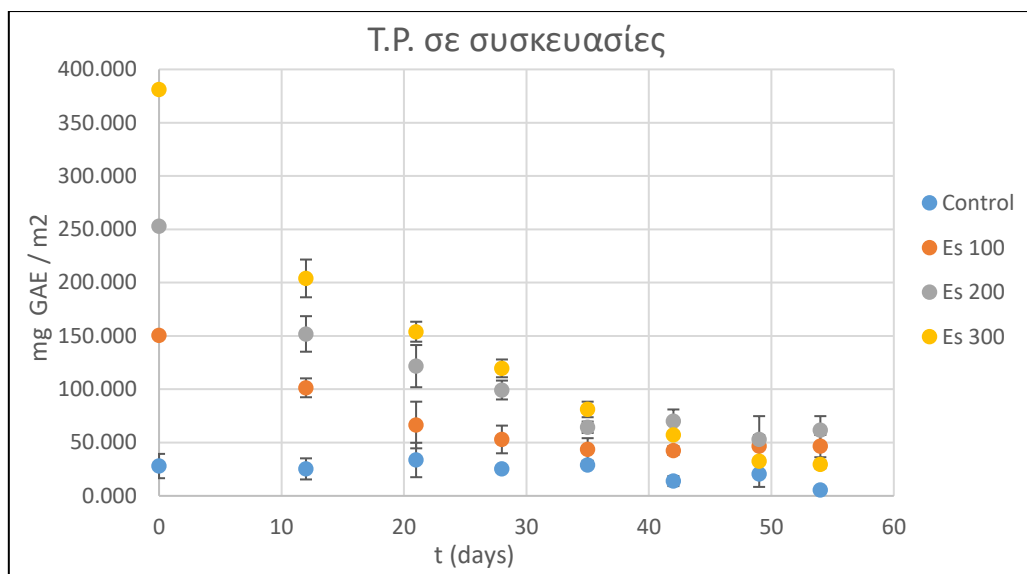


**Διάγραμμα 5.2.16:** Συγκέντρωση καριοφυλλένιου στον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία των chips, σε δείγματα που περιέχουν επίστρωση με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) του φυτού *Satureja Thymbra* και σε δείγμα που δεν περιέχει (control) συναρτήσεως του χρόνου.

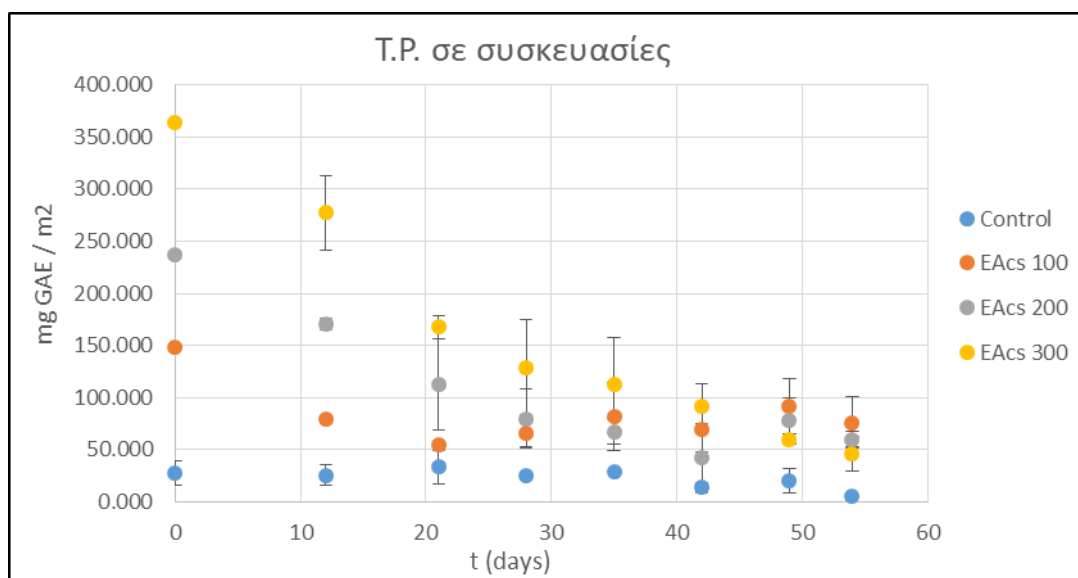
### 5.3 Μεταβολή της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών στη συσκευασία και στα chips

Η συμβολή των εκχυλισμάτων *Satureja Thymbra* στην προστασία από την οξείδωση των chips μπορεί έμμεσα να εκτιμηθεί από την μέτρηση των ολικών φαινολών (TP) που απομένουν στην συσκευασία για κάθε δειγματοληψία. Τα παρακάτω διαγράμματα αποτυπώνουν την μείωση των ολικών φαινολών τόσο λόγω καταστροφής τους από οξειδωτικά φαινόμενα, όσο και λόγω μεταφοράς τους στο υπό μελέτη τρόφιμο.





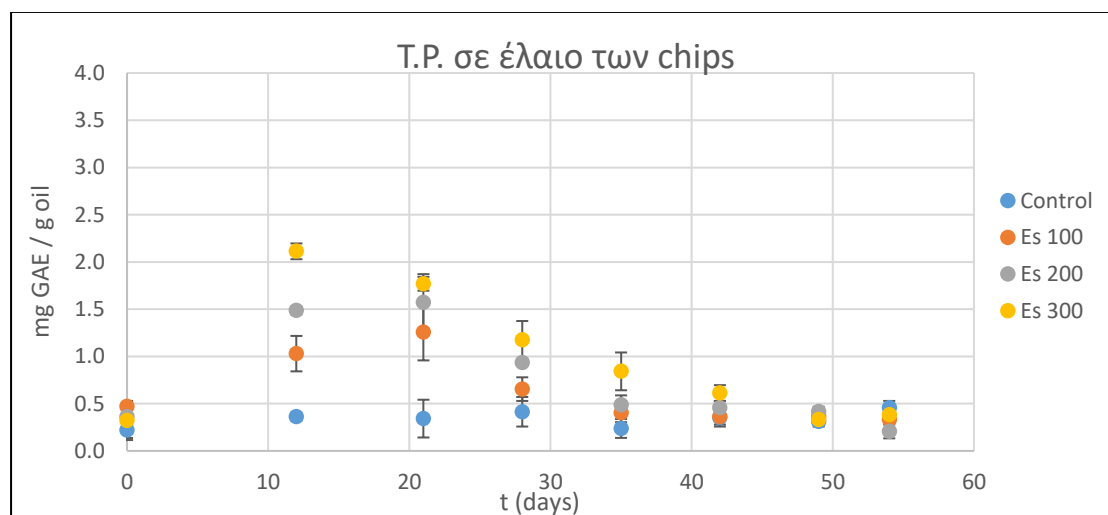
**Διάγραμμα 5.3.1:** Συγκέντρωση ολικών φαινολών ( $\text{mg GAE}/\text{m}^2$ ) εκχυλίσματος αιθανόλης (Es) στις επιστρώσεις των συσκευασιών chips συναρτήσει του χρόνου (days).



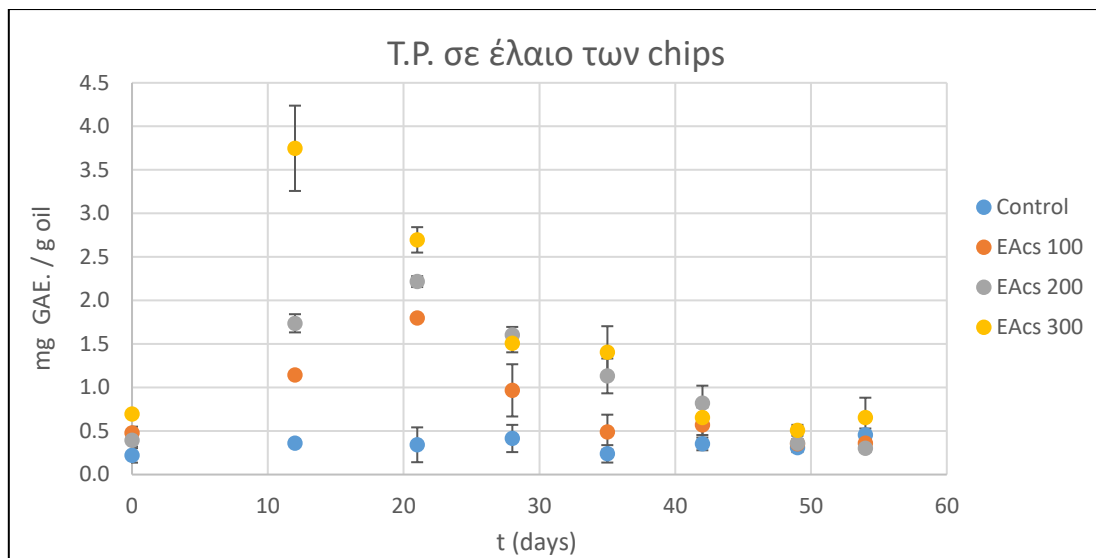
**Διάγραμμα 5.3.2:** Συγκέντρωση ολικών φαινολών ( $\text{mg GAE}/\text{m}^2$ ), εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs), στις επιστρώσεις των συσκευασιών chips συναρτήσει του χρόνου (days).

Παρατηρείται ταχεία μείωση των ολικών φαινολών της συσκευασίας στην αρχή του πειράματος, καταλήγοντας σε απομένουσες τιμές μικρότερες από 75000  $\text{mg GAE}/\text{m}^2$  για την επικάλυψη με εκχύλισμα Es, ανεξαρτήτως της αρχικής

συγκέντρωσης, μετά από 42 μέρες αποθήκευσης. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και για το εκχύλισμα EAcS. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να δράσουν με ποικίλους τρόπους κατά την προσθήκη τους σε συσκευασία με λιπαρό τρόφιμο. Ένας αφορά στην ικανότητα τους να δεσμεύουν το περιεχόμενο δραστικό οξυγόνο (oxygen scavengers) όπως αναφέρεται και στην ενότητα 3.2.1. Ένας δεύτερος τρόπος δράσης σχετίζεται με την ικανότητα τους να ανακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης της αυτοοξειδωσης των λιπαρών υλών με την προσφορά ενός υδρογόνου προς τις ελεύθερες ρίζες αλκυλίων και υπεροξειδίων που σχηματίζονται. Επομένως η μείωση των ολικών φαινολών, των εκχυλισμάτων, όπως αυτή καταγράφεται στα διαγράμματα 5.3.1 και 5.3.2 πιθανόν σχετίζεται με τις δράσεις αυτές. Προκειμένου να μεταφερθούν τα βιοδραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων στα chips ήταν απαραίτητη η επαφή της συσκευασίας με το τρόφιμο. Κρίθηκε επομένως σκόπιμο να μετρηθούν τα φαινολικά συστατικά που μεταφέρθηκαν από την συσκευασία στο ίδιο το τρόφιμο. Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται στα διαγράμματα 5.3.3, 5.3.4.



**Διάγραμμα 5.3.3:** Συγκέντρωση ολικών φαινολών που απορρόφησαν τα chips πατάτας, κατά την πάροδο της αποθήκευσης τους, από την επίστρωση της συσκευασίας με εκχύλισμα αιθανόλης (Es) του φυτού *Satureja Thymbra*.

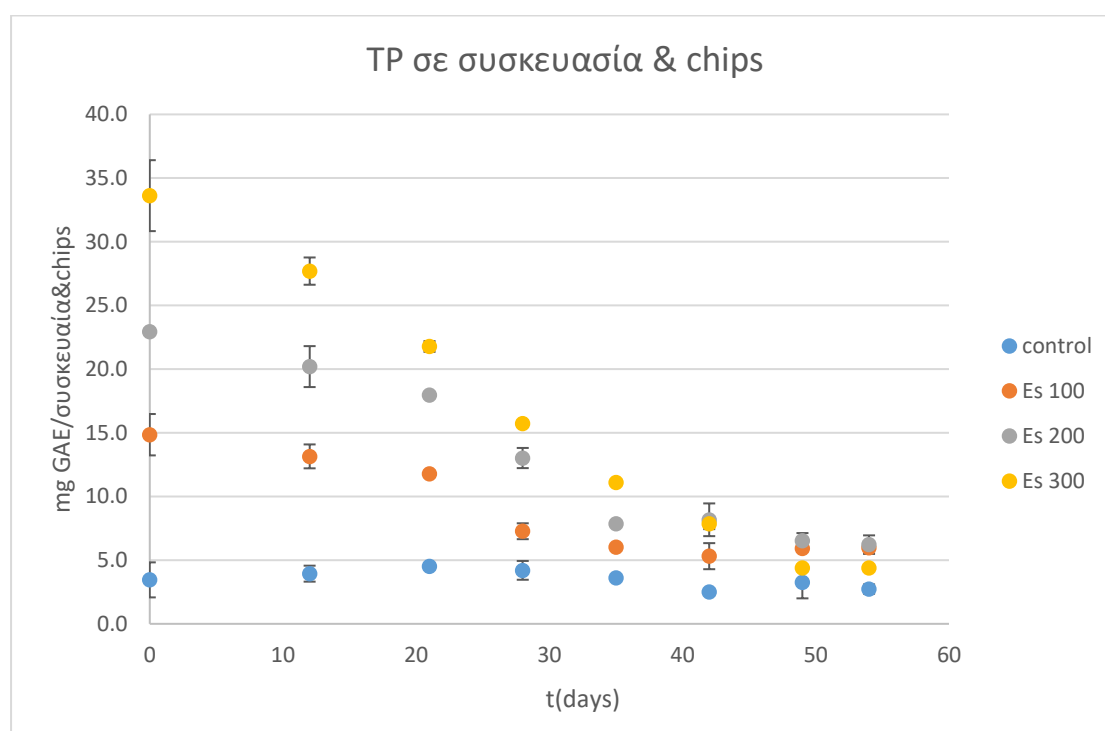


**Διάγραμμα 5.3.4:** Συγκέντρωση ολικών φαινολών που απορρόφησαν τα chips πατάτας, κατά την πάροδο της αποθήκευσής τους, από την επίστρωση της συσκευασίας με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcs) του φυτού *Satureja Thymbra*.

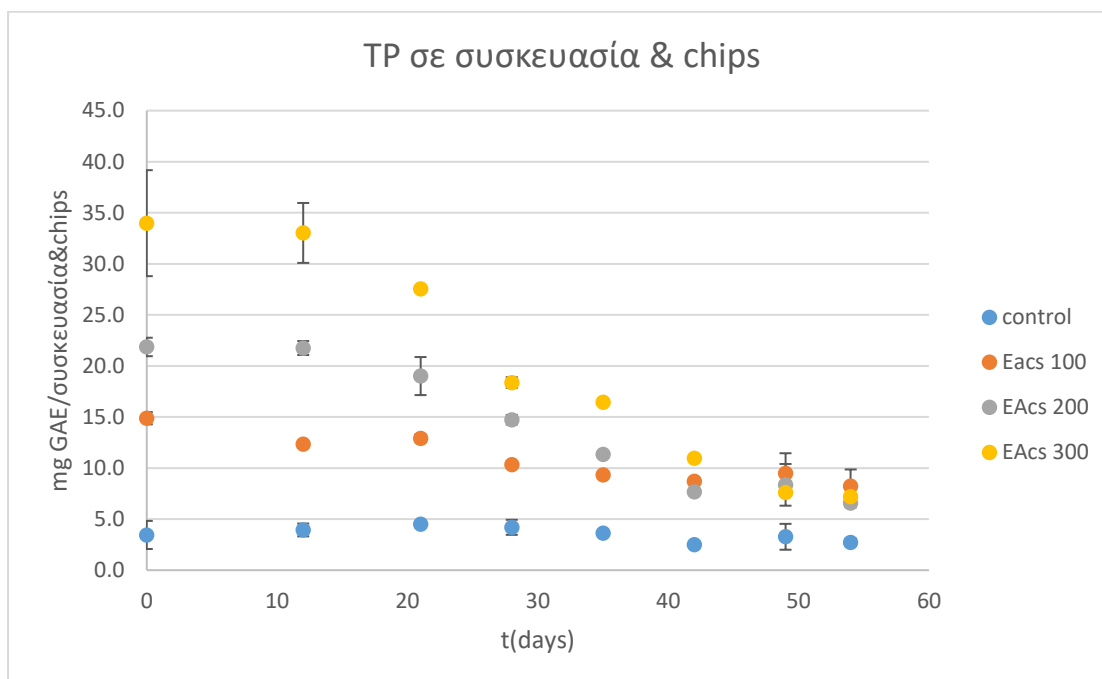
Όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα 5.3.3 και 5.3.4 υπάρχει μεταφορά των αντιοξειδωτικών ουσιών από την συσκευασία στο ίδιο το τρόφιμο. Η μεταφορά αυτή γίνεται ταχύτατα και όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού τόσο ψηλότερα φτάνει ο αριθμός των ολικών φαινολών στο έλαιο των chips. Μέγιστη συγκέντρωση ολικών φαινολών στα chips φαίνεται να συμβαίνει κατά την δεύτερη δειγματοληψία, στις 12 μέρες, και για τις δύο περιπτώσεις εκχυλισμάτων, αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα συγκέντρωσης 300 mg GAE/ m<sup>2</sup>. Μάλιστα το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση, 3.7 mg GAE/g oil σε σύγκριση με της αιθανόλης 2.1 mg GAE/g oil. Για τις συγκεντρώσεις 100 και 200 mg GAE/m<sup>2</sup> και των δύο εκχυλισμάτων παρατηρείται μέγιστη συγκέντρωση στις 21 ημέρες, δηλαδή μια μικρή καθυστέρηση σε σχέση με την συγκέντρωση 300 mg GAE/m<sup>2</sup>. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μέγιστες τιμές των ολικών φαινολών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα είναι υψηλότερες από τις μέγιστες τιμές των ολικών φαινολών του αιθανολικού εκχυλίσματος. Οι Gomez-Estaca et al., 2014 έχουν αναφέρει πως τα άπολα αντιοξειδωτικά φαίνεται να είναι κατάλληλα για λιπαρά τρόφιμα. Τα chips αποτελούν τρόφιμο με υψηλή λιποπεριεκτικότητα και επομένως είναι πιθανόν να διαχέονται τα συστατικά του εκχυλίσματος του οξικού

αιθυλεστέρα ευκολότερα μέσα σε αυτό το τρόφιμο συγκριτικά με τις δραστικές ουσίες του εκχυλίσματος της αιθανόλης. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που παρατηρείται η διαφορά στις μέγιστες τιμές των TP στο έλαιο των chips. Κατόπιν από τις μέγιστες συγκεντρώσεις καταγράφεται ένας ρυθμός μείωσης ή αλλιώς κατανάλωσης τους από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στα στάδια έναρξης και διάδοσης της οξείδωσης του ελαίου. Συγκεκριμένα, όπως έχει αναλυθεί και στο θεωρητικό μέρος, οι υπεροξειδικές (ROO<sup>·</sup>) ή αλκυλικές (R<sup>·</sup>) ρίζες των λιπαρών οξέων του φοινικελαίου αποτελούν δέκτες πρωτονίου (H) προκειμένου να γίνουν πιο σταθερά προϊόντα. Τον ρόλο αυτό αποκτούν οι φαινόλες αντί των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων και έτσι η οξείδωση εμποδίζεται ως ένα βαθμό.

Μια συνολική εικόνα για την μείωση των ολικών φαινολών που περιέχονται σε συσκευασία και chips και για τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζεται στα διαγράμματα 5.3.5 και 5.3.6.



**Διάγραμμα 5.3.5:** Άθροισμα των ολικών φαινολικών της συσκευασία και των chips πατάτας συναρτήσεως του χρόνου για δείγματα που έχουν ως επικάλυψη αιθανολικό εκχύλισμα (Es).



**Διάγραμμα 5.2.10: Άθροισμα των ολικών φαινολικών της συσκευασία και των chips πατάτας συναρτήσει του χρόνου για δείγματα που έχουν ως επικάλυψη εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcS).**

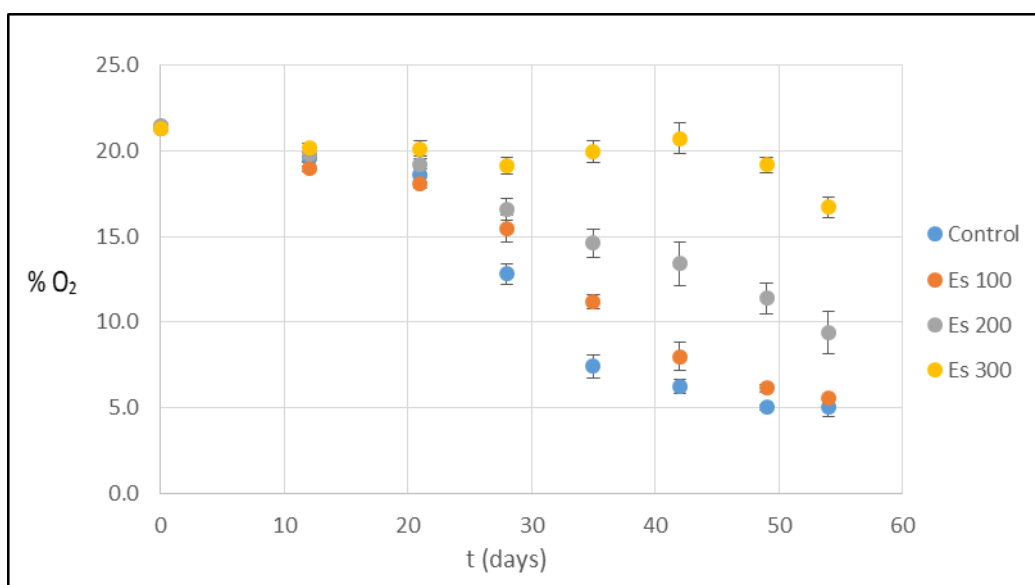
Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται πως τα φαινολικά συστατικά όλων των δειγμάτων καταστρέφονται αλλά με διαφορετικούς ρυθμούς με τις δύο τελευταίες δειγματοληψίες να παρουσιάζουν τιμές κάτω από 10 mg GAE/συσκευασία και τρόφιμο. Επομένως, το άθροισμα των φαινολικών συστατικών σε τρόφιμο και συσκευασία μειώνεται τόσο διότι προσφέτεται η προσδοκούμενη αντιοξειδωτική προστασία, όσο και διότι οι υψηλές θερμοκρασίες παραμονής των δειγμάτων, παρουσία ατμοσφαιρικού αέρα οδηγεί στην καταστροφή αυτών. Εξαιρεση αποτέλεσε η σειρά δειγμάτων EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup>, που φαίνεται να παρουσιάζει υψηλό ρυθμό καταστροφής ολικών φαινολών ενώ παράλληλα φάνηκε να παρουσιάζει προοξειδωτική δράση.

Εκχύλισμα	Es			EAcS		
	100	200	300	100	200	300
mg GAE/m <sup>2</sup>	100	200	300	100	200	300
k (d <sup>-1</sup> )	0.021	0.028	0.042	0.011	0.025	0.033
R <sup>2</sup>	0.9001	0.9366	0.9546	0.9150	0.9255	0.9346

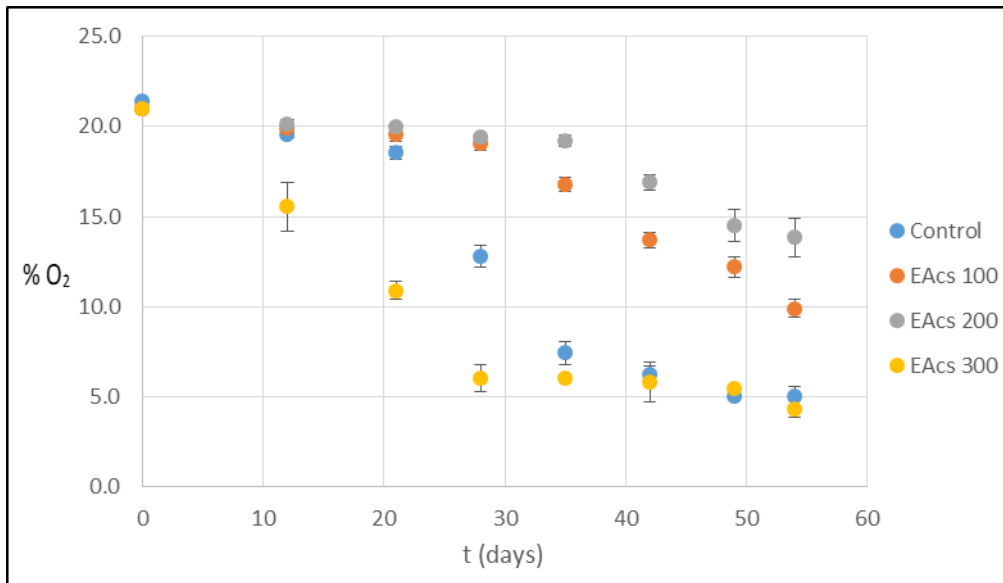
#### 5.4 Μεταβολή της συγκέντρωσης οξυγόνου στη συσκευασία

Στα διαγράμματα 5.2.9 και 5.2.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της % περιεκτικότητας του οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών όλων των δειγμάτων chips πατάτας. Σε όλα τα δείγματα διαπιστώνεται μείωση της περιεκτικότητάς του οξυγόνου, κάτι που είναι λογικό αφού στις αντιδράσεις οξείδωσης τόσο των λιπαρών σωμάτων όσο και των φαινολών καταναλώνεται οξυγόνο. Στο διάγραμμα 5.2.9 μεγαλύτερος ρυθμός καταναλώσης  $O_2$  παρατηρείται από τα δείγματα αναφοράς καθώς δεν περιέχουν καμία δραστική ουσία που να μειώνει την κατανάλωση του. Για τα δείγματα με επικάλυψη παρατηρείται μειωμένος ρυθμός κατανάλωσης ως και αμελητέα μείωση οξυγόνου για την συγκέντρωση  $Es\ 300mg\ GAE/m^2$  κάτι που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, ιδιαίτερα των πρωτογενών προϊόντων, που αποδεικνύουν πως υπάρχει ελάχιστη οξείδωση.

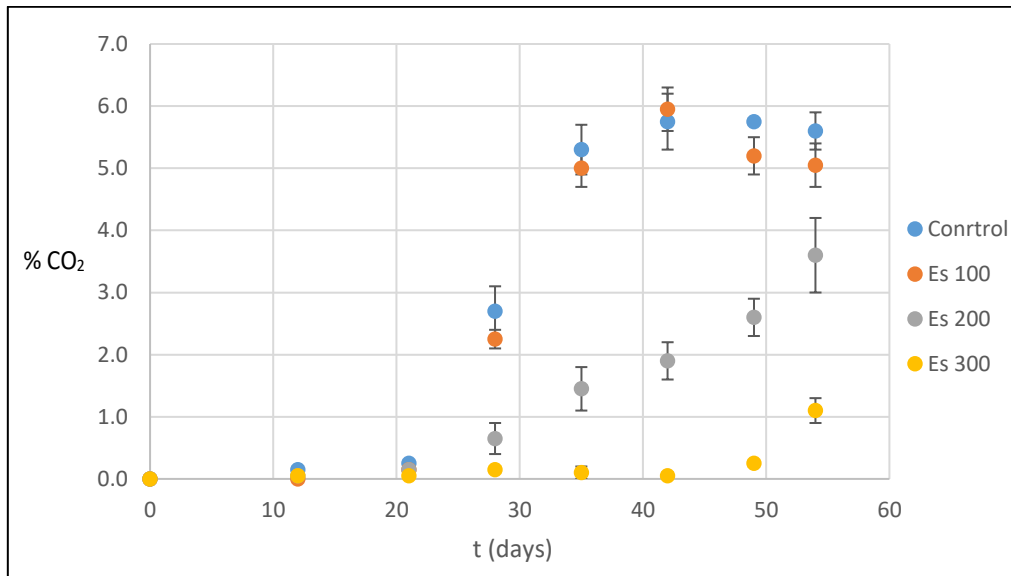
Η μείωση του οξυγόνου στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα από την άλλη έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα ως τώρα, που θέλουν την συγκέντρωση  $EAc\ 300\ GAE/m^2$  να έχει τον μεγαλύτερο ρυθμό οξείδωσης εμφανίζοντας προοξειδωτική δράση και συνεπώς ταχύτερη κατανάλωση οξυγόνου.



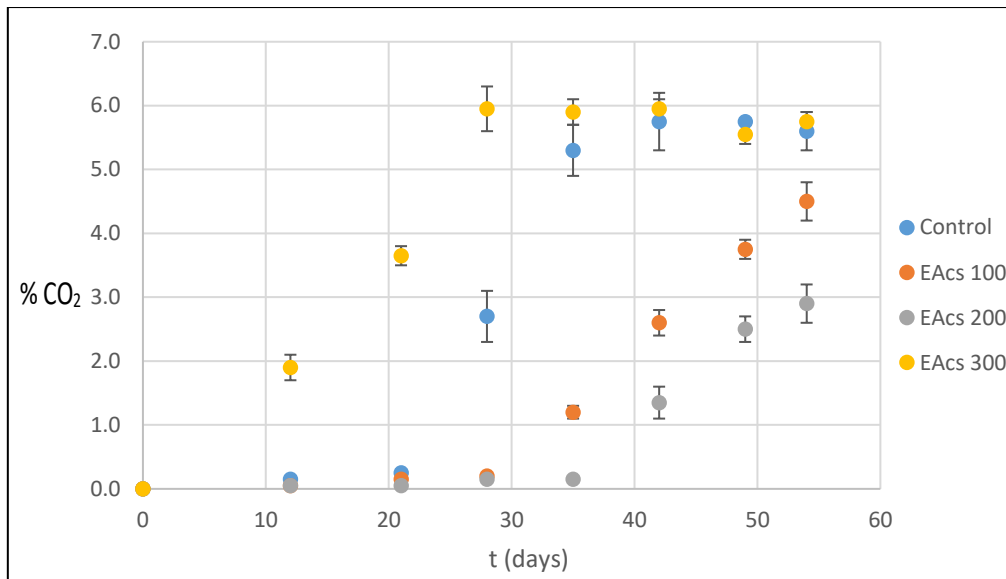
**Διάγραμμα 5.2.9:** Σύσταση  $O_2$  % στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με chips συναρτήσεως του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα με επίστρωση εκχυλίσματος αιθανόλης (Es).



**Διάγραμμα 5.2.10:** Σύσταση  $O_2$  % στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με *chips* συναρτήσεϊ του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα με επίστρωση εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστερά (EAcs).



**Διάγραμμα 5.2.11:** Σύσταση  $CO_2$  % στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με *chips* συναρτήσεϊ του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα με επίστρωση εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστερά (Es).



**Διάγραμμα 5.2.12: Σύσταση CO<sub>2</sub>% στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με chips συναρτήσεως του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα με επίστρωση εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα (EAcs).**

Στα διαγράμματα 5.2.11 και 5.2.12 εμφανίζεται η % σύσταση του CO<sub>2</sub> που βρίσκεται στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με chips. Ο ρυθμός αύξησης της % περιεκτικότητας του CO<sub>2</sub> για όλες τις σειρές δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι σύμφωνος με τον ρυθμό κατανάλωσης του O<sub>2</sub> όπως φάνηκε από τα διαγράμματα 5.2.9 και 5.2.10. Είναι λογικό ότι καθώς μειώνεται η % περιεκτικότητα του O<sub>2</sub> εντός της συσκευασίας, αντίστοιχα θα αυξάνεται η % περιεκτικότητα του CO<sub>2</sub>.



## 5.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα του αριθμού υπεροξειδίων, της αέριας χρωματογραφίας, της % σύστασης του O<sub>2</sub> στις συσκευασίες καθώς και των ολικών φαινολικών συστατικών σε συσκευασία και λάδι chips επεξεργάστηκαν με ανάλυση διακύμανσης (Ανοva) ώστε να διαπιστωθεί ποιοι παράγοντες επιδρούν στην τάση των τιμών τους για αύξηση ή μείωση. Σε κάθε περίπτωση εξετάστηκαν δύο από τους εξής παράγοντες: χρόνος αποθήκευσης, εκχύλισμα (αιθανόλης, οξικού αιθυλεστέρα) και συγκέντρωση επίστρωσης (100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) ή απουσία επίστρωσης. Για την διευκόλυνση της επίλυσης με Ανοva τα αιθανολικά εκχυλίσματα συμβολίζονταν με 1 ενώ του οξικού αιθυλεστέρα με 2. Επιπλέον οι συγκεντρώσεις 100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup> για κάθε εκχύλισμα συμβολίζονταν με 2, 3, 4 αντίστοιχα ενώ το control με 1. Οι πίνακες των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Τα αποτελέσματα για τον αριθμό υπεροξειδίων φαίνονται στους Πίνακες 1-4 του Παραρτήματος και δείχνουν πως τόσο ο χρόνος αποθήκευσης όσο και η συγκέντρωση της επίστρωσης για το κάθε εκχύλισμα ξεχωριστά έχουν σημαντική στατιστική επίδραση στην αυξητική του τάση ( $p < 0.05$ ). Μάλιστα από τους Πίνακες 2 και 4 επιβεβαιώνεται η επίδραση των συγκεντρώσεων. Στην επίστρωση με το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα πιο μεγάλες τιμές αριθμού υπεροξειδίου εμφανίζει η συγκέντρωση EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup> ακολουθούμενη από τα control δείγματα και τις συγκεντρώσεις 100 και 200 mg GAE/m<sup>2</sup> ενώ για την αιθανόλη πιο υψηλές τιμές αριθμού υπεροξειδίων έχουν τα control δείγματα και αυξανόμενη της συγκέντρωσης παρατηρείται μείωση αυτών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα συμπεράσματα που έχουν προκύψει ως τώρα από τα διαγράμματα 5.2.1 και 5.2.2.

Για τα ολικά φαινολικά συστατικά στην συσκευασία, φαίνεται ότι τόσο ο χρόνος αποθήκευσης όσο και η συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην μείωση τους ( $p < 0.05$ ). Συγκεκριμένα από τους Πίνακες 6 και 8 διαπιστώνεται πως καθώς αυξάνει η συγκέντρωση των επιστρώσεων υπάρχει μεγαλύτερη μείωση των φαινολικών συστατικών στην επίστρωση. Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και για τα ολικά φαινολικά συστατικά στο ανακτημένο έλαιο των chips όπως φαίνεται στους Πίνακες 10-12.

Η % σύσταση O<sub>2</sub> στις συσκευασίες δείχνει επίσης να επηρεάζεται σημαντικά από τον χρόνο αποθήκευσης και την συγκέντρωση επίστρωσης των εκχυλισμάτων (Πίνακες 13 και 15). Όσον αφορά τις επιστρώσεις με το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα από τον Πίνακα 14 φαίνεται ότι η συγκέντρωση 300 mg GAE/m<sup>2</sup> οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση

οξυγόνου και έπειτα να ακολουθούν τα control δείγματα και οι συγκεντρώσεις 100 και 200 mg GAE/m<sup>2</sup>. Αντίστοιχα για το εκχύλισμα της αιθανόλης (Πίνακας 16), η μεγαλύτερη μείωση οξυγόνου παρατηρείται στα control δείγματα και καθώς αυξάνει η συγκέντρωση επίστρωσης μειώνεται και η κατανάλωσή του. Οι τάσεις αύξησης των υπεροξειδίων και μείωσης του O<sub>2</sub> προκύπτει πως επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο από τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, εφόσον η παραγωγή υπεροξειδίων απαιτεί την αντίστοιχη κατανάλωση οξυγόνου.

Τέλος, με βάση τα διαγράμματα 5.2.5, 5.2.6 κρίθηκε σκόπιμο να γίνει στατιστική επεξεργασία για την εξανάλη, στην τελευταία δειγματοληψία (54 days) καθώς οι προηγούμενες από αυτή, κυρίως για το εκχύλισμα της αιθανόλης, δεν δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επομένως επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα της εξανάλης και για τα δύο εκχυλίσματα μαζί και διαπιστώθηκε πως το είδος του εκχυλίσματος, οι συγκεντρώσεις αλλά και ο συνδυασμός εκχυλίσματος και συγκέντρωσης είχαν σημαντική στατιστική επίδραση στην τιμή αυτή ( $p < 0.05$ ). Από τον Πίνακα 18 φάνηκε πως το εκχύλισμα της αιθανόλης εμφάνισε συνολικά χαμηλότερες τιμές από του οξικού αιθυλεστέρα. Στον Πίνακα 19 φαίνεται πως επιδρά ο συνδυασμός εκχυλίσματος και συγκέντρωσης. Τα δείγματα με επίστρωση EAcS 100 mg GAE/m<sup>2</sup> εμφάνισαν την χαμηλότερη απόκριση σε εξανάλη ακολουθούμενη από τα δείγματα της αιθανόλης στα οποία μειούμενης της συγκέντρωσης αυξανόταν η εξανάλη. Επίσης οι συγκεντρώσεις EAcS 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup> είχαν τιμές μεγαλύτερες των control δειγμάτων αποδεικνύοντας μια αρνητική επίδραση στην απόκριση της εξανάλης.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα αρωματικά φυτά συνιστούν πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών και είναι ικανά να παρεμποδίσουν την οξείδωση των λιπαρών τροφίμων, κάτι που επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη με την χρήση των εκχυλισμάτων του φυτού *Satureja Thymbra* (θρούμπι).

Εκχυλίσματα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα από θρούμπι τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων (100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>) χρησιμοποιήθηκαν ως επίστρωση των συσκευασιών στις οποίες αποθηκεύτηκαν chips πατάτας. Τα εκχυλίσματα της αιθανόλης προστάτευσαν από τον ταγγισμό με καλύτερη επίδοση για τη συγκέντρωση 300 mg GAE/m<sup>2</sup> μειώνοντας τον ρυθμό αύξησης των πρωτογενών προϊόντων κατά 85.5%. Η αντίστοιχη συγκέντρωση για τον οξικό αιθυλεστέρα έδειξε προοξειδωτική δράση αυξάνοντας τον ρυθμό παραγωγής υπεροξειδίων κατά 4%. Ωστόσο οι δύο μικρότερες συγκεντρώσεις είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην προστασία από την οξείδωση. Προτείνεται μια περαιτέρω διερεύνηση για τα όρια που καθιστούν το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα προοξειδωτική καθώς και την πιθανότητα να επιδρά η αυξημένη συγκέντρωση χλωροφύλλης σε αυτό.

Όσον αφορά στα δευτερογενή προϊόντα, φάνηκε πως οι αποκρίσεις των αλδευδών εξανάλης και επτανάλης επιβεβαίωσαν την μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντων οξείδωσης για την συγκέντρωση EAcS 300 mg GAE/m<sup>2</sup> έχοντας μεγαλύτερη απόκριση από το control δείγμα. Επιπλέον η εμφάνιση αποκρίσεων από τις πρώτες μετρήσεις πιθανόν σχετίζεται με την καταπόνηση του λαδιού στο τηγάνισμα. Μάλιστα παρατηρήθηκε πως απ' όλες τις αλδεύδες η εννεανάλη είχε την υψηλότερη απόκριση καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων κάτι που μπορεί να σχετιστεί με την υψηλή περιεκτικότητα του φοινικελαίου σε ελαϊκό οξύ το οποίο από έρευνες οδηγεί εκτός των άλλων προϊόντων στην παραγωγή αλδευδών οκτανάλης και εννεανάλης.

Επίσης διαπιστώθηκε μια ικανοποιητική διάχυση των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων στα chips με βέλτιστα αποτελέσματα για τον οξικό αιθυλεστέρα αφού ως πιο άπολος διαχέεται καλύτερα στα chips πατάτας. Μάλιστα οι ολικές φαινόλες στο τέλος των πειραμάτων παρουσίασαν μεγάλη κατανάλωση γεγονός

που επιβεβαιώνει την δράση τους κατά των οξειδωτικών φαινομένων. Συμπερασματικά η τεχνολογία της ενεργού συσκευασίας με εκχυλίσματα του φυτού *Satureja Thymbra* αποδείχθηκε αποδοτική και ελπιδοφόρα για την προστασία των chips.

## 7.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας 1:** Ανονα για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς δύο παραμέτρους (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για το αιθανολικό εκχύλισμα.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1860.450	1	1860.450	224.4334	0.000000
συγκ	180.266	3	60.089	7.2487	0.001612
χρονος	495.282	7	70.755	8.5354	0.000058
Error	174.080	21	8.290		

**Πίνακας 2 :** Duncan test για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς την συγκέντρωση για το αιθανολικό εκχύλισμα.

Cell No.	συγκ	PV Mean	1	2	3
4	4	4.38041	****		
3	3	6.42682	****	****	
2	2	9.25330		****	****
1	1	10.43906			****

**Πίνακας 3:** Ανονα για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς δύο παραμέτρους (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3204.001	1	3204.001	235.7916	0.000000
συγκ	438.806	3	146.269	10.7643	0.000172
χρονος	685.499	7	97.928	7.2068	0.000188
Error	285.354	21	13.588		

**Πίνακας 4:** Duncan test για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς την συγκέντρωση

Cell No.	συγκ	PV Mean	1	2	3
3	3	6.17500	****		
2	2	7.56250	****	****	
1	1	10.45000		****	
4	4	15.83750			****

**Πίνακας 5:** Άνομα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για τα ολικά φαινορικά συστατικά στην συσκευασία αιθανολικού εκχυλίσματος.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	221968.5	1	221968.5	94.85026	0.000000
συγκ.	55820.6	3	18606.9	7.95098	0.000991
χρόνος	89866.6	7	12838.1	5.48590	0.001081
Error	49144.2	21	2340.2		

**Πίνακας 6:** Duncan test για τα ολικά φαινορικά συστατικά ως προς τις συγκεντρώσεις επίστρωσης για την αιθανόλη.

Cell No.	συγκ.	TP συσκ. Mean	1	2	3
1	1	22.6065	****		
2	2	68.8307	****	****	
3	3	109.3620		****	****
4	4	132.3438			****

**Πίνακας 7:** Άνομα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για τα ολικά φαινορικά συστατικά στην συσκευασία εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	270863.0	1	270863.0	108.4687	0.000000
συγκ.	73415.2	3	24471.7	9.7998	0.000303
χρόνος	70095.4	7	10013.6	4.0100	0.006187
Error	52440.2	21	2497.2		

**Πίνακας 8:** Duncan test για τα ολικά φαινορικά συστατικά στην συσκευασία ως προς τις συγκεντρώσεις επίστρωσης για τον οξικό αιθυλεστέρα.

Cell No.	συγκ.	TP συσκ. Mean	1	2	3
1	1	22.6065			****
2	2	83.4505	****		
3	3	105.9766	****	****	
4	4	155.9766		****	

**Πίνακας 9:** Ανονα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο λάδι για το εκχύλισμα της αιθανόλης.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	13.82920	1	13.82920	151.1214	0.000000
συγκ.	1.54968	3	0.51656	5.6448	0.005348
χρόνος	4.24493	7	0.60642	6.6268	0.000330
Error	1.92172	21	0.09151		

**Πίνακας 10:** Duncan test για τα ολικά φαινολικά συστατικά στο λάδι ως προς τις συγκεντρώσεις επίστρωσης για την αιθανόλη.

Cell No.	συγκ.	TP λάδι Mean	1	2	3
1	1	0.336938	****		
2	2	0.609000	****	****	
3	3	0.740187		****	****
4	4	0.943437			****

**Πίνακας 11:** Ανονα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στο λάδι για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	26.81316	1	26.81316	95.80276	0.000000
συγκ.	5.62205	3	1.87402	6.69582	0.002402
χρόνος	9.16419	7	1.30917	4.67763	0.002722
Error	5.87746	21	0.27988		

**Πίνακας 12:** Duncan test για τα ολικά φαινολικά συστατικά στο λάδι ως προς τις συγκεντρώσεις επίστρωσης για τον οξικό αιθυλεστέρα.

Cell No.	συγκ.	TP λάδι Mean	1	2	3
1	1	0.336938	****		
2	2	0.770125	****	****	
3	3	1.070813		****	****
4	4	1.483625			****

**Πίνακας 13:** Ανονα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για την % σύσταση του O<sub>2</sub> στα δείγματα με εκχύλιμα αιθανόλης.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7309.010	1	7309.010	907.8476	0.000000
συγκ.	275.984	3	91.995	11.4266	0.000118
χρόνος	575.861	7	82.266	10.2182	0.000015
Error	169.069	21	8.051		

**Πίνακας 14:** Duncan test για την % σύσταση του O<sub>2</sub> ως προς την συγκέντρωση επίστρωσης των αιθανολικών εκχυλισμάτων.

Cell No.	συγκ.	% O <sub>2</sub> Mean	1	2	3
1	1	12.01500	****		
2	2	13.09375	****	****	
3	3	15.70625		****	
4	4	19.63750			****

**Πίνακας 15:** Ανονα δύο παραμέτρων (συγκέντρωση επίστρωσης και χρόνος αποθήκευσης) για την % σύσταση του O<sub>2</sub> στα δείγματα με εκχύλιμα οξικού αιθυλεστέρα.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6281.664	1	6281.664	881.7693	0.000000
συγκ.	388.115	3	129.372	18.1602	0.000005
χρόνος	609.878	7	87.125	12.2300	0.000004
Error	149.603	21	7.124		

**Πίνακας 16:** Duncan test για την % σύσταση του O<sub>2</sub> ως προς την συγκέντρωση επίστρωσης των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα.

Cell No.	συγκ.	% O <sub>2</sub> Mean	1	2
4	4	9.39063	****	
1	1	12.01500	****	
2	2	16.51250		****
3	3	18.12500		****



**Πίνακας 17: Fuctorial Ανονα για την τελευταία δειγματοληψία της εξανάλης για τα εκχυλίσματα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα και για όλες τις συγκεντρώσεις (100, 200, 300 mg GAE/m<sup>2</sup>, control).**

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	7,512717E+13	1	7,512717E+13	1666,464	0,000000
εκχύλισμα	4,002318E+11	1	4,002318E+11	8,878	0,017612
συγκεντρώσεις	9,278525E+11	3	3,092842E+11	6,861	0,013301
εκχύλισμα*συγκεντρώσεις	2,242738E+12	3	7,475793E+11	16,583	0,000855
Error	3,606544E+11	8	4,508180E+10		

**Πίνακας 18: Duncan test για την εξανάλη ως προς το εκχύλισμα.**

	εκχύλισμα	hexanal	1	2
1	1	2008739	****	
2	2	2325058		****

**Πίνακας 19: Duncan test για την εξανάλη ως προς την συγκέντρωση του κάθε εκχυλίσματος.**

	εκχύλισμα	συγκεντρώσεις	hexanal	1	2	3	4
6	2	2	1386139		****		
4	1	4	1692381		****	****	
3	1	3	1783190		****	****	
2	1	2	2149421			****	****
5	2	1	2409963	****			****
1	1	1	2409963	****			****
8	2	4	2744354	****			
7	2	3	2759777	****			

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aidos, I., Schelvis-Smit, R., Veldman, M., Luten, J. B., van der Padt, A., & Boom, R. M. (2003). Chemical and sensory evaluation of crude oil extracted from herring byproducts from different processing operations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 1897–1903.

Al-Saqer, J. M., Sidhu, J. S., Al-Hooti, S. N., Al-Amiri, H. A., Al-Othman, A., Al-Haji, L., Ahmed, N., Mansour, I. B., & Minal, J. (2004). Developing functional foods using red palm olein. IV. Tocopherols and tocotrienols. *Food chemistry*, 85(4), 579–583.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.

Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Sendón, R., de Quirós, A. R. B., Ares, A., Castro-López, M., José Abad, M., Maroto, J., & Paseiro-Losada, P. (2013). Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, 31(1), 236–243.

Belitz, H.D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Χημεία Τροφίμων (4<sup>η</sup> έκδοση), p.666.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Edible fats and oils. *Food Chemistry*, 640-669.

Belitz, I. H. D., & Grosch, I. W. (1999). Lipids. In *Food chemistry* (pp. 152-236). Springer Berlin Heidelberg.

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

Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., & McHugh, T. H. (2008). Scientific status summary. *Journal of food science*, 73(8).

Buck, D. F. (1991). Antioxidants. In *Food Additive User's Handbook* (pp. 1-46). Springer US.

Camo, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science*, 80(4), 1086–1091.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749–760.

Catalá, A. (2012). Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model”. *Biochimie*, 94(1), 101–109.

Cillard, J., Cillard, P., & Cormier M. (1980). Effect of experimental factors on the pro-oxidant behaviour of tocopherol. *Journal of America Oil Chemists’ Society*, 57(8), 255–261.

Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 299–317.

Choe, E., & Min, D.B. (2006). Mechanisms and Factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169–186.

Chung, D., Papadakis, S. E., & Yam, K. L. (2001). Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25(1), 71–87

Das, N.P., & Pereira, T. A. (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure-activity relationships, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*. 67(4), 255–258.

Day, B. P. (2008). Active packaging of food. *Smart packaging technologies for fast moving consumer goods*, 1–18.

De Leonardis, A., & Macciola, V. (2003). Effectiveness of caffeic acid as an antioxidant for cod liver oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 475–480.

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.

Dorman, H. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4563–4569.

Figge, K., & Hilpert, H. A. (1991). Migration of different additives from polyolefine specimens into ethanol 95% by vol., test fat HB 307 and olive oil-a comparison. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87(1), 1–4.

Frankel, E.N., Neff, W.E., Rohwedder, W.K., Khambay B.P.S., Garwood R.F., & Weedon B.C.L. (1977). Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: Methyl oleate, *Lipids*, 12 (11), 901–907.

Frankel, E.N. (1984). Lipid Oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American* 61 (12), 1908–1917.

Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(4), 495–511.

Frankel, E.N. (2005). Lipid Oxidation, Woodhead Publishing, 18, Cambridge, U.K., p. 1–128.

Frankel, E. N. (2014). Lipid oxidation. Elsevier. p. 220-294

Soto-Cantú, C. D., Graciano-Verdugo, A. Z., Peralta, E., Islas-Rubio, A. R., González-Córdova, A., González-León, A., & Soto-Valdez, H. (2008). Release of butylated hydroxytoluene from an active film packaging to asadero cheese and its effect on oxidation and odor stability. *Journal of dairy science*, 91(1), 11–19.

Giese J. (1996). Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*. 50 (11) 73–81.

Giweli, A., Džamić, A. M., Soković, M., Ristić, M. S., & Marin, P. D. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules*, 17(5), 4836–4850.

Gómez-Estaca J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014) *Advances in antioxidant active food packaging*. 35(1), 42–51.

Guillén, M. D., & Cabo, N. (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77(4), 503–510.

Gunstone, F. D. (1996). Fatty acids—nomenclature, structure, isolation and structure determination, biosynthesis and chemical synthesis. In *Fatty Acid and Lipid Chemistry* (pp. 1–34). Springer US.

Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N., & Graciano-Verdugo, A. Z. (2009). Migration of  $\alpha$ -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*, 42(10), 1396–1402.

Gray, J. I. (1978). Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(6), 539–546.

Hamilton, R. J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. B., & Pierce, H. (1997). Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, 60(2), 193–199.

Hammerstone, J. F., Lazarus, S.A., & Schmitz, H.H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods, *The journal of nutrition*, 130 (8), 2086–2092.

Han, J. H. (Ed.). (2005). *Innovations in food packaging*. Academic Press. p. 89-126

Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.

Hernández I., Alegre L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants, *Trends in plant science*, 14(3), 125–132.

Hiatt, W. H., Stallard, R. E., Butler, E. D., & Badgett, B. (1968). Repair following mucoperiosteal flap surgery with full gingival retention. *Journal of Periodontology*, 39(1), 11–16.

Iverson, F. (1999). Phenolic antioxidants: Health protection branch studies on butylated hydroxyanisole, *Cancer Letters*, 93 (1), 49–5.

Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846–4851.

Kolakowska, A., & Sikorski, Z. Z. (Eds.). (2010). *Chemical and functional properties of food lipids*. CRC press.

Kim, H. S., Kwack, S. J., & Lee, B. M. (2000). Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo [a] pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo [a] pyrene. *Chemico-biological interactions*, 127(2), 139–150.

Kumar, P. P., Kumaravel, S., & Lalitha, C. (2010). Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(7), 191–195.

Labuza, T. P., & Breene, W. M. (1989). Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13(1), 1–69.

Lee, C. H., An D.S., Lee S. C., Park. H.J., & Lee D. S. (2004). A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and  $\alpha$ -tocopherol, *Journal of Food Chemistry*, 62(4), 323–329.

Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1643–1647.

Lin C. C., & Liang, J. H. (2002). Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system, *Journal of Food Science*, 67(2), 530–533.

List, G. R., Evans, C. D., Kwolek, W. F., Warner, K., Boundy, B. K., & Cowan, J. C. (1974). Oxidation and quality of soybean oil: a preliminary study of the anisidine test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51(2), 17–21.

Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G. A., de Cindio, B., Houghton, P. J., & Menichini, F. (2008). In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 109-116.

López-de-Dicastillo, C., Pezo, D., Nerín C., López-Carballo, G., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2000), Reducing Oxidation of Foods Through Antioxidant Active Packaging Based on Ethyl Vinyl Alcohol and Natural Flavonoids. *Packaging Technology and Science*, 25 (8), 457–466.

Man, Y. B. C., & Jaswir I. (2000). Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying, *Food Chemistry*, 69 (3), 301–307.

Masek, A., Chrzescijanska, E., Latos M., Zaborski, & Podsedek, A. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Green Tea Extract Compounds. *Int. J. of Electrochem. Sci.* 12, 6600–6610.

Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591–598.

Miltz, J., Hoojjat, P., Han, J. K., Giacini, J. R., Harte, B. R., & Gray, I. J. (1988). Loss of antioxidants from high-density polyethylene: its effect on oatmeal cereal oxidation.

Miron, T.L., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1288, 1–9.

Mohan C.O., Ravishankar N.C., and Srinivasagopal K. (2008), Effect of O<sub>2</sub> scavenger on the shelf-life of catfish (*Pangasius sutchi*) steaks during chilled storage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *Journal Science Food Agriculture* 88: 442–448.

Nadarajah, D., Han, J.H., Holley R.A. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate, *Journal of Food Microbiology*, 99 (3), 269–279.

Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7840–7846.

O'Connor, D. E., Mihelich, E.D., & Coleman, M. C. (1981). Isolation and characterization of bicycloendoperoxides derived from methyl linolate. *Journal of the American Chemical Society*, 103(1), 223–224

Oniszczyk A., Podgórski R., Oniszczyk T., Żukiewicz-Sobczak W., Nowak R., & Waksmundzka-Hajnos M. (2014). Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb, *Industrial Crops and Products*, 61, 377–381.

Ozdemir M., Floros D. (2010). Active Food Packaging Technologies, *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44 (3), 186–191.

Öztürk, M. (2012). Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food chemistry*, 134(1), 48–54.

Paquot, C., & Hautfenne, A. (1987). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives (Vol. 73, p. 78). London: Blackwell Scientific.

Pawłowska A.M., Oleszek W., Braca A. (2008), Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 56 (9), 3377–3380.

Pereira de Abreu, D. A., Cruz, J. M., & Paseiro Losada, P. (2012). Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Reviews International*, 28(2), 146–187.

Pereira de Abreu, D., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282.

Pereira de Abreu, D., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2011). Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants. *Food Chemistry*, 126(1), 315-320.

Pokorny, J., Yianislieva N., & Gordon M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in foods-Practical applications*, CRC Press, Boca Raton, New York, p. 210–247.

Porter, W. L. (1980). Recent trends in food applications of antioxidants. *In Autoxidation in food and biological systems (pp. 295–365)*. Springer US.

Rajamma, A.G., Bai, V., & Nambisan, B. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of oleoresins isolated from nine *Curcuma* species, *Phytopharmacology*. 2 (2), 312–317.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

Rome, V., Pichat, P., Guillard, C., Chopin, T., & Lehaut, C. (1999). Degradation of palmitic (hexadecanoic) acid deposited on TiO<sub>2</sub>-coated self-cleaning glass: kinetics of disappearance, intermediate products and degradation pathways. *New Journal of Chemistry*, 23(4), 365–374.



Robertson, G. L. (2016). Food packaging: principles and practice. CRC Press, p.220–235.

Saguy, I.S., Dana, D. (2003). Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *Journal of food engineering*, 56 (2), 143–152.

Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67–103.

Simic, M. G., & Karel, M. (Eds.). (2013). *Autoxidation in food and biological systems*. Springer Science & Business Media.

Singh, S., Das, S. S., Singh, G., Schuff, C., de Lampasona, M. P., & Catalán, C. A. (2014). Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *BioMed research international*, 2014.

Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011–1022.

Skoula, M., & Grayer, R. J. (2005). Volatile oils of *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra*, *Satureja spinosa* and *Thymbra calostachya* (Lamiaceae) from Crete. *Flavour and fragrance journal*, 20(6), 573–576.

Solovyov, S. E. (2014). Oxygen scavengers. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

Steele, R. (Ed.). (2004). Understanding and measuring the shelf-life of food. Woodhead Publishing, 136–293.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3197–3207.

Tepe, B. (2015). Inhibitory Effect of *Satureja* on Certain Types of Organisms. *Records of Natural Products*, 9(1), 1–18.

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79 (7), 231–249.

Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., & Oreopoulou, V. (2017). Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 4, 12–20.

Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593–606.

Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., & Oreopoulou, V. (2017). Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 4, 12–20.

Ulku Karabay–Yavasoglu, N., Baykan, S., Ozturk, B., Apaydin, S., & Tuglular, I. (2006). Evaluation of the Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of *Satureja thymbra*. L. Essential Oil. *Pharmaceutical biology*, 44(8), 585–591.

Upadhyay, R., & Mishra, H. N. (2014). Antioxidant activity measurement of oleoresin from rosemary and sage. *Industrial Crops and Products*, 61, 453–459.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in food science & technology*, 10(3), 77–86.

Von Zeddelmann, H., & Wurziger, J. (1973). Verhalten und Beurteilung von Fritierfetten in der Praxis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 75(1), 18–24.

Wessling, C., Nielsen, T., & Leufvén, A. (2000). The influence of  $\alpha$ -tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. *Packaging Technology and Science*, 13(1), 19–28.

Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., & Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9), 1027–1038.

Yanagida, A., Shoji, T., & Kanda, T. (2002). Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(9), 1972–1975.

Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59–66.

Yen, G. C., Duh, P. D., Tsai, H. L., & Huang, S. L. (2003). Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(6), 1215–1222.

Zhao, B., Li, X., He, R., Cheng, S., & Wenjuan, X. (1989). Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 14(2), 175–185.