



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



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ SATUREJA THYMBRA ΩΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

ΧΡΗΣΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2018

Στην οικογένεια μου,

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κα. Βασιλικής Ωραιοπούλου.

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

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Χουλιτούδη και τον διδάκτορα κ. Δημήτρη Τσιμογιάννη για την υποστήριξη τους και την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για το ενδιαφέρον και την παροχή της βοήθειας τους κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που με στήριξαν και μου προσέφεραν τη βοήθεια και τη συμπαράσταση τους σε όλα τα στάδια αυτής της διαδρομής.

Περίληψη

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο εμπλουτισμός γαλακτωμάτων τύπου έλαιο σε νερό με φυσικά αντιοξειδωτικά και η προστασία τους από την οξείδωση. Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλιέλαιο, που είναι από τα συνηθέστερα έλαια που χρησιμοποιούνται σε ευρέως καταναλισκόμενα γαλακτώματα, όπως μαγιονέζα και σάλτσες για σαλάτα. Τα συστατικά που προστέθηκαν στα γαλακτώματα ήταν αντιπροσωπευτικές πρότυπες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες απαντώνται συχνά στα αρωματικά φυτά, συγκεκριμένα κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ, και εκχυλίσματα από το αρωματικό φυτό *Satureja thymbra* (θρούμπι) που είναι αυτοφυές και ευρύτατα διαδεδομένο στην Ελληνική ύπαιθρο. Τα φαινολικά συστατικά, σύμφωνα με τις ενδείξεις πολλών ερευνών, συμβάλλουν στον περιορισμό ασθενειών που έχουν σχέση με τις οξειδώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Επομένως, στόχος της παρούσας έρευνας ήταν, επιπλέον της αντιοξειδωτικής προστασίας των γαλακτωμάτων, να προσδιορισθεί τόσο για τις πρότυπες ενώσεις όσο και για τις δραστικές ενώσεις που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα η διάρκεια ζωής μετά τον εγκλεισμό στα γαλακτώματα ώστε να εξακριβωθεί αν ο εμπλουτισμός οδηγεί δυνητικά σε διατηρήσιμα λειτουργικά τρόφιμα.

Τα γαλακτώματα 30% ηλιέλαιου σε νερό παρασκευάστηκαν με χρήση Tween 20, σε ποσοστό 2% w/w, σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας αρχικά και υψηλής πίεσης στη συνέχεια. Προστέθηκαν κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των πρότυπων ουσιών να είναι 500 ppm ως προς τη λιπαρή φάση, επίσης έγινε προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος και εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του φυτού *S. Thymbra* έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των ολικών φαινολών στα γαλακτώματα να είναι ίση με 500 mg GAE/L_{λιπαρής φάσης}. Τα γαλακτώματα κατόπιν αποθηκεύτηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες στους 5, 25 και 40 °C. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αυτά σχετίζονταν με τον προσδιορισμό πρωτογενών (αριθμός υπεροξειδίων) και δευτερογενών (εξανάλη) προϊόντων οξείδωσης, την κατανάλωση οξυγόνου και την περιεκτικότητα σε δραστικές ενώσεις. Ο προσδιορισμός των πρότυπων ουσιών στα γαλακτώματα με κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ έγινε με τη χρήση φωτομέτρου. Στα γαλακτώματα με τα δραστικά εκχυλίσματα έγινε μέτρηση των ολικών φαινολών σε όλη τη διάρκεια του πειράματος με την εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu, ενώ προσδιορίστηκε και η διατηρησιμότητα δραστικών ενώσεων, όπως το ροσμαρινικό οξύ, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας.

Για όλα τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν, η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και μείωση του χρόνου διατήρησης των δραστικών ενώσεων. Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν προκύπτει ότι τόσο οι πρότυπες ενώσεις όσο και τα εκχυλίσματα στη ποσότητα που ενσωματώθηκαν εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση.

Η μέτρηση των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης έδειξε ότι πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά αποτελούν η κερκετίνη και το αιθανολικό εκχύλισμα, ακολουθεί το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα, ενώ το ροσμαρινικό οξύ παρουσιάζει πιο ασθενή δράση. Η ποσότητα δευτερογενών πτητικών προϊόντων οξείδωσης, και πιο συγκεκριμένα της εξανάλης, που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στα γαλακτώματα είναι

παρόμοια, με εξαίρεση να αποτελούν τα γαλακτώματα με τα εκχυλίσματα στους 25 °C που παρουσιάζουν μικρότερες τιμές σε σχέση με το γαλάκτωμα μάρτυρα. Όσον αφορά το οξυγόνο σε όλα τα γαλακτώματα που περιέχουν κάποια πρόσθετη ουσία η κατανάλωση του ήταν μικρότερη από αυτή του μάρτυρα. Σε αυτή τη περίπτωση και πάλι η προσθήκη κερκετίνης και αιθανολικού εκχυλίσματος οδηγεί σε παρεμφερή αποτελέσματα με την εμφάνιση της μικρότερης κατανάλωσης οξυγόνου. Η δράση των άλλων δύο συστατικών διαφοροποιείται, με μεγαλύτερη κατανάλωση να εμφανίζεται στην περίπτωση που ως πρόσθετο χρησιμοποιείται το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα.

Όσον αφορά τη διατήρηση των πρότυπων ενώσεων η κερκετίνη και το ροσμαρινικό οξύ στους 40 °C καταναλώνονται αρκετά γρήγορα, ενώ στις χαμηλότερες θερμοκρασίες μετά την αρχική μείωση της συγκέντρωσης οι ενώσεις συνεχίζουν να υπάρχουν στα συστήματα για αρκετό χρόνο. Πιο συγκεκριμένα η κερκετίνη στους 25 °C εμφανίζει μείωση 40% στις πρώτες εννιά μέρες, μέχρι την 41^η μέρα φαίνεται να έχει αποικοδομηθεί επιπλέον 20% της αρχικής ποσότητας ενώ στην 47^η μέρα η ποσότητα της είναι αμελητέα. Στους 5 °C μέχρι την 47^η μέρα έχει καταναλωθεί περίπου το 52% της ένωσης. Όσον αφορά τα γαλακτώματα με το ροσμαρινικό οξύ στις 47 ημέρες και στους 25 °C έχει καταναλωθεί το 73,3% της ουσίας ενώ στους 5 °C το 46,7%. Παρόμοια είναι η συμπεριφορά των δραστικών ενώσεων και στα γαλακτώματα στα οποία έχουν προστεθεί εκχυλίσματα. Για τα γαλακτώματα που περιέχουν εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα τα ολικά φαινολικά που έχουν καταναλωθεί την 19^η μέρα στους 25 °C είναι πάνω από το 83,33% ενώ αυτά του αιθανολικού εκχυλίσματος 73,3 %. Στους 5 °C και στις δύο περιπτώσεις ήδη από την 27^η μέρα έχει καταναλωθεί πάνω από 73,3% της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών.

Ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις εντοπίζονται και στα δύο εκχυλίσματα, όπως είναι για παράδειγμα το ροσμαρινικό οξύ. Ο οξικός αιθυλεστέρας έχει ανακτήσει σε μεγαλύτερο ποσοστό μη πολικά βιοδραστικά συστατικά (φαινολικά τερπένια, φλαβονοειδή) όπως η καρβακρόλη, η θυμόλη, η εριοδικτυόλη και η ναριγγενίνη, ουσίες που εντοπίζονται και στο αιθανολικό εκχύλισμα σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Αντίθετα στο εκχύλισμα με διαλύτη την αιθανόλη εντοπίζονται πιο πολικές ενώσεις σε μεγαλύτερες ποσότητες (φαινολικά οξέα, γλυκοζίτες φλαβονοειδών), ενώ η ένωση που κυριαρχεί στο εκχύλισμα είναι το ροσμαρινικό οξύ. Το ροσμαρινικό οξύ που ανιχνεύεται είναι τριπλάσιο στην περίπτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος σε σύγκριση με το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα. Το ροσμαρινικό οξύ, ανάμεσα στις φαινόλες που ανιχνεύονται, φαίνεται να προστατεύει το γαλάκτωμα καθώς αποτελεί την κύρια ένωση που καταναλώνεται. Οι διαφορές του φαινολικού προφίλ των εκχυλισμάτων είναι αυτές που ευθύνονται για τη διαφορετική ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν τα γαλακτώματα από την οξείδωση.

Λέξεις-Κλειδιά: ηλιέλαιο, γαλάκτωμα, *Satureja thymbra* (θρούμπι), λειτουργικό τρόφιμο

A STUDY OF THE EXTRACTS AND COMPONENTS OF THE SATUREJA THYMBRA PLANT AS ANTIOXIDANT ADDITIVES IN EMULSIONS

Maria Christou, Diploma Thesis

National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering,
Laboratory of Food Chemistry and Technology

Abstract

The subject of this diploma thesis was the enrichment of oil-in-water emulsions with natural antioxidants and their protection against oxidation. Sunflower oil, one of the most common oils in widely consumed emulsions, such as mayonnaise and salad dressings, was used in order to produce the emulsions. The ingredients added to the emulsion were standard phenolic compounds, often found in aromatic plants, namely quercetin and rosmarinic acid, as well as extracts from the aromatic plant *Satureja thymbra* (savory) which is native and widespread in the Greek countryside. The phenolic compounds, according to the indications of many studies, contribute to the reduction of diseases related to oxidation in the human body. Therefore, the aim of this study was, additional to the antioxidant protection of emulsions, the determination of the shelf life of both the standard and the active compounds found in the extracts after their inclusion in the emulsions. The purpose of this action was to ascertain whether their enrichment could potentially lead to sustainable functional foods.

The 30% emulsions of sunflower oil in water were prepared using Tween 20, at a percentage of 2% w/w, at first in a high speed and subsequently in a high pressure homogenizer. Quercetin and rosmarinic acid were added in a final concentration of 500 ppm of the standard compounds in the oil phase, as well as ethanolic and ethyl acetate extracts of *S. Thymbra* so that the final concentration of the total phenols in the emulsion was equal to 500 mg GAE/L_{oil phase}. The emulsions were afterwards stored at 5, 25 and 40 °C. The measurements performed concerned the determination of the primary (peroxide value) and secondary (hexane) oxidation products, the oxygen consumption and the content of active compounds. The evaluation of the standard compounds in the emulsions with quercetin and rosmarinic acid was conducted using a photometer. In the emulsions with the active extracts, the whole phenolic content was measured for the whole duration of the experiment using the Folin-Ciocalteu method. The sustainability of the active compounds, such as the rosmarinic acid, was determined with the use of liquid chromatography.

For all the emulsions prepared, an increase in storage temperature led to an increase in the production of primary and secondary oxidation products, in oxygen consumption and a decrease in the shelf life of the active compounds. From the analyses performed, it appears that both the standard compounds and the extracts exhibited antioxidant activity in the incorporated amount.

The measurement of the primary oxidation products showed that the most effective antioxidants were quercetin and the ethanolic extract, followed by the ethyl acetate extract, while the rosmarinic acid has a weaker effect. The quantity of the secondary volatile oxidation

products, particularly the hexanal determined in the emulsions, was similar, with the exception of the emulsions with the extract at 25 °C that presented lower values in comparison to the control. All emulsions containing an additive had a lower oxygen consumption in relation to the control. In this case, once again, the addition of quercetin and ethanolic extract yielded similar results presenting the least amount of oxygen consumption. On the other hand, the action of the other two compounds differs, with the greatest occurring when the ethyl acetate extract is used as an additive.

With regard to the conservation of the standard compounds, the quercetin and the rosmarinic acid at 40 °C are consumed fairly quickly, while at the lower temperatures after presenting an initial concentration decrease, the compound continue to exist in the emulsions for a considerable amount of time. More specifically, the quercetin at 25 °C presents a decrease of 40% in the first nine days, by the 41st day it appears to have decreased an extra 20% of the initial concentration, while by the 47th day its quantity is negligible. At 5 °C approximately 52% of the compound has been consumed by the 47th day. In the case of rosmarinic acid, at 25 °C 73,3% of the compound has been consumed and at 5 °C 46,7% by the 47th day. Similar is the behavior of the active compounds and emulsions to which extracts have been added. For emulsions containing ethyl acetate extract, total phenolics consumed on day 19 at 25 °C are above 83,33% while those of the ethanolic extract 73,3%. At 5 °C in both cases, on the 27th day more than 73,3% of the total phenol concentration has been consumed.

Certain bioactive compound can be found in both extracts, such as rosmarinic acid. Ethyl acetate has recovered a greater percentage of non polar bioactive compounds (phenolic terpenes, flavonoids), for instance carvacrol, thymol, eriodictyol and naringenin, which are found in the ethanol extract in a much lower percentage. On the contrary, in the extract with ethanol more polar compounds are found in larger quantities (phenolic acids, flavonoid glycosides), while the predominant compound in the extract is rosmarinic acid. The rosmarinic acid detected is three times higher in the case of the ethanolic extract compared to the ethyl acetate extract. Rosmarinic acid, among the phenols detected, appears to protect the emulsion as it is the main compound consumed. The differences in the phenolic profile of the extracts are the ones responsible for the different effectiveness of the extracts in the protection of the emulsions from oxidation

Key words: sunflower oil, emulsion, *Satureja thymbra* (savory), functional food

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1. ΛΙΠΑΡΑ ΣΩΜΑΤΑ	14
1.1 Λιπαρά σώματα και οι δομικές μονάδες τους	14
1.2 Ταξινόμηση λιπαρών σωμάτων	14
1.3 Λιπαρά οξέα	15
1.3.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα.....	16
1.3.2 Ακόρεστα λιπαρά οξέα.....	16
1.3.3 Απαραίτητα ή ουσιώδη λιπαρά οξέα.....	17
1.4 Ρόλος των ελαίων και των λιπών στα τρόφιμα.....	17
1.5 Ηλιέλαιο	18
1.5.1 Παραγωγή	18
1.5.2 Σύσταση.....	18
1.5.3 Χρήση	19
2. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ.....	20
2.1 Εισαγωγή	20
2.2 Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων	20
2.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων	21
2.4 Σταθεροποίηση	22
2.5 Γαλακτωματοποιητές	24
2.5.1 Δομή γαλακτωματοποιητών	26
2.5.2 Tween 20	26
2.6 Γαλακτώματα τροφίμων.....	27
2.6.1 Μαγιονέζα και σάλτσες.....	27
3. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΥΛΩΝ	29
3.1 Εισαγωγή	29
3.2 Αυτοοξειδωση	29
3.3 Επιπτώσεις της οξειδωσης στην ποιότητα των λιπαρών.....	31
3.4 Οξείδωση γαλακτωμάτων έναντι της οξειδωσης ελεύθερων ελαίων.....	32
3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση	33
4. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	37
4.1 Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών.....	37
4.2 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών	38

4.2.1 Πρωτογενή.....	38
4.2.2 Δευτερογενή.....	39
4.2.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά.....	40
4.3 Λειτουργικά τρόφιμα	41
4.4 Επίδραση δραστικών ριζών στον οργανισμό.....	42
4.5 Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών σε λειτουργικά τρόφιμα	43
4.6 Φυσικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σε λειτουργικά τρόφιμα.....	44
4.6.1 Φαινόλες	45
4.6.2 Τοκοφερόλες (βιταμίνη E).....	53
4.6.3 Συνένζυμο 10 (Q ₁₀)	54
4.6.4 Καροτενοειδή	54
4.6.5 Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)	55
4.6.6 Δράση αρωματικών φυτών στα τρόφιμα	55
4.7 Αντιοξειδωτική δράση σε γαλακτώματα	56
4.7.1 Επίδραση της κερκετίνης στην οξείδωση γαλακτωμάτων.....	57
4.7.2 Επίδραση του ροσμαρινικού οξέος στην οξείδωση γαλακτωμάτων.....	64
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	68
5.1 Σχεδιασμός πειραμάτων	68
5.2 Πρώτες ύλες-Αντιδραστήρια.....	69
5.3 Συσκευές.....	69
5.4 Πειραματικές τεχνικές.....	70
5.4.1 Διαλυτοποίηση ενώσεων και απομάκρυνση διαλυτών.....	70
5.4.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων και αποθήκευση	70
5.4.3 Διάσπαση γαλακτωμάτων, παραλαβή υδατικής και λιπαρής φάσης	71
5.4.4 Παρασκευή διαλυμάτων για τις αναλυτικές μεθόδους.....	73
5.4.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων από το φυτό <i>Satureja thymbra</i>	74
5.5 Ενόργανες και αναλυτικές μέθοδοι	74
5.5.1 Μέτρηση πτητικών αλδεϋδων	74
5.5.2 Μέτρηση οξυγόνου υπερκείμενης ατμόσφαιρας.....	75
5.5.5 Μέθοδος μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (P.V)	75
5.5.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων με τη χρήση φωτομέτρου.....	75
5.5.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων με HPLC.....	76
5.5.8 Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	76
5.5.9 Αντιριζική δραστηριότητα εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH	76

5.5.10	Στερεό υπόλειμμα	77
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	78
6.1	Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων	78
6.2	Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και πρότυπων ουσιών σε γαλακτώματα	79
6.2.1	Επίδραση της προσθήκης διαφορετικών ουσιών στα γαλακτώματα.....	79
6.2.2	Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό οξείδωσης των γαλακτωμάτων	86
6.3	Μελέτη της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών ουσιών σε γαλακτώματα	91
6.3.1	Μελέτη της διατήρησης της κερκετίνης	92
6.3.2	Μελέτη της διατήρησης του ροσμαρινικού οξέος.....	92
6.3.3	Μελέτη της διατήρησης των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα	93
7.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	100
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101
9.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	111

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λιπαρά αποτελούν ενώσεις που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη διατροφή των ανθρώπων. Η χρήση τους μπορεί να είναι πολύ σημαντική παρέχοντας ενέργεια ή μεταβάλλοντας άλλα χαρακτηριστικά όπως τη γεύση, την υφή και τη γενικότερη εμφάνιση του προϊόντος καθιστώντας το πιο ελκυστικό. Συστήματα τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε τρόφιμα και αποτελούνται από κάποιο ποσοστό λιπαρής ύλης είναι τα γαλακτώματα.

Ανάλογα με την προέλευση τους, οι λιπαρές ύλες, περιέχουν διαφορετικά λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Ένα μεγάλο πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση των λιπαρών υλών είναι ότι έχουν την τάση να οξειδωθούν. Η έναρξη της οξείδωσης μπορεί να προκύψει από διάφορους παράγοντες όπως θέρμανση, φως ή παρουσία μετάλλων και μπορεί να γίνει κατά την παρασκευή, αποθήκευση ή διανομή του προϊόντος. Κατά την οξείδωση παράγονται, αρχικά, άοσμες και άχρωμες ενώσεις οι οποίες, εν συνεχεία, αποικοδομούνται παράγοντας οσμηρές πτητικές ενώσεις. Τα δευτερογενή προϊόντα που παράγονται είναι υπεύθυνα για τον ταγγισμό. Οι πιο χαρακτηριστικές αλλαγές που καθίστανται όλο και πιο εμφανείς κατά τη διάρκεια της οξείδωσης είναι η ανάπτυξη δυσάρεστης γεύσης και οσμής. Επειδή τα γαλακτώματα παρασκευάζονται κατά κύριο λόγο από λάδι, νερό και κάποιο γαλακτωματοποιητή, με τη μία φάση να είναι διασπαρμένη στην άλλη, η οξείδωση, που θεωρείται διεπιφανειακό φαινόμενο, είναι πιο έντονη από ότι στο χύμα λάδι.

Μια σημαντική πρόκληση που έχει να αντιμετωπίσει η βιομηχανία τροφίμων είναι η διατήρηση υψηλής ποιότητας στα τρόφιμα από την στιγμή της επεξεργασίας τους μέχρι την κατανάλωση τους. Σε αυτά που περιέχουν κάποια λιπαρή ύλη μια συνηθισμένη μέθοδος προστασίας είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται μπορούν να επιδρούν σε διαφορετικά στάδια της οξείδωσης και η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο προστίθενται. Τα αντιοξειδωτικά που έχουν καλύτερη δράση, συνήθως, είναι αυτά που παρασκευάζονται συνθετικά, παρόλα αυτά, υπάρχει μια τάση, η οποία αυξάνεται συνεχώς, για χρήση φυσικών ενώσεων στη διατροφή, γεγονός που έχει οδηγήσει στην χρήση αντιοξειδωτικών που προέρχονται από φυτικές πηγές.

Τα αντιοξειδωτικά πέρα από την προστασία των λιπαρών από την οξείδωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προστατεύσουν τον ανθρώπινο οργανισμό από τις δραστικές ρίζες. Η συσσώρευση των δραστικών ριζών είναι πιθανό να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, πέρα όμως από αυτό, θεωρείται αιτία πολλών ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, αναιμία, ορισμένα είδη καρκίνου και εκφυλιστικών ασθενειών. Η αντιμετώπιση επομένως αυτών των ενώσεων είναι επιτακτική, παρόλα αυτά τα αντιοξειδωτικά είναι αρκετά ευπαθή και θα πρέπει να προστατευθούν κατά την είσοδο τους στον οργανισμό ώστε να απορροφηθούν από το κατάλληλο όργανο. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι εγκλεισμού όπως τα γαλακτώματα, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως λειτουργικά τρόφιμα λόγω της ευεργετικής δράσης τους.

Τα εκχυλίσματα από διάφορα αρωματικά φυτά έχει βρεθεί ότι είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά με ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ

αυτών επικρατούν τα φαινολικά οξέα, και τα φλαβονοειδή. Το ροσμαρινικό οξύ είναι το κυριότερο φαινολικό οξύ στα φυτά της οικογένειας Lamiaceae (ρίγανη, θρούμπι, θυμάρι, κλπ.) που είναι από τα πλουσιότερα σε αντιοξειδωτικά συστατικά, και ευρύτατα διαδεδομένα στην Ελλάδα. Επίσης, η κερκετίνη είναι ένα αντιπροσωπευτικό δραστικό φλαβονοειδές που βρίσκεται ελεύθερη ή με τη μορφή γλυκοζίτη σε αυτά τα φυτά. Η χρήση εκχυλισμάτων από αρωματικά φυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα γαλακτώματα ως αντιοξειδωτικό πρόσθετο, αλλά και ως πρόσθετο για την αναβάθμιση του τροφίμου σε λειτουργικό. Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα διπλωματική εξετάζεται η δράση εκχυλισμάτων του φυτού *Satureja Thymbra* και πρότυπων ουσιών που περιέχονται σε αυτά. Το ένα εκχύλισμα παρασκευάστηκε με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα και οι ενώσεις που ανακτηθήκαν με τη χρήση αυτού ήταν κυρίως μη πολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως η καρβακρόλη, η θυμόλη, η εριοδικτυόλη και η ναριγγενίνη. Αντίθετα στο δεύτερο εκχύλισμα, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ως διαλύτης, εντοπίστηκαν πιο πολικές ενώσεις. Η ένωση που κυριαρχεί σε αυτή τη περίπτωση είναι το ροσμαρινικό οξύ. Οι πρότυπες ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν η κερκετίνη, η οποία αποτελεί μη πολική ένωση και ανήκει στις ενώσεις που ανακτώνται με τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα σε αντίθεση με την αιθανόλη, καθώς και το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο αποτελεί πολική ένωση και βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού που μελετάται.

1. ΛΙΠΑΡΑ ΣΩΜΑΤΑ

1.1 Λιπαρά σώματα και οι δομικές μονάδες τους

Τα ζωικά λίπη και τα φυτικά έλαια αποτελούν τα πλέον διαδεδομένα λιπίδια. Παρόλο που φαίνονται διαφορετικά –τα ζωικά λίπη όπως το βούτυρο και το λαρδί είναι στερεά, ενώ τα φυτικά έλαια όπως το καλαμποκέλαιο και το αραχιδέλαιο είναι υγρά- οι δομές τους παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες. Από χημική άποψη, τα λίπη και τα έλαια είναι τριγλυκερίδια (ονομάζονται επίσης τριακυλογλυκερόλες), δηλαδή τριεστέρες της γλυκερόλης με καρβοξυλικά οξέα που φέρουν μακριές ευθείες ανθρακικές αλυσίδες. Η υδρόλυση ενός λίπους ή ελαίου με υδατικό διάλυμα NaOH, οδηγεί στο σχηματισμό γλυκερόλης και τριών λιπαρών οξέων. Τα τρία λιπαρά οξέα ενός τριγλυκεριδίου δεν είναι απαραίτητο να είναι τα ίδια και συνήθως ένα λίπος ή έλαιο συνίσταται από διαφορετικά τριγλυκερίδια (McMurry, 2012). Η, κατά μέσο όρο, σύσταση διάφορων λιπαρών, φυτικής και ζωικής προέλευσης, παρουσιάζεται στον πίνακα 1.1 .

Πίνακας 1.1 Περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα διάφορων λιπών και ελαίων

Προέλευση λιπαρού	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	Άλλα	Πηγή
Καλαμπόκι	-	13	3	31	52	1	-	(Gunstone, et al., 1994)
Βαμβάκι	-	27	2	18	51	Ίχνη	2	
Φιστίκι	-	13	3	38	41	Ίχνη	5	
Ελιά	-	10	2	78	7	1	2	
Φοίνικας	-	44	4	40	10	Ίχνη	2	
Κράμβη	-	4	2	56	26	10	3	
Σόγια	-	11	4	22	53	8	2	
Κοκοφοίνικας	18	10	3	6	2	-	61	(Hu & Jacobsen, 2016)
Κανόλα	-	4	2	62	22	10	-	
Χοίρος	2	27	11	44	11	-	5	(Gunstone, et al., 1994)
Μοσχάρι	3	27	7	48	2	-	13	
Σολωμός	6	15	3	19	3	2	52	(Frankel, et al., 2002)
Τόνος	4	20	6	18	2	2	48	

1.2 Ταξινόμηση λιπαρών σωμάτων

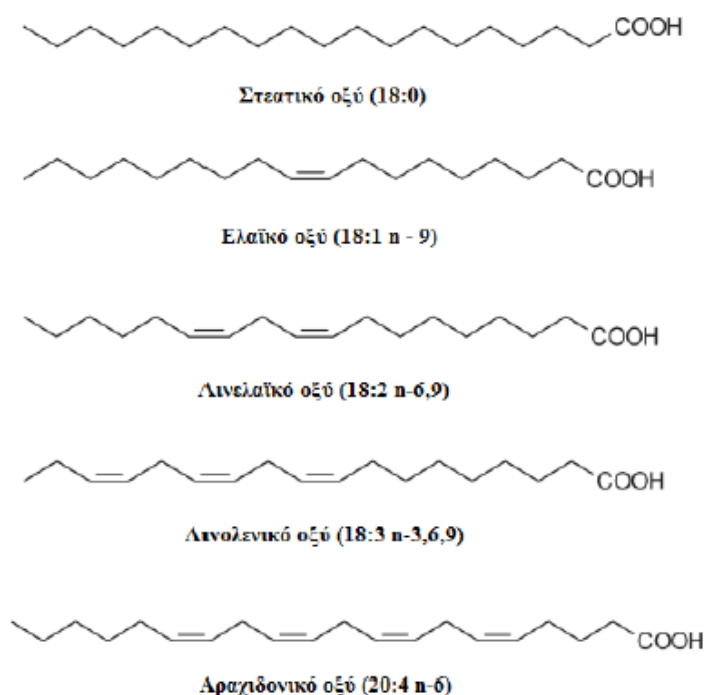
Η ταξινόμηση των λιπιδικών δομών είναι δυνατό να γίνει βασισμένη στις φυσικές τους ιδιότητες σε θερμοκρασία δωματίου (τα έλαια είναι υγρά και τα λίπη είναι στερεά), στη πολικότητα τους (πολικά και ουδέτερα λιπίδια), στη σημασία που έχουν για τον άνθρωπο (βασικά και μη απαραίτητα λιπαρά οξέα) ή στη δομή τους (απλά ή σύνθετα). Τα ουδέτερα λιπίδια περιλαμβάνουν τα λιπαρά οξέα, τις αλκοόλες, τα γλυκερίδια και τις στερόλες, ενώ τα πολικά τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τα γλυκερογλυκολιπίδια. Ο διαχωρισμός με βάση την πολικότητα είναι μάλλον αυθαίρετος, καθώς ορισμένα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας είναι πολύ πολικά. Συνήθως η ταξινόμηση των λιπαρών σωμάτων γίνεται με βάση τη δομή τους (Akoḥ & Min, 2002).

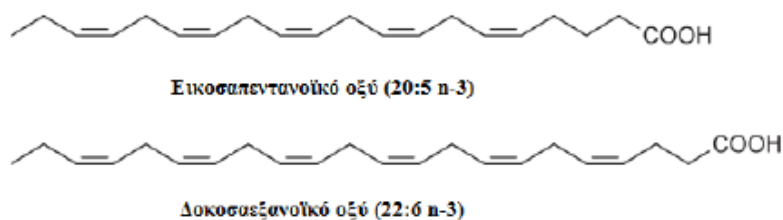
Με βάση τη δομή τους και σύμφωνα με τον Bloor (1943), τα λιπίδια ταξινομούνται σε παράγωγα, απλά ή σύνθετα. Τα παράγωγα λιπίδια είναι ουσίες που προέρχονται από απλά ή σύνθετα λιπίδια (συνήθως με υδρόλυση) και έχουν τις γενικές ιδιότητες των λιπιδίων, ή

απαντώνται ως έχουν μέσα σε λιπαρά σώματα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες (όπως η γλυκερίνη, μερικές ανώτερες αλειφατικές αλκοόλες, χοληστερόλη και άλλες στερόλες), οι υδρογονάνθρακες (π.χ. τερπένια), οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D,E,K) και οι στεροειδείς ορμόνες. Τα απλά λιπίδια (ουδέτερα λιπίδια) είναι εστέρες λιπαρών οξέων με αλκοόλες και κατά την υδρόλυση τους παρέχουν μόνο αλκοόλες και λιπαρά οξέα. Υποκατηγορίες των απλών λιπιδίων αποτελούν τα τριγλυκερίδια (εστέρες λιπαρών οξέων με γλυκερίνη) και οι κηροί (εστέρες λιπαρών οξέων με μονοσθενείς αλκοόλες σχετικά υψηλού μοριακού βάρους, εκτός της γλυκερίνης). Τέλος, τα σύνθετα λιπίδια είναι ενώσεις που περιέχουν και άλλες προσθετικές ομάδες σε ένα εστέρα λιπαρού οξέος και μια αλκοόλη, αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά την υδρόλυση τους να προκύπτουν λιπαρά οξέα, αλκοόλες και πρόσθετες ομάδες. Οι υποκατηγορίες που απαρτίζουν αυτή την ομάδα είναι τα φωσφολιπίδια ή φωσφατίδια (εστέρες που περιέχουν λιπαρά οξέα, φωσφορικό οξύ και άλλες ομάδες οι οποίες συνήθως περιέχουν άζωτο), τα γλυκολιπίδια ή σεροβροζίδια (ενώσεις που περιέχουν λιπαρά οξέα, ένα υδατάνθρακα και ένα αζωτούχο τμήμα, αλλά δεν περιέχουν φωσφορικό οξύ) και άλλα σύνθετα λιπίδια, όπως είναι τα σουλφολιπίδια και τα αμινολιπίδια (Τζιά, et al., 2009).

1.3 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν το σημείο εκκίνησης των λιπιδικών δομών και μπορούν να διακριθούν σε κορεσμένα και ακόρεστα. Στο σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η δομή ορισμένων βασικών κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Frankel, 2012).





Σχήμα 1.1 Δομή βασικών κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

1.3.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αρχίζουν με το μεθανοϊκό (μυρμηγκικό) οξύ. Το μεθανοϊκό, το αιθανικό και το προπανικό οξύ είναι ασυνήθιστα σε φυσικά λίπη, ωστόσο βρίσκονται σε μη εστεροποιημένη μορφή σε πολλά τρόφιμα. Τα λιπαρά οξέα που προαναφέρθηκαν με την προσθήκη, επιπλέον, του βουτυρικού οξέος (μεγάλης σημασίας για τα γαλακτοκομικά λίπη) είναι βραχείας αλυσίδας και υδατοδιαλυτά (Αkoh & Min, 2002). Τα πιο διαδεδομένα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι το παλμιτικό οξύ (C_{16}) και το στεατικό οξύ (C_{18}) (McMurtry, 2012). Η ονομασία και το μέγεθος της αλυσίδας ορισμένων κορεσμένων λιπαρών οξέων παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2 Μέγεθος και ονομασία ορισμένων κορεσμένων λιπαρών οξέων

Συντετμημένος προσδιορισμός	Επίσημη ονομασία	Κοινή ονομασία
1:0	Μεθανοϊκό οξύ	Φορμικό οξύ
2:0	Αιθανικό οξύ	Οξικό οξύ
3:0	Προπανικό οξύ	Προπιονικό οξύ
4:0	Βουτανοϊκό οξύ	Βουτυρικό οξύ
5:0	Πεντανοϊκό οξύ	Βαλερικό οξύ
6:0	Εξανοϊκό οξύ	Καπροϊκό οξύ
7:0	Επτανοϊκό οξύ	Ενανθικό οξύ
8:0	Οκτανοϊκό οξύ	Καπρυλικό οξύ
9:0	Εννεανοϊκό οξύ	Πελαργονικό οξύ
10:0	Δεκανοϊκό οξύ	Καπρικό οξύ
12:0	Δωδεκανοϊκό οξύ	Λαυρικό οξύ
14:0	Δεκατετρανοϊκό οξύ	Μυριστικό οξύ
16:0	Δεκαεξανοϊκό οξύ	Παλμιτικό οξύ
17:0	Δεκαεπτανικό οξύ	Μαργαρικό οξύ
18:0	Δεκαοκτανοϊκό οξύ	Στεατικό οξύ
20:0	Εικοσανοϊκό οξύ	Αραχιδικό οξύ

1.3.2 Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ (και τα δύο με C_{18}) είναι τα πλέον διαδεδομένα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Το ελαϊκό οξύ είναι μονοακόρεστο, δηλαδή περιέχει ένα μόνο διπλό δεσμό. Στη φύση έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 100 μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Από την άλλη το λινελαϊκό οξύ, το λινολενικό και το αραχιδονικό είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, επειδή περιέχουν πάνω από ένα διπλό δεσμό (Αkoh & Min, 2002). Οι διπλοί δεσμοί που φέρουν τα λιπαρά οξέα αυτής της κατηγορίας μπορεί να είναι από ένας μέχρι και έξι (Μπόσκος, 1997). Στον πίνακα 1.3 αναφέρονται στοιχεία ορισμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 1.3 Ονομασία και χαρακτηρισμός ορισμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων

Συντετημημένος προσδιορισμός	Χαρακτηρισμός	Κοινή ονομασία
14:1	Δ9	Μυριστελαϊκό οξύ
16:1	Δ9	Παλμιτελαϊκό οξύ
18:1	ω9	Ελαϊκό οξύ
18:2	ω6	Λινελαϊκό οξύ
18:3	ω6	Λινιλενικό οξύ
20:4	ω6	Αραχιδονικό οξύ
20:5	ω3	Εικοσιπεντενοϊκό οξύ
20:6	ω3	Εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ
22:1	ω9	Ερουκικό οξύ
24:1	ω9	Νερβονικό οξύ

1.3.3 Απαραίτητα ή ουσιώδη λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά χρησιμοποιούνται στη διατροφή κυρίως για την παροχή ενέργειας στον οργανισμό, αλλά προσφέρουν και λιποδιαλυτές βιταμίνες, ενώ λειτουργούν και ως παράγοντες γεύσης και υφής των τροφίμων. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα υπερέχουν έναντι των κορεσμένων. Το λινελαϊκό οξύ μαζί με το λινολενικό οξύ και το αραχιδονικό ανήκει στα ουσιώδη ή απαραίτητα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι απαραίτητα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα, καθώς η έλλειψη τους προκαλεί δερματικές παθήσεις.

Οι σπουδαιότερες κατηγορίες πολυακόρεστων οξέων είναι τα ω-3, ω-6 και ω-9 (με βάση τη θέση του διπλού δεσμού από το άκρο της αλυσίδας). Τα πολυακόρεστα λινελαϊκό και α-λινολενικό έχει αποδειχθεί ότι είναι «απαραίτητα» για τη διατροφή, επειδή δεν μπορούν να συντεθούν στον οργανισμό, και πρέπει να λαμβάνονται μέσω των τροφίμων. Ο οργανισμός μπορεί να παράγει από το λινελαϊκό οξύ ω-6 λιπαρά οξέα και από το α-λινολενικό οξύ ω-3 λιπαρά οξέα. Η απουσία αυτών των οξέων από τον οργανισμό σημαίνει ότι δεν θα παραχθούν τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα (Τζιά, et al., 2009).

1.4 Ρόλος των ελαίων και των λιπών στα τρόφιμα

Οι βασικές λειτουργίες των λιπαρών στα συστήματα τροφίμων περιλαμβάνουν τη θρεπτικότητα, την ανταλλαγή θερμότητας, την εμφάνιση, και τη δομή. Σε θερμικές διεργασίες, όπως το σοτάρισμα και το βαθύ τηγάνισμα, η ανταλλαγή θερμότητας αποτελεί κυρίαρχη λειτουργία. Σε άλλες εφαρμογές όπως στα φουρνιστά προϊόντα, στις επικαλύψεις και στα παγωτά, το είδος των λιπαρών που χρησιμοποιούνται επιδρά σημαντικά στη δομή τους. Σε όλες τις εφαρμογές, η οργανοληπτική συμπεριφορά είναι κυρίαρχο χαρακτηριστικό και επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από τα λιπαρά. Ανεξάρτητα από το είδος του λιπαρού που χρησιμοποιείται σε κάποιο τρόφιμο, ένας παράγοντας που επηρεάζει την ποιότητα και τον χρόνο ζωής του είναι η οξειδωση του λιπαρού. Όλα τα λιπαρά οξειδώνονται, αν ο παράγοντας αυτός δεν αντιμετωπιστεί κατάλληλα κατά τον σχεδιασμό του προϊόντος μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα στο τελικό προϊόν (Hu & Jacobsen, 2016).

1.5 Ηλιέλαιο

1.5.1 Παραγωγή

Το ηλιέλαιο είναι ένα από τα πιο δημοφιλή φυτικά έλαια. Παράγεται από τους σπόρους του φυτού ηλίανθος (*Helianthus annuus*). Οι ηλίανθοι αναπτύσσονται επαρκώς στις περισσότερες περιοχές του κόσμου, όμως η καλλιέργεια του φυτού είναι περιορισμένη λόγω του εδάφους, του ανταγωνισμού με παρόμοιες καλλιέργειες και εν μέρει λόγω του κλίματος (Gunstone, 2002). Το ηλιέλαιο είναι το πέμπτο σε παραγωγή μεταξύ των εδωδιμων φυτικών ελαίων. Η παραγωγή και η σύσταση του ελαίου εξαρτάται από την καλλιέργεια των ηλίανθων, έτσι αλλάζει ανάλογα με την εποχή και την τοποθεσία. Οι κορυφαίοι παραγωγοί ηλίανθων είναι στην Ευρώπη και στην Αμερική, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 50% της παγκόσμιας αγοράς. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Ρωσία, η Ουκρανία, οι χώρες της ΕΕ και η Αργεντινή (Caballero, et al., 2016).



Εικόνα 1.1 Το φυτό ηλίανθος (*Helianthus annuus*)

1.5.2 Σύσταση

Το τυπικό ηλιέλαιο εκτιμάται ανάμεσα στα υπόλοιπα φυτικά έλαια εξαιτίας της ήπιας γεύσης του, του φωτεινού χρώματος του, του υψηλού σημείου καπνού, της υψηλής ποσότητας λινελαϊκού οξέος και του χαμηλού περιεχόμενου λινολενικού οξέος.

Όπως λαμβάνεται με έκθλιψη και εκχύλιση με διαλύτη, το ακατέργαστο έλαιο περιέχει διάφορες προσμίξεις που πρέπει να αφαιρεθούν για να αποκτήσει τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν, καθώς επίσης και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Το ηλιέλαιο, σε αυτή τη φάση, αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (>98%) μαζί με ένα μικρό κλάσμα δευτερευόντων συστατικών όπως διαγλυκερόλες, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, αλειφατικές αλκοόλες, κηρούς, υδρογονάνθρακες, φαινολικές ενώσεις, καρτενοειδή, χλωροφύλλη, ιχνοστοιχεία, τοκοφερόλες και φυτοστερόλες (Force, et al., 2015).

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται ώστε να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες ουσίες και να προκύψει ένα προϊόν έτοιμο για χρήση είναι αποκομμίωση, χημική εξουδετέρωση, αποχρωματισμός, αποκήρωση και απόσπηση (Sanchez-Muniz & Cuesta, 2003). Η τυπική σύσταση ενός ηλιέλαιου που είναι έτοιμο για κατανάλωση παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.4:

Πίνακας 1.4 Σύσταση ηλιέλαιου σε λιπαρά οξέα σύμφωνα με (Merrill, et al., 2008)

Λιπαρό οξύ	Τυπικό ηλιέλαιο
14:0	<0,1
16:0	6,2
16:1	-
18:0	4,8
18:1	25,1
18:2	58,0
18:3	1,6
20:0	2,4
20:1	1,4
22:0	0,5
MUFA/PUFA ratio	0,4/1

1.5.3 Χρήση

Το ηλιέλαιο είναι ένα φυτικό έλαιο που εκτιμάται αρκετά για οικιακή χρήση στις Δυτικές χώρες, χρησιμοποιείται ως συστατικό στις σαλάτες αλλά προστίθεται και σε πολλές άλλες συνταγές ενώ επιλέγεται και ως λάδι τηγανίσματος (Caballero, et al., 2016). Ουσιαστικά το συγκεκριμένο λάδι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή οποιουδήποτε τροφίμου, τόσο σε οικιακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα (Gunstone, 2002). Παρόλα αυτά το ηλιέλαιο επειδή έχει χαμηλό σημείο τήξης (0°C), και άρα παραμένει διαυγές σε θερμοκρασίες ψύξης, χρησιμοποιείται, ως επί το πλείστον, για τη σύνθεση σαλτσών και γαλακτωμάτων που πρέπει να διατηρούνται κρύα. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως ως κύριο συστατικό σε μαργαρίνες. Αν και για αρκετές δεκαετίες, ο πληθυσμός που ζει κοντά στις ακτές της Μεσογείου συνεχίζει, ακόμα, να καταναλώνει σχετικά μεγάλη ποσότητα ελαιολάδου κυρίως για σκοπούς τηγανίσματος, ωστόσο, το ηλιέλαιο καθώς και άλλα φθηνότερα έλαια τείνουν να υποκαταστήσουν σε μεγάλο βαθμό το ελαιόλαδο (Caballero, et al., 2016).

2. ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

2.1 Εισαγωγή

Τα γαλακτώματα τροφίμων υπήρχαν πολύ πριν οι άνθρωποι αρχίσουν να επεξεργάζονται και να παρασκευάζουν καινούρια προϊόντα προς βρώση. Το γάλα, για παράδειγμα, είναι ένα φυσικό γαλάκτωμα το οποίο σταθεροποιείται σχηματίζοντας σφαιρικές μεμβράνες. Αυτές οι φυσικά σχηματισμένες μεμβράνες επιτρέπουν τη διασπορά των σταγονιδίων λίπους στο υδατικό περιβάλλον του γάλακτος. Η δημιουργία του βουτύρου, της χτυπημένης κρέμας, και του παγωτού στηρίχθηκαν στην ύπαρξη φυσικών γαλακτωματοποιητών στα διάφορα συστήματα. Η ανάπτυξη της μαγιονέζας στη Γαλλία ως κρύα σάλτσα πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας τα φυσικά φωσφολιπίδια των αυγών ώστε να διασπαρθεί το υγρό έλαιο στην οξινομένη υδατική φάση. Η γαλακτωματοποιητική ισχύς ήταν πολύ εντυπωσιακή, καθώς υπήρχαν περιπτώσεις όπου η διασπορά ελαίου ήταν ακόμα και σε συγκέντρωση 80% χωρίς να πραγματοποιείται αναστροφή του γαλακτώματος. Η εφεύρεση της μαργαρίνης από το Γάλλο χημικό Hippolyte Mege-Mouries το 1889 έγινε χρησιμοποιώντας στερεό ζωικό λίπος ώστε τελικά να παραχθεί στερεό γαλάκτωμα λιπαρής συνεχούς φάσεως, σκοπός του σχηματισμού αυτού ήταν να αποτελέσει ένα χαμηλού κόστους υποκατάστατο του βουτύρου. Σε αυτή τη περίπτωση, το γαλάκτωμα έπρεπε απλά να σταθεροποιηθεί προσωρινά έως ότου ψυχθεί. Πλέον η μαργαρίνη αποτελείται κυρίως από φυτικά λιπαρά. Κατά την αρχική χρήση των γαλακτωμάτων στη μαγειρική, το βούτυρο και οι ζυμοί χρησιμοποιήθηκαν στα τρόφιμα για να προσθέσουν αρώματα και να βοηθήσουν στο μαγείρεμα.

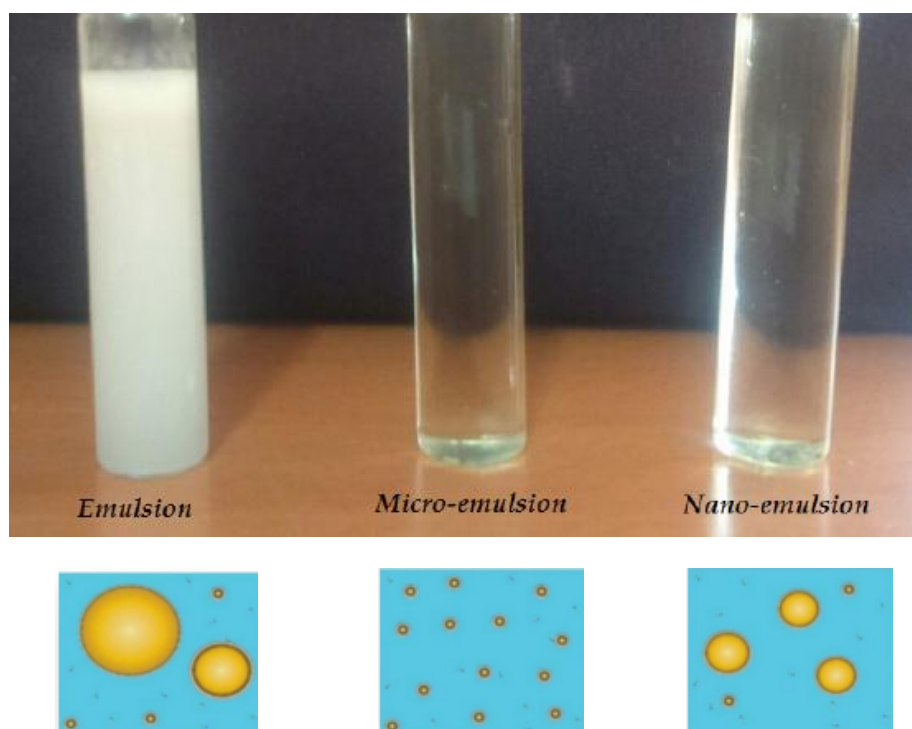
Ο σχηματισμός γαλακτωμάτων τροφίμων, μέχρι πρόσφατα, θεωρούνταν περισσότερο τέχνη παρά επιστήμη. Η πολυπλοκότητα των συστημάτων των τροφίμων υπήρξε εμπόδιο στη θεμελιώδη κατανόηση των γαλακτωμάτων. Οι επιστήμονες μελετούσαν, για πολλά χρόνια, τα γαλακτώματα χρησιμοποιώντας καθαρό νερό, υδρογονάνθρακες και επιφανειοδραστικές ουσίες, αλλά τα τρόφιμα αποτελούν περίπλοκα μείγματα υδρογονανθράκων, λιπιδίων, πρωτεϊνών, αλάτων και οξέων. Κάποια επιφανειοδραστικά συστατικά μάλιστα, όπως οι πρωτεΐνες και τα φωσφολιπίδια, μπορούν να επιδείξουν είτε συνεργιστική είτε ανταγωνιστική δράση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή στην τελική μορφή του προϊόντος (Hasenhuettl & Hartel, 2008).

2.2 Κατηγοριοποίηση γαλακτωμάτων

Ως γαλάκτωμα ορίζεται ένα κολλοειδές σύστημα δύο ή περισσότερων μη μιγνυομένων υγρών στο οποίο ένα εξ' αυτών βρίσκεται σε διασπορά, με τη μορφή σταγονιδίων, σε ένα άλλο. Το υγρό σε διασπορά αναφέρεται ως ασυνεχής ή εσωτερική φάση, ενώ η υδατική φάση ως συνεχής ή εξωτερική. Στα περισσότερα τρόφιμα που αποτελούν γαλακτώματα, τις δύο φάσεις αποτελούν συνήθως το νερό και το έλαιο (Σπηλιοπούλου, 2014). Ανάλογα με την αναλογία νερού και ελαίου τα γαλακτώματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: το έλαιο σε νερό (o/w), το νερό σε έλαιο (w/o) και το έλαιο σε έλαιο (o/o). Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν συστήματα τα οποία περιέχουν ένα πολικό έλαιο (π.χ. προπυλενογλυκόλη) διασπαρμένο σε ένα μη πολικό (π.χ. παραφινέλαιο) και αντίστροφα.

Τα γαλακτώματα μπορούν να χαρακτηριστούν, επίσης, με βάση τη δομή τους. Τα στοιχεία που ελέγχονται είναι το μέγεθος των σταγονιδίων που σχηματίζονται και τα υλικά που συμμετέχουν. Σύμφωνα με αυτά τα χαρακτηριστικά υπάρχουν πέντε κατηγορίες.

1. Μακρογαλακτώματα *o/w* και *w/o*: Συνήθως το μέγεθος των σταγονιδίων κυμαίνονται μεταξύ 0,1-5 μm με μέσο όρο 1-2 μm .
2. Γαλακτώματα μικκυλίων ή μικρογαλακτώματα: αυτά συνήθως έχουν μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 5-50 nm. Αυτά είναι και θερμοδυναμικά σταθερά.
3. Νανογαλακτώματα: αυτά συνήθως έχουν μέγεθος από 20 nm έως 100 nm. Παρόμοια με τα μακρογαλακτώματα, αυτά τα γαλακτώματα είναι μόνο κινητικά σταθερά.
4. Διπλά και πολλαπλά γαλακτώματα: αυτά είναι γαλακτώματα γαλακτωμάτων, *w/o/w* και *o/w/o* συστήματα.
5. Μικτά γαλακτώματα: αυτά είναι συστήματα τα οποία αποτελούνται από δύο διαφορετικές διασπορές, οι οποίες δεν αναμειγνύονται με το συνεχές μέσο (Tadros, 2013).



Εικόνα 2.1 Η εμφάνιση των διαφορετικών γαλακτωμάτων και το μέγεθος των σταγονιδίων (Γαδ, 2015)

2.3 Παρασκευή γαλακτωμάτων

Με την πρώτη ματιά η δημιουργία ενός γαλακτώματος φαίνεται να είναι μια απλή διαδικασία. Όταν δύο μη αναμίξιμα υγρά διασκορπίζονται με έντονη ανάδευση τότε δημιουργείται ένα γαλάκτωμα. Εάν τα δύο υγρά είναι νερό και έλαιο, σχηματίζεται ή *w/o* ή *o/w* γαλάκτωμα, το είδος εξαρτάται από την αναλογία των συστατικών. Επειδή η ελεύθερη ενέργεια του γαλακτώματος είναι υψηλότερη από αυτή των δύο υγρών, οι φάσεις θα διαχωριστούν πάλι απελευθερώνοντας ενέργεια. Για να σταθεροποιηθούν αυτά τα συστήματα, για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα χρησιμοποιούνται οι

γαλακτωματοποιητές οι οποίοι καθυστερούν το διαχωρισμό των φάσεων, κάνοντας θερμοδυναμικά σταθερότερο το γαλάκτωμα. Η επιλογή του γαλακτωματοποιητή είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό του γαλακτώματος και τη μακροχρόνια σταθερότητα του.

Η διαδικασία παραγωγής γαλακτώματος μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά βήματα:

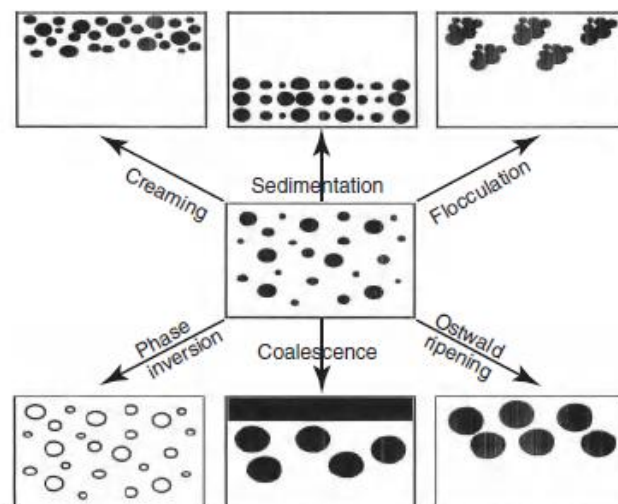
1. Προ-γαλακτωματοποίηση
2. Γαλακτωματοποίηση
3. Σταθεροποίηση

Στο στάδιο της προ-γαλακτωματοποίησης οι δύο φάσεις συνδυάζονται σε υψηλή θερμοκρασία με ανάδευση, σχηματίζοντας ένα ακατέργαστο γαλάκτωμα (προμείγμα) με μεγάλα σταγονίδια. Αυτά υφίστανται εξωτερική διάτμηση στο επόμενο βήμα της γαλακτωματοποίησης και το μέγεθος τους μειώνεται. Η διαδικασία γαλακτωματοποίησης εμπεριέχει τη διάσπαση των σταγονιδίων και την διαβροχή των σχηματιζόμενων διεπιφανειών, οι οποίες δεν καλύπτονται πλήρως από γαλακτωματοποιητή αμέσως μετά τη μείωση του μεγέθους. Η προσρόφηση περισσότερων επιφανειοδραστικών μορίων απαιτεί χρόνο και εξαρτάται από την κινητική διαβροχής του χρησιμοποιούμενου συστήματος γαλακτωματοποιητή. Η πυκνότητα κάλυψης επηρεάζει, όχι μόνο την διεπιφανειακή τάση και επομένως και την ενέργεια που απαιτείται για τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, αλλά επίσης και τη σταθερότητα των δημιουργούμενων σταγονιδίων.

Τα ανεπαρκώς σταθεροποιημένα σταγονίδια μπορούν να συγχωνευθούν κατά την πρόσκρουση με άλλα σταγονίδια, εάν ο χρόνος επαφής είναι αρκετά μεγάλος. Η συγχώνευση μπορεί να αποφευχθεί εάν οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των σταγονιδίων είναι αρκετά υψηλές. Αυτές οι απωθητικές δυνάμεις ασκούνται από τα προσροφημένα μόρια γαλακτωματοποιητή. Η διασπορά των μορίων αυτών, τα οποία δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια των σταγονιδίων, επιβραδύνει την αποξήρανση της μεμβράνης και σταθεροποιεί τα σταγονίδια, ακόμα και αν η επιφάνεια δεν είναι πλήρως καλυμμένη. Η μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων καθώς και η συνένωση των θραυσμάτων, από τα οποία προκύπτουν σταγονίδια τα οποία δεν έχουν σταθεροποιηθεί ακόμα, καθορίζουν τα αποτελέσματα της γαλακτωματοποίησης και τη διασπορά του σχηματιζόμενου γαλακτώματος (Brummer, 2006).

2.4 Σταθεροποίηση

Ο όρος «σταθερότητα γαλακτώματος» αναφέρεται στην ικανότητα ενός γαλακτώματος να αντιστέκεται στις μεταβολές των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων με την πάροδο του χρόνου. Κατά την αποθήκευση τα συστήματα αυτά είναι πιθανό να εμφανίσουν φαινόμενα αποσταθεροποίησης, η εμφάνιση αυτών εξαρτάται από χαρακτηριστικά του ίδιου του γαλακτώματος όπως από την κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων και την διαφορά πυκνότητας μεταξύ των σταγονιδίων και του κύριου μέσου. Τα φαινόμενα που μπορούν να εμφανιστούν είναι η αποκορύφωση, η κροκίδωση, η ωρίμανση Ostwald, η συνένωση και η αντιστροφή φάσης. Οι διάφορες διαδικασίες αποσταθεροποίησης απεικονίζονται στην εικόνα 2.2 .

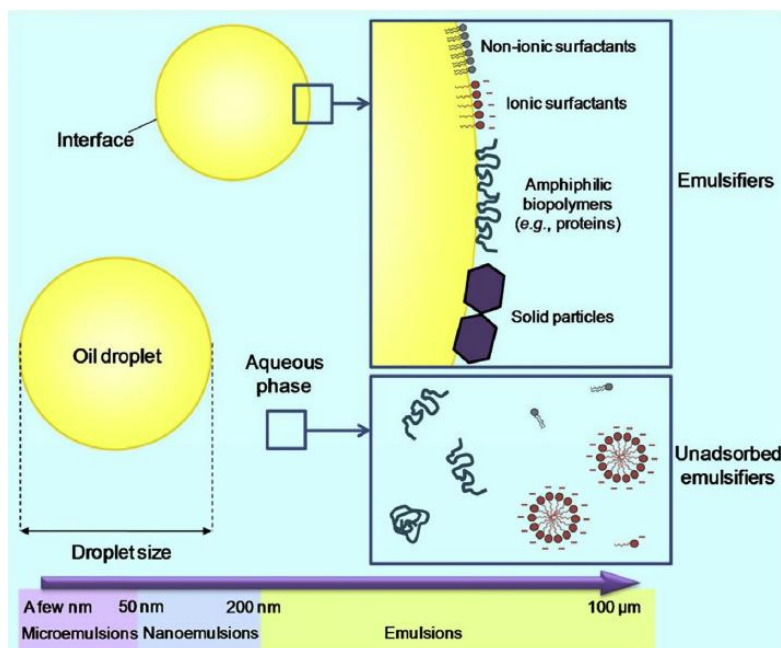


Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αποσταθεροποίησης των γαλακτωμάτων

Τα γαλακτώματα από θερμοδυναμικής άποψης είναι ασταθή συστήματα, ενώ κατά τη διάρκεια της παρασκευής, μεταφοράς, αποθήκευσης και χρήσης τους επηρεάζονται από εξωτερικούς φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς παράγοντες. Οι συνθήκες στις οποίες εκτίθενται αυτά τα συστήματα είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ορατές αλλαγές στο γαλάκτωμα. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε θερμοκρασία, έκθεση στο φως, εξωτερική πίεση κ.α. Εάν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών ή κάποιου συστατικού με το υλικό της συσκευασίας, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αστάθειες λόγω χημικών αντιδράσεων. Ζυμομήκητες, βακτήρια και μούχλα επηρεάζουν τη μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος (Brummer, 2006).

Η σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων έτσι ώστε να αποφευχθεί ο άμεσος διαχωρισμός της λιπαρής και της υδατικής φάσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με φυσικό τρόπο. Για παράδειγμα σημαντική επίδραση στην σταθερότητα των γαλακτωμάτων τροφίμων έχουν τα άλατα και το pH τα οποία κυμαίνονται σε ένα αρκετά ευρύ (Márquez, et al., 2010)(Tokle & McClements, 2011). Άλλα συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες, συμβάλλουν στην επιφανειακή δραστηριότητα και μπορούν να μεταβάλλουν δραματικά τον χαρακτήρα του γαλακτώματος (Xu, et al., 2012). Η σταθεροποίηση με φυσικό τρόπο παρέχεται από έναν τροποποιητή υφής (υδροκολλοειδές), από γαλακτωματοποιητικούς παράγοντες ή στερεά σωματίδια (παράγοντες συλλογής, pickering agents) όπως φαίνεται στο σχήμα 2.3 (Hu & Jacobsen, 2016).

Οι τρεις μηχανισμοί που εμπλέκονται, συνήθως, κατά τη διάρκεια σταθεροποίησης των γαλακτωμάτων τροφίμων είναι οι ηλεκτροστατικές, οι στερεοχημικές επιδράσεις και η σταθερότητα των σωματιδίων. Η προσθήκη γαλακτωματοποιητών προστατεύει τα σωματίδια από τη συσσωμάτωση. Οι μικρού μεγέθους γαλακτωματοποιητές χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον για να προσδώσουν προσωρινή σταθερότητα, ενώ οι μεγάλοι μεγέθους λειτουργούν καλύτερα σε μακροπρόθεσμη βάση (Brummer, 2006).



Εικόνα 2.3 Μόρια που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές

2.5 Γαλακτωματοποιητές

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αναπτύξει κανονισμούς για τα πρόσθετα τροφίμων που χρησιμοποιούν τα κράτη μέλη της. Οι ουσίες χωρίζονται σε τρεις ομάδες. Η κατηγοριοποίηση είναι η ακόλουθη: χρωστικές ουσίες, γλυκαντικά, πρόσθετα τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών. Στην τελευταία κατηγορία υπάγονται διάφορα πρόσθετα τα οποία μπορούν να δρουν ως συντηρητικά, αντιοξειδωτικά, γαλακτωματοποιητές-σταθεροποιητές, πηκτωματογόνα, ενισχυτικά γεύσης, διαλύτες φορείς κ.α. (ΕΕ, 2011)

Οι γαλακτωματοποιητές είναι επιφανειοδραστικά μόρια με αμφιφιλικές ιδιότητες τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν στη διεπιφάνεια της υδατικής και της λιπαρής φάσης και να μειώσουν την επιφανειακή τάση. Οι γαλακτωματοποιητές χαμηλού μοριακού βάρους περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μικρών αμφιφιλικών ενώσεων όπως φωσφολιπιδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, μόνο- και διακυλογλυκερολών, εστέρες πολυοξυαιθυλενοσορβιτάνης, πολυσορβικά, εστέρες σορβιτάνης (Sprans), εστέρες σουκρόζης, εστέρες κιτρικού, λακτικού και ακετικού οξέος. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι ανιονικές, κατιονικές, αμφοτερικές ή μη ιονικές. Οι γαλακτωματοποιητές υψηλού μοριακού βάρους περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, αυτές παρέχουν διεπιφανειακή δράση λόγω της παρουσίας υδρόφιλων και υδρόφοβων ομάδων που διανέμονται κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Όταν προσροφηθούν στη διεπιφάνεια, οι πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα ισχυρά ιξωδοελαστικό φιλμ γύρω από το σταγονίδιο και αποκτούν συγκεκριμένη διάταξη, αυτή επιτρέπει στο υδρόφοβο κομμάτι να εγκλείσει το έλαιο και στο υδρόφιλο την υδατική φάση. Οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι σε ευθεία (π.χ. καζεΐνη) ή σε σφαιρική διαμόρφωση (π.χ. πρωτεΐνες ορού γάλακτος) στη διεπιφάνεια.

Στα γαλακτώματα τροφίμων, διάφοροι γαλακτωματοποιητές και παράγοντες τροποποίησης της υφής χρησιμοποιούνται μαζί για την παροχή φυσικής σταθεροποίησης. Για παράδειγμα, στη μαγιονέζα χρησιμοποιούνται κρόκοι αυγών, που αποτελούνται τόσο από πρωτεΐνες όσο και από φωσφολιπίδια, μαζί με υδροκolloειδή όπως κόμμι γκουάρ και κόμμι ξανθάνης για τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος (Hu & Jacobsen, 2016).

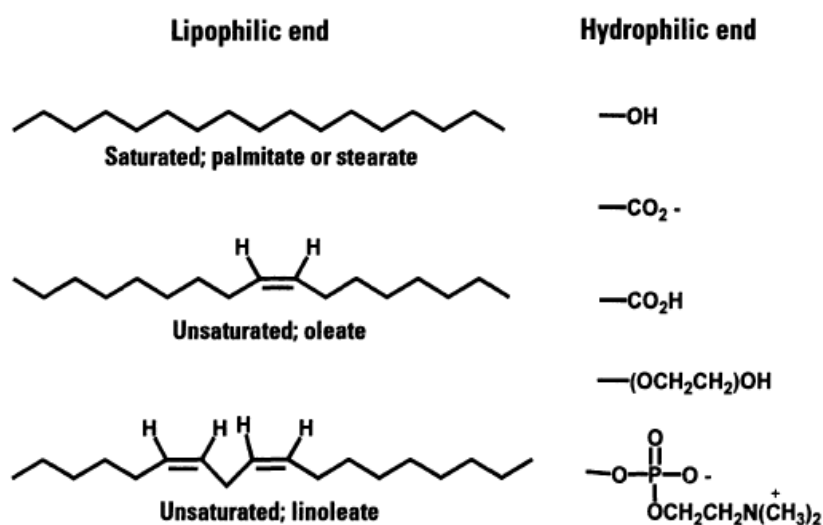
Σύμφωνα με τη σχετική Νομοθεσία (περί Ποικίλων Ουσιών στα Τρόφιμα Κανονισμοί) απαγορεύεται σε μη επεξεργασμένα τρόφιμα η προσθήκη γαλακτωματοποιητών-σταθεροποιητών, ενώ σε κάποια άλλα τρόφιμα η προσθήκη τους είναι περιορισμένη. Τέλος, ορισμένοι γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές μπορούν να προστίθενται μόνο σε συγκεκριμένα τρόφιμα. Παρακάτω παρουσιάζονται, ενδεικτικά, κάποιοι γαλακτωματοποιητές και τυπικά προϊόντα στα οποία χρησιμοποιούνται (Ιωάννου-Κακούρη, et al., 2008).

Πίνακας 2.1 Γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και άλλες ιδιότητες τους

Όνομασία	Αρ. Εκ	Άλλες ιδιότητες	Χρήση σε τρόφιμα
Λεκιθίνες	E322	Σταθεροποιητές	Σοκολάτα και προϊόντα σοκολάτας, σταρένιο ψωμί, σκόνη γάλακτος κ.α.
Φωσφορικά άλατα καλίου	E340	Ρυθμιστής οξύτητας, Αύξηση αντιοξειδωτικής δράσης	Ανακατεργασμένο τυρί και απομιμήσεις ανακατεργασμένου τυριού, προϊόντα κρέατος
Αλγινική προπανοδιόλη 1,2	E405	Πηκτωματογόνο	Σάλτσες
Κόμμι καράγια	E416	Πηκτωματογόνο	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Μονολαυρική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Polysorbate 20)	E432	-	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Μονοπαλμιτική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Polysorbate 40)	E433	Αντιαφριστικό	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Μονοελαϊκή πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Polysorbate 80)	E434	Αντιαφριστικό	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Μονοστεατική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Polysorbate 60)	E435	Αντιαφριστικό	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Τριστεατική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνη (Polysorbate 65)	E436	Αντιαφριστικό	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες
Άλατα του πυροφωσφορικού οξέος	E450	Βελτιωτικά υφής, ρυθμιστές οξύτητας, διογκωτικά μέσα	Σάλτσες, σούπες και ζωμώ, ποτά σοκολάτας και βύνης με βάση γαλακτοκομικά προϊόντα
Τριστεατική σορβιτάνη	E492	-	Γαλακτωματοποιημένες σάλτσες

2.5.1 Δομή γαλακτωματοποιητών

Οι γαλακτωματοποιητές αποτελούνται από μια υδρόφιλη κεφαλή, η οποία προσελκύει την υδατική φάση, και μια συχνά μεγαλύτερη λιπόφιλη ουρά, η οποία προτιμά να βρίσκεται σε επαφή με τη λιπαρή φάση. Έτσι, η επιφανειοδραστική ουσία προσανατολίζεται είτε στη διεπιφάνεια αέρα/νερού είτε ελαίου/νερού. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζονται κάποιες τυπικές υδρόφιλες και λιπόφιλες ομάδες. Οι λιπόφιλες ουρές συντίθενται από C16 (παλμιτικό) ή μεγαλύτερα λιπαρά οξέα. Οι υδρόφιλες κεφαλές έχουν μεγάλη ποικιλία. Αυτές μπορεί να προστεθούν ώστε να παραχθούν ανιονικές, κατιονικές, αμφοτερικές ή μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Hasenhuettl & Hartel, 2008).

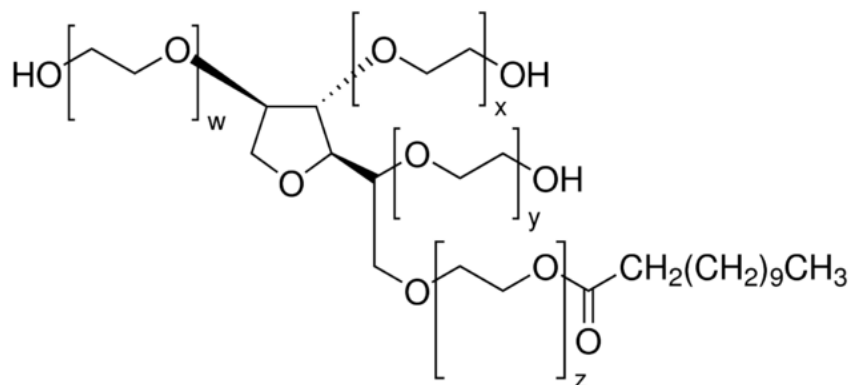


Εικόνα 2.4 Χαρακτηριστικές υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες που απαντώνται σε γαλακτωματοποιητές

Οι γαλακτωματοποιητές τροφίμων διαφέρουν μεταξύ τους σε αρκετά σημεία, η δομή τους μπορεί να είναι διαφορετική, όπως και ο αριθμός κεφαλών και ουρών στο μόριο τους που κυμαίνονται σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος. Ένα πολύ χρήσιμο μέγεθος χαρακτηρισμού των ενώσεων αυτών είναι ο λόγος υδρόφιλης/λιπόφιλης ισορροπίας (HLB). Ο αριθμός και η σχετική πολικότητα των υδρόφιλων ομάδων είναι καθοριστικοί παράγοντες για το αν μια επιφανειοδραστική ουσία είναι διαλυτή στη λιπαρή ή στην υδατική φάση.

2.5.2 Tween 20

Τα πολυσορβικά, γνωστά και ως Tweens, είναι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ενώσεις που αποτελούνται από λιπαρά οξέα ενωμένα με πολυαιθοξυλιωμένη σορβιτάνη. Λόγω της μη ιοντικής φύσης τους τα πολυσορβικά είναι λιγότερο τοξικά από άλλες συμβατικές επιφανειοδραστικές ενώσεις, για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ως απορρυπαντικά και ως διαλυτοποιητές ή γαλακτωματοποιητές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (Kerwin, 2008).



Εικόνα 2.5 Δομή του Tween 20

Το Tween 20 (μονολαυρική πολυοξυαιθυλενο(20)σορβιτάνη) χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση ο/ω γαλακτωμάτων. Αυτό μπορεί, επίσης, να προσροφηθεί γρήγορα στην επιφάνεια των σταγονιδίων του ελαίου και να μειώσει την επιφανειακή τάση αποφεύγοντας τη συγχώνευση των σταγονιδίων. Το Tween 20 έχει καλύτερη διαλυτότητα από τα υπόλοιπα πολυσορβικά (Teo, et al., 2016).

2.6 Γαλακτώματα τροφίμων

Τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό (ο/ω) και νερού σε έλαιο (w/o) είναι σημαντικές κολλοειδείς δομές στα προϊόντα διατροφής, καθώς πολλά τρόφιμα υπάρχουν ως γαλακτώματα ή υπήρξαν σε αυτή τη μορφή κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους. Τα γαλακτώματα ελαίου σε νερό όπως το γάλα, η μαγιονέζα και οι σάλτσες σαλάτας (dressings) αποτελούν μια ιδιαίτερα μεγάλη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα τέτοιων σύνθετων ετεροφασικών συστημάτων τροφίμων, σε μεγάλες ποσότητες καταναλώνονται βέβαια και τα γαλακτώματα νερού σε έλαιο όπως η μαργαρίνη και το βούτυρο (Hu & Jacobsen, 2016).

Το γαλάκτωμα πρέπει να είναι σταθερό μέχρι τη στιγμή κατανάλωσης του, με άλλα λόγια πρέπει να είναι σταθερό στο ράφι. Αυτό ισχύει για όλα τα γαλακτώματα, αν και υπάρχει σημαντική διακύμανση, ανάμεσα στα διαφορετικά τρόφιμα, στο χρονικό διάστημα στο οποίο πρέπει να διατηρηθούν σταθερά. Γενικά, αυτό περιορίζεται από τη μικροβιολογική σταθερότητα του συγκεκριμένου προϊόντος, για παράδειγμα τα παστεριωμένα γαλακτώματα, όπως το γάλα και οι κρέμες, μπορεί να έχουν διάρκεια ζωής μια με δύο βδομάδες, αντιθέτως τα αποστειρωμένα γαλακτώματα όπως τα κρεμώδη λικέρ μπορεί να είναι σταθερά για παραπάνω από ένα χρόνο. Σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια ζωής το προϊόν να μην εμφανίζει σημάδια αστάθειας ή διαχωρισμού φάσεων. Επίσης, το γαλάκτωμα πρέπει να σχεδιαστεί έτσι ώστε η εφαρμογή του να γίνεται με συγκεκριμένο τρόπο (Lakkis, 2007).

2.6.1 Μαγιονέζα και σάλτσες

Τα έλαια σαλάτας, που χρησιμοποιούνται, επίσης, για τη δημιουργία μαγιονέζας και άλλων dressings για σαλάτες, πρέπει να είναι οξειδωτικά σταθερά και απαλλαγμένα από στερεά ακόμα και όταν φυλάσσονται στους 4 °C. Πολλά φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό. Αυτά που περιέχουν λινολενικό οξύ (σογιέλαιο, κραμβέλαιο) είναι συνήθως ελαφρά υδρογονωμένα για την ενίσχυση της οξειδωτικής σταθερότητας τους. Ορισμένα

έλαια που προέρχονται από εκχύλιση με διαλύτες φυτών καθαρίζονται από τα υψηλού σημείου τήξης γλυκερίδια, καθώς επίσης και από κεριά που υπάρχουν σε αυτά. Τα τελευταία οδηγούν, συνήθως, σε θολά συστήματα όταν ψυχθούν. Τα έλαια που χρησιμοποιούνται για τις εφαρμογές που προαναφέρθηκαν περνάνε μια «ψυχρή δοκιμή», η οποία απαιτεί το λάδι να παραμείνει διαυγές για 5,5 ώρες σε θερμοκρασία ψύξης.

Εν τέλει μετά από κατάλληλη επεξεργασία το σογιέλαιο, το κραμβέλαιο, το καλαμποκέλαιο και το ηλιέλαιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παρασκευή μαγιονέζας. Η μαγιονέζα είναι ένα ο/ω γαλάκτωμα το οποίο περιέχει 65% - 80% έλαιο. Η υδατική φάση περιέχει ξίδι, κίτρινο οξύ, κρόκο αυγού και λεκιθίνη, η οποία δρα ως γαλακτωματοποιητής. Χυμός λεμονιού ή λάιμ, αλάτι, κάποιο σιρόπι και αντιοξειδωτικά μπορούν να προστεθούν προαιρετικά. Τα συστατικά αυτά μπορούν να αναμιχθούν σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5 °C (ψυχρή διαδικασία) ή των 70 °C (θερμή διαδικασία). Μια τυπική μαγιονέζα περιέχει φυτικό έλαιο (75-80% κατά βάρος), ξίδι (9,4-10,8%), κρόκο αυγού (7-9%) και μικρές ποσότητες ζάχαρης, αλατιού, μουστάρδας και πιπεριού. Σε light μαγιονέζες το ποσοστό του ελαίου κυμαίνεται από 30 έως 40%, ενώ σε χαμηλών θερμίδων σάλτσες το επίπεδο μπορεί να είναι 10% ή και λιγότερο από 3%.

Οι σάλτσες που ετοιμάζονται για σαλάτες είναι παρόμοιες με τη μαγιονέζα αλλά περιέχουν πολύ λιγότερο λάδι (30-40%), αμυλούχες ενώσεις, γαλακτωματοποιητές και κόμμεα που παρέχουν σταθερότητα, ενώ είναι φθηνότερες από τη μαγιονέζα (Akoḥ & Min, 2002). Συνήθως οι καταναλωτές ανακινούν τα μπουκαλάκια που περιέχουν αυτά τα μείγματα πριν από τη χρήση τους ώστε να προκύψουν τα γαλακτώματα, ενώ σε αυτά χρησιμοποιούνται πολυσορβικά ή DATEM για να ενισχύσουν τη γαλακτωματοποίηση (Caballero, et al., 2016).

3. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΥΛΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Τα βρώσιμα έλαια αποτελούνται περίπου από 96% τριγλυκερίδια, προερχόμενα από διαφορετικά λιπαρά οξέα και κάποια άλλα συστατικά ή ομάδες συστατικών, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, φυτοστερόλες, και κάποια αντιοξειδωτικά (Decker, et al., 2010). Τα συστατικά των αλκυλολιπιδίων, όπως το ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ, έχουν μια ή περισσότερες αλκυλικές ομάδες μέσα στο μόριο του λιπαρού οξέος. Τα ακόρεστα ακυλο λιπίδια δεν μπορούν να θεωρηθούν σταθερά συστατικά των τροφίμων αφού οξειδώνονται εύκολα σε υδροϋπεροξειδία. Το πρόβλημα είναι ότι αυτά τα προϊόντα είναι γενικά ασταθή, προκαλώντας το σχηματισμό των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπως οι κετόνες, οι αλδεΐδες, οι αλκοόλες, οι υδρογονάνθρακες, οι εστέρες και άλλες. Κάποια από τα πολυάριθμα πτητικά δευτερογενή προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι οι οσμηρές καρβονυλικές ενώσεις, η μηλο*νική διαλδεΐδη, τα αλκάνια και αλκένια (Belitz, et al., 2011). Τα σημαντικότερα από αυτά τα προϊόντα είναι οι βραχείας αλυσίδας ακόρεστες αλδεΐδες λόγω της δραστηριότητας της αλδεϋδομάδας (Bartosz, 2014). Επειδή ορισμένες από αυτές τις ενώσεις έχουν πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης στη γεύση ή στην οσμή, η υποβάθμιση του προϊόντος γίνεται γρήγορα αντιληπτή (Hu & Jacobsen, 2016). Έτσι η υπεροξειδωση των λιπιδίων ανιχνεύεται ακόμη και στα τρόφιμα όπου ακόρεστα ακυλολιπίδια βρίσκονται ως δευτερεύοντα συστατικά, ή στα τρόφιμα στα οποία μόνο μια μικρή μερίδα των λιπιδίων υποβλήθηκε σε οξείδωση.

3.2 Αυτοοξείδωση

Η αυτοοξείδωση είναι αρκετά σύνθετη και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αλληλένδετων αντιδράσεων ενδιάμεσων προϊόντων. Κατά της διάρκεια της αυτοοξείδωσης τα αρχικά προϊόντα είναι ανιχνεύσιμα μόνο μετά από μια ορισμένη περίοδο αποθήκευσης, η περίοδος αυτή ονομάζεται περίοδος επώασης και είναι χαρακτηριστική για μια δεδομένη διαδικασία αυτοοξείδωσης, μετά το πέρας αυτής της περιόδου εμφανίζεται μια απότομη άνοδος στην ταχύτητα αντίδρασης.

Το μήκος της περιόδου επώασης και η ταχύτητα οξείδωσης εξαρτώνται, μεταξύ άλλων, από τη σύσταση των λιπαρών οξέων του λιπιδίου. Όσο περισσότερες αλκυλικές ομάδες υπάρχουν, τόσο βραχύτερη είναι η περίοδος επώασης και τόσο υψηλότερη η ταχύτητα οξείδωσης. Και τα δύο φαινόμενα, η περίοδος επώασης και η άνοδος στην ταχύτητα αντίδρασης στη σειρά, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ μπορούν να εξηγηθούν ως εξής: η οξείδωση προχωρά με διαδοχικό, ελεύθερων ριζών, μηχανισμό αλυσιδωτής αντίδρασης. Σχηματίζονται σχετικά σταθερές ρίζες που μπορούν να αφαιρέσουν άτομα H από τις ενεργοποιημένες ομάδες μεθυλενίου σε μια ολεφινική ένωση (Belitz, et al., 2011). Οι ελεύθερες ρίζες που εντοπίζονται πιο συχνά είναι οι ρίζες του διοξειδίου και του υπεροξειδίου, με πιο δραστική αυτή του υπεροξειδίου. Ως ελεύθερη ρίζα θεωρείται επίσης και η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (Bartosz, 2014).

Ο μηχανισμός που έχει προταθεί από τους Farmer et al. (1942) και Bolland (1949) για τις ολεφίνες και, επομένως, για τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχει διάφορα θεμελιώδη βήματα. Η διαδικασία οξείδωσης είναι ουσιαστικά μια προκληθείσα από ρίζες αλυσιδωτή αντίδραση που χωρίζεται σε στάδια, στην έναρξη (εκκίνηση), διάδοση, και τερματισμό. Η αυτοοξείδωση

αρχίζει από ελεύθερες ρίζες συχνά άγνωστης προέλευσης. Μετρούμενες και υπολογιζόμενες σταθερές της ταχύτητας αντίδρασης για τα διαφορετικά στάδια της ριζικής αλυσιδωτής αντίδρασης δείχνουν ότι λόγω της σταθερότητας των υπεροξειδικών ελεύθερων ριζών ($ROO\cdot$) ολόκληρη η διαδικασία περιορίζεται από τη μετατροπή αυτών των ελεύθερων ριζών σε μόρια μονοϋδοξυ-υπεροξειδίων ($ROOH$). Αυτή η αντίδραση γίνεται με απομάκρυνση ενός ατόμου H από ένα μόριο λιπαρού οξέος (στάδιο 2). Η αφαίρεση H είναι η πιο αργή και, ως εκ τούτου, το ελέγχον στάδιο της ταχύτητας στο σχηματισμό της ρίζας ($R\cdot$). Η υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων επιτυγχάνεται με αυτοκατάλυση από ρίζες που παράγονται από την αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων από ένα μονομοριακό μηχανισμό αντίδρασης (στάδιο 4). Αυτή η αντίδραση προκαλείται από ιόντα βαρέων μετάλλων ή μόρια που περιέχουν αίμη. Επίσης, η αποικοδόμηση των υδρο-υπεροξειδίων θεωρείται η αφετηρία για το σχηματισμό των πτητικών προϊόντων της αντίδρασης.

Μετά από λίγο, η συγκέντρωση των υδροϋπεροξειδίων φθάνει σε επίπεδο στο οποίο αρχίζει να παράγει ελεύθερες ρίζες με έναν διμοριακό μηχανισμό αποικοδόμησης (στάδιο 5). Η αντίδραση αυτή είναι εξώθερμη, αντίθετα από την ενδόθερμη μονομοριακή αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων (στάδιο 4) που χρειάζεται περίπου 150 kJ/mol. Εντούτοις, στα περισσότερα τρόφιμα, το στάδιο 5 είναι άνευ σημασίας, δεδομένου ότι η οξείδωση των λιπών/ελαίων καθιστά το τρόφιμο δυσάρεστο στη γεύση πολύ πριν την επίτευξη του απαραίτητου επιπέδου υδροϋπεροξειδίων για να συμβεί το στάδιο 5 της αντίδρασης. Τα στάδια 4 και 5 αποτελούν διακλαδισμένες-παράπλευρες αντιδράσεις της αλυσίδας των ελεύθερων ριζών.

Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μια ρίζα μπορεί να ξεκινήσει το σχηματισμό 100 μορίων υδροϋπεροξειδίων προτού να τερματίσει η αλυσίδα. Παρουσία αέρα, όλες οι αλκυλικές ρίζες μετασχηματίζονται σε υπεροξειδικές ρίζες μέσω της ταχείας ριζικής αλυσιδωτής αντίδρασης 1. Επομένως, ο τερματισμός της αλυσίδας συμβαίνει μέσω σύγκρουσης δυο υπεροξειδικών ριζών. Οι αντιδράσεις 6 και 7 παίζουν ρόλο όταν, παραδείγματος χάρη, το επίπεδο οξυγόνου είναι χαμηλό.

Εκκίνηση : Σχηματισμός υπεροξειδίων ($RO_2\cdot$) αλκοξύ ($RO\cdot$) ή αλκυλό ($R\cdot$) ριζών

Αλυσιδωτή διάδοση:

- (1) $R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot$
- (2) $RO_2\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
- (3) $RO\cdot + RH \rightarrow ROH + R\cdot$

Πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις

- (4) $ROOH \rightarrow RO\cdot + OH\cdot$
- (5) $2 ROOH \rightarrow RO_2\cdot + RO\cdot + H_2O$

Τερματισμός αλυσίδας

- (6) $2 R\cdot \rightarrow$ Σταθερό προϊόν
- (7) $R\cdot + RO_2\cdot \rightarrow$ Σταθερό προϊόν
- (8) $2 RO_2\cdot \rightarrow$ Σταθερό προϊόν

Η υπόθεση που παρουσιάζεται παραπάνω ισχύει μόνο για τη φάση έναρξης της αυτοξειδωσης. Η διαδικασία γίνεται όλο και λιγότερο σαφής με αύξηση του χρόνου αντίδρασης δεδομένου ότι, εκτός από τα υδροϋπεροξειδία, δημιουργούνται δευτερογενή προϊόντα που αυτοξειδώνονται μερικώς σε τριτογενή προϊόντα (Belitz, et al., 2011).

3.3 Επιπτώσεις της οξείδωσης στην ποιότητα των λιπαρών

Οι πιο χαρακτηριστικές αλλαγές που καθίστανται όλο και πιο εμφανείς κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οξείδωσης είναι η ανάπτυξη μιας δυσάρεστης γεύσης και οσμής. Οι προκληθείσες μεταβολές στο άρωμα των τροφίμων αξιολογούνται συχνά από τους καταναλωτές ως απαράδεκτες, παραδείγματος χάρη, ως ταγγίλα, ψαρίλα, μεταλλική ή χαρτιού, ή ως απροσδιορίστως παλαιά ή μπαγιάτικη γεύση. Εντούτοις, το γεγονός ότι μερικές πτητικές ενώσεις, σε επίπεδο κάτω από τις τιμές ορίου αναγνώρισης της δυσάρεστης οσμής, συμβάλλουν στο ευχάριστο άρωμα πολλών φρούτων και λαχανικών και στο συμπλήρωμα του αρώματος πολλών τροφίμων που περιέχουν λίπη ή έλαια δεν πρέπει να παραβλέπεται.

Επιπλέον αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της οξείδωσης σχετίζονται με το χρώμα, το ιξώδες, την πυκνότητα και τη διαλυτότητα. Περαιτέρω συνέπειες περιλαμβάνουν την απώλεια των βασικών λιπαρών οξέων, την υποβάθμιση των βιταμινών και προβιταμινών και τον σχηματισμό ισχυρά οσμηρών ενώσεων. Ορισμένες από τις πτητικές ενώσεις που αναπτύσσονται από την οξείδωση των πιο ευπαθών λιπαρών οξέων παρουσιάζονται στο πίνακα 3.1. Το σύνολο των αλλαγών αυτών επηρεάζουν έντονα τη θρεπτική αξία και την οργανοληπτική ποιότητα των βρώσιμων ελαίων (Decker, et al., 2010).

Πίνακας 3.1 Πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την αυτοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (μg/g)^a (Belitz, et al., 2011)

Ελαϊκό οξύ		Λινελαϊκό οξύ		Λινολενικό οξύ	
Επτανάλη	50	Πεντάνιο ^β	+ ^γ	Προπανάλη	+ ^γ
Οκτανάλη	320	Πεντανάλη	55	1-Πεντε-3-νόνη	30
Εννεανάλη	370	Εξανάλη	5100	(E)-2-Βουτενάλη	10
(E)-2-Δεκενάλη	80	Επτανάλη	50	(E)-2-Πεντενάλη	35
(E)-2-Ενδεκενάλη	70	(E)-2-Επτενάλη	450	(Z)-2-Πεντενάλη	45
	85	Οκτανάλη	45	(E)-2-Εξενάλη	10
		1-Οκτε-3-νόνη	2	(E)-3-Εξενάλη	15
		1-Οκτε-3-νοϋπεροξειδίο	+ ^γ	(Z)-3-Εξενάλη	90
		(Z)-2-Οκτενάλη	990	(E)-2-Επτενάλη	5
		(E)-2-Οκτενάλη	420	(E,Z)-2,4-Επταδιενάλη	320
		(Z)-3-Εννεανάλη	30	(E,E)-2,4-Επταδιενάλη	70
		(E)-3-Εννεανάλη	30	(Z,Z)-2,5-Οκταδιενάλη	20
		(Z)-2-Εννεανάλη	+ ^γ	3,5-Οκτεδιε-2-νόνη	30
		(E)-2-Εννεανάλη	30	(Z)-1,5-Οκταδιε-3-νόνη	+ ^γ
		(Z)-2-Δεκενάλη	20	(Z)-1,5-Οκταδιε-3-νοϋπεροξειδίο	+ ^γ
		(E,E)-2,4-Εννεαδιενάλη	30	(E,Z)-2,6-Εννεαδιενάλη	10

(E,Z)-2,4- Δεκαδιανάλη	250	2,4,7-Δεκατριενάλη	85
(E,E)-2,4- Δεκαδιανάλη	150		
Trans-4,5-Εποξύ- (E)-2-δεκανάλη	+ ^Y		

^a Κάθε λιπαρό οξύ στην ποσότητα του 1 g αυτοοξειδώθηκε στους 25 °C με πρόσληψη 0,5 mole οξυγόνου/mole λιπαρού οξέος.

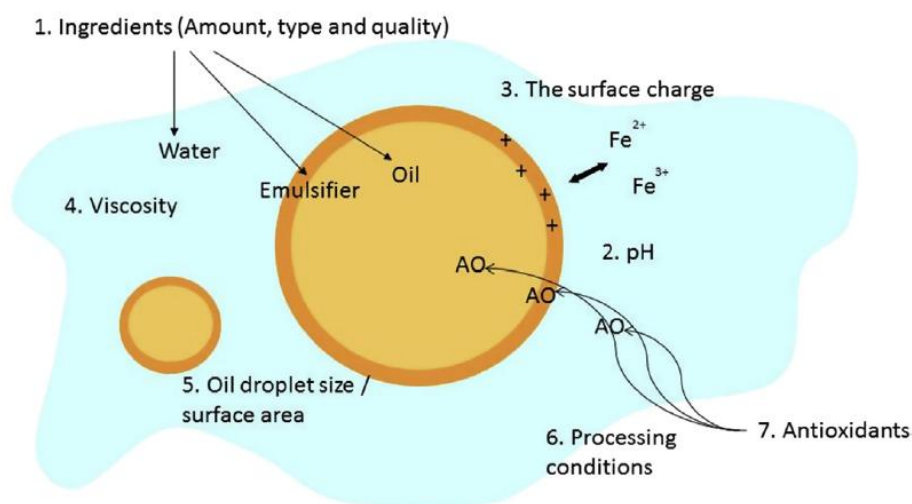
^β Μείζονα ένωση αυτοοξείδωσης

^γ Ανιχνεύτηκε αλλά δεν ποσοτικοποιήθηκε

3.4 Οξείδωση γαλακτωμάτων έναντι της οξείδωσης ελεύθερων ελαίων

Όταν το λιπαρό είναι συστατικό κάποιου σύνθετου συστήματος (μαργαρίνη, μπισκότα κτλ.), αντί να είναι καθαρό λιπαρό όπως είναι τα εμφιαλωμένα λάδια, ο ρυθμός και η δυναμική της υποβάθμισης του λίπους αλλάζει σημαντικά, κατά παρόμοιο τρόπο μεταβάλλεται και η επίδραση της υποβάθμισης του ελαίου στο τελικό προϊόν. Αυτό οφείλεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις των συστατικών (λιπαρά, νερό, πρωτεΐνες, σάκχαρα κλπ.) καθώς επίσης και στις τελικές ιδιότητες του τροφίμου.

Η οξείδωση των λιπιδίων στα γαλακτώματα είναι πολύ περίπλοκη καθώς μπορεί να περιλαμβάνει την οξείδωση ή τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε όλες τις διαφορετικές φάσεις του συστήματος. Αυτό κάνει τους μηχανισμούς οξείδωσης των γαλακτωμάτων πολύ διαφορετικούς και σημαντικά πιο πολύπλοκους από τους αντίστοιχους μηχανισμούς που αφορούν τα έλαια σε καθαρή μορφή. Επομένως, αν και ο βασικός μηχανισμός της οξείδωσης στα γαλακτώματα είναι ίδιος, οι παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση των γαλακτωμάτων διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διαφορετικά συστήματα. Στο σχήμα 3.1 συνοψίζονται οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση στα γαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό (Hu, et al., 2017).



Σχήμα 3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση γαλακτωμάτων

Η οξείδωση γενικά συμβαίνει ταχύτερα σε γαλακτώματα ο/w από ότι στο χύμα λάδι (Frankel, 2012). Αυτό μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες επεξεργασίας που απαιτούνται για την παραγωγή του γαλακτώματος, συμπεριλαμβανομένης και της έκθεσης στον αέρα (οξυγόνο) και των υψηλών θερμοκρασιών σε κάποιες περιπτώσεις. Επιπλέον, η δημιουργία

της διεπιφάνειας μεταξύ του ελαίου και του νερού μπορεί να προάγει τη σύνδεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη λιπαρή φάση και των προ-οξειδωτικών, όπως ιόντα ιχνοστοιχείων, στην υδατική φάση. Έτσι, σε γαλακτώματα τύπου ελαίου σε νερό, η συγκέντρωση των προ-οξειδωτικών είναι συχνά υψηλότερη στην υδατική φάση και επομένως η οξείδωση μπορεί να ξεκινήσει στην υδατική φάση ή στη διεπιφάνεια παρά στη λιπαρή φάση 'εντός' των σταγονιδίων ελαίου. Το οξυγόνο, τα προ-οξειδωτικά μέταλλα και τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά πρέπει να διαχέονται μέσα στην υδατική φάση πριν φθάσουν στη διεπιφάνεια ή στα σταγονίδια ελαίου. Συνεπώς, οι διαφορές στις ιδιότητες διαλυτότητας, στην κινητικότητα και στις ταχύτητες μεταφοράς μάζας των μετάλλων και των αντιοξειδωτικών εντός των διαφορετικών φάσεων μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την οξείδωση των γαλακτωμάτων. Μια σημαντική ιδιότητα του οξυγόνου είναι ότι είναι περισσότερο διαλυτό στο έλαιο από ότι στο νερό και αυτό μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς οξείδωσης. Έτσι η οξείδωση των λιπιδίων στα πολυφασικά συστήματα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση της διεπιφάνειας, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από τη σύνθεση του ελαίου, την υδατική φάση και τις επιφανειοδραστικές ενώσεις. Στα τρόφιμα, οι μεμβράνες που περιβάλλουν τα σχηματισμένα λιποσφαίρια αποτελούνται από επιφανειοδραστικές ουσίες ή πρωτεΐνες ή και τα δύο. Εκτός από την ενίσχυση της φυσικής σταθερότητας που προσφέρουν αυτές οι μεμβράνες, επιδρούν και στις διαδικασίες της οξείδωσης με αρκετούς τρόπους.

3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση

Όλα τα έλαια και τα λίπη οξειδώνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ο ρυθμός της οξείδωσης εξαρτάται κυρίως από εγγενείς παράγοντες όπως το προφίλ των λιπαρών οξέων, τα δευτερεύοντα συστατικά συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας και των ακαθαρσιών, καθώς επίσης και από εξωτερικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία αποθήκευσης, η συγκέντρωση οξυγόνου, το φως (Das, 1991), αλλά και από το ιστορικό της πρώτης ύλης και την επεξεργασία της (Decker, et al., 2010).

Σύνθεση λιπαρών οξέων. Το άτομο υδρογόνου που είναι δεσμευμένο στο άτομο άνθρακα στο οποίο υπάρχει διπλός δεσμός είναι το ευκολότερο να αποκολληθεί, επομένως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι περισσότερο επιρρεπή στην υπεροξείδωση. Αν υποθέσουμε ότι ο ρυθμός αυτής της αντίδρασης για το στεατικό οξύ είναι 1, θα ήταν περίπου 100 για το ελαϊκό οξύ, 250 για το λινελαϊκό οξύ και 2500 για το λινολενικό οξύ. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να αυτοοξειδωθούν είτε όντας σε ελεύθερη μορφή είτε όντας συστατικά γλυκερολιπιδίων ή γλυκολιπιδίων, το τελευταίο είναι και το πιο πιθανό. Επίσης, αποδείχθηκε ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι πιο σταθερά όταν βρίσκονται στη θέση sn-2 της τριαγλυκερόλης σε σύγκριση με τη θέση sn-1.

Θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία των τροφίμων επιταχύνει την διαδικασία οξείδωσης και αλλάζει την πορεία της. Τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης αποσυντίθενται ευκολότερα και αλληλεπιδρούν πιο γρήγορα με άλλα συστατικά των τροφίμων. Μάλιστα σε θερμοκρασία τηγανίσματος πάνω από 170 °C προκαλείται οξείδωση τόσο στο έλαιο τηγανίσματος, όσο και στα λιπαρά του τροφίμου που επιδέχεται τη διαδικασία, ειδικά αν είναι πλούσια σε PUFA.

Ενεργότητα νερού. Ο ρυθμός οξείδωσης μειώνεται καθώς μειώνεται η ενεργότητα του νερού. Υπάρχουν, όμως, κάποιες αντιδράσεις της λιπιδικής οξείδωσης όπου ο ρυθμός τους αυξάνεται σε ενεργότητα νερού μικρότερη από 0,2.

Φως. Το φως είναι μια πηγή θερμότητας που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ριζικών εκκινήτων. Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ιδιαίτερα επιβλαβής. Η επίδραση του φωτός στην οξείδωση των λιπιδίων εξαρτάται από το μήκος κύματος, το βάθος διείσδυσης στο προϊόν, την ευαισθησία του προϊόντος και την ποσότητα των καρτοτενοειδών, τα οποία δρουν ως εμπόδιο στη φωτοοξείδωση. Η κατάλληλη επιλογή συσκευασίας, που αποτελεί εμπόδιο κατά του οξυγόνου και του φωτός, είναι σημαντική (Bartosz, 2014).

Οξυγόνο: Η συγκέντρωση και η ενεργειακή κατάσταση του οξυγόνου ($^3\text{O}_2$ ή $^1\text{O}_2$) παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση των λιπαρών σωμάτων. Η συγκέντρωση του οξυγόνου σε ένα έλαιο εξαρτάται από τη μερική πίεση αυτού στον υπερκείμενο από το δείγμα χώρο. Έτσι, όταν η μερική πίεση είναι μεγάλη, περισσότερο οξυγόνο διαλύεται στο έλαιο και ο ρυθμός οξείδωσης του αυξάνει, καθώς αυξάνει η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου σε αυτό. Η διαλυτότητα του οξυγόνου είναι τρεις φορές μεγαλύτερη στο έλαιο από ότι στο νερό, ~ 0,6 mM και 0,2 mM αντίστοιχα στους 25 °C και μεγαλύτερη στο ακατέργαστο από ότι στο εξευγενισμένο έλαιο. Επομένως είναι πάντοτε πιθανό να υπάρχει αρκετό οξυγόνο στη λιπαρή φάση για τη επιτάχυνση της οξείδωσης, εκτός αν ληφθούν κατάλληλα μέτρα για την απομάκρυνση του.

Η επίδραση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στην οξείδωση του ελαίου αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας, παρουσία φωτός και μετάλλων. Επίσης, ο ρυθμός οξείδωσης είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης του οξυγόνου, όταν αυτή είναι υψηλή, αφού ο ρυθμός διάχυσης του οξυγόνου είναι ταχύτερος από το ρυθμό της αντίδρασης, ενώ εξαρτάται από αυτή όταν έχει χαμηλή τιμή. Το οξυγόνο μπορεί να αντιδρά πιο εύκολα με ένα έλαιο, όταν το τελευταίο είναι σε μικρή ποσότητα ή έχει μεγάλη αναλογία επιφάνειας ως προς όγκο. Όταν η αναλογία επιφάνειας προς όγκο αυξάνει, ο ρυθμός οξείδωσης είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Στα λίπη και έλαια, η αντίδραση των λιπαρών τους οξέων με οξυγόνο εξαρτάται από την ενεργειακή του κατάσταση, αφού ο ρυθμός της αντίδρασης του $^1\text{O}_2$ με τα λιπαρά οξέα είναι ταχύτερος σε σύγκριση με το $^3\text{O}_2$ (Δημάκου, 2010).

Πέρα από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω η οξείδωση στα γαλακτώματα, καθώς είναι περίπλοκα συστήματα, επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες. Δεδομένου ότι η οξείδωση των λιπιδίων, συχνά, συνεπάγεται την αλληλεπίδραση στη διεπιφάνεια ελαίου και νερού ανάμεσα στα υδατοδιαλυτά προ-οξειδωτικά και στα λιπίδια τα οποία βρίσκονται στην ελαιώδη φάση, η οξείδωση θεωρείται ένα φαινόμενο της διεπιφάνειας. Για αυτό το λόγο, η οξείδωση λιπιδίων αναμένεται να εξαρτάται από το συνολικό μέγεθος της διεπιφάνειας, το οποίο καθορίζεται από την κατανομή μεγέθους των σταγονιδίων ελαίου (όσο μικρότερες είναι οι σταγόνες, τόσο μεγαλύτερη είναι η συνολική επιφάνειας επαφής). Εντούτοις, υπάρχουν αντιφατικές αναφορές που διατίθενται για την επίδραση του μεγέθους των σταγονιδίων στην οξείδωση σε διαφορετικά τρόφιμα. Τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχουν άλλοι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στην οξείδωση.

Είδος γαλακτωματοποιητή. Ο γαλακτωματοποιητής παρέχει ένα προστατευτικό φράγμα στη διείσδυση και τη διάχυση μετάλλων ή ριζών που προκαλούν οξείδωση λιπιδίων. Οι ρίζες που μπορούν να δημιουργηθούν με τη δράση μεταλλικών καταλυτών στην υδατική φάση επηρεάζουν σημαντικά την οξείδωση των γαλακτωμάτων. Τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης είναι περισσότερο επιφανειοδραστικά σε σχέση με τα αρχικά λιπίδια και είναι πιθανό να κατανεμηθούν στη διεπιφάνεια και να διέλθουν στην υδατική φάση. Τα υδροϋπεροξειδία που προέρχονται από μερικώς οξειδωμένα φωσφολιπίδια και γαλακτωματοποιητές διαλυτοποιούνται στα μικκύλια και μειώνουν την οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων. Αυτός ο 'διαχωρισμός' των προϊόντων οξείδωσης προάγει τις αλληλεπιδράσεις με τα καταλυτικά μέταλλα στην υδατική φάση και μειώνει την αποτελεσματικότητα των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών (Hu & Jacobsen, 2016). Μελέτες που έγιναν σε γαλακτώματα με σταθερό pH (=7) και λιπαρή ύλη το βαμβακέλαιο για την επίδραση του γαλακτωματοποιητή στην οξείδωση έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες γάλακτος, Na-CAS και WPC, και τα μίγματα γαλακτωματοποιητών Na-CAS με Tween 20 οδηγούν σε σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων έναντι της οξείδωσης, σε σύγκριση με αυτά που σταθεροποιούνται μόνο με γαλακτωματοποιητή Tween 20 (Δημάκου, 2010).

Συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή. Υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτωματοποιητή μπορούν να αυξήσουν την οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωματοποιημένων λιπιδίων. Πρακτικά, υψηλότερες συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών ενώσεων οδηγούν σε σχηματισμό πιο σφιχτής και πυκνής μεμβράνης, με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα πιο αποτελεσματικό φράγμα στη διάχυση εκκινητών της οξείδωσης στα λιπίδια (Hu & Jacobsen, 2016). Σύμφωνα με τη (Δημάκου, 2010) η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτωματοποιητή Na-CAS σε γαλακτώματα βαμβακελαίου οδήγησε σε αύξηση της οξειδωτικής σταθερότητας.

Σάκχαρα και αμινοξέα. Υδατικά διαλύματα ορισμένων σακχάρων και αμινοξέων αναστέλλουν την οξείδωση λιπιδίων σε γαλακτώματα με τη απενεργοποίηση των ελεύθερων ριζών. Ορισμένα αμινοξέα όπως η μεθειονίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη καθυστερούν την οξείδωση, ενώ άλλα, όπως η ιστιδίνη, μπορεί να τη προάγουν. Ωστόσο, η επίδραση των αμινοξέων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται, την παρουσία μετάλλων και το pH του συστήματος.

pH. Η οξείδωση επηρεάζεται από το pH του ο/w γαλακτώματος. Γενικά, η οξείδωση επιβραδύνεται σε υψηλές τιμές pH και ο ρυθμός επιταχύνεται καθώς μειώνεται το pH. Αυτή η επιτάχυνση μπορεί να οφείλεται στη διαλυτοποίηση των μεταλλικών καταλυτών (Hu & Jacobsen, 2016). Η επίδραση του pH στην οξειδωτική σταθερότητα του γαλακτώματος εξαρτάται και από τον τύπο του γαλακτωματοποιητή που χρησιμοποιείται. Έτσι σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο και γαλακτωματοποιητή Tween 20 αύξηση του pH (3, 5.5 και 7) οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού οξείδωσης ενώ σε αντίστοιχα γαλακτώματα που ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη Na-CAS, αύξηση της τιμής του pH (1.7, 5.7 και 7) οδήγησε σε αύξηση της οξειδωτικής σταθερότητας των γαλακτωμάτων (Δημάκου, 2010).

Ηλεκτρικό φορτίο της μεμβράνης. Η ηλεκτροστατική έλξη ή άπωση από το περιβάλλον της μεμβράνης επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών. Ο ρυθμός της οξείδωσης είναι σημαντικά μεγαλύτερος όταν τα γαλακτώματα σταθεροποιούνται με ιονικούς γαλακτωματοποιητές (SDS, παλμιτικό κάλιο) έναντι μη ιοντικών (Span 20, Tween 20). Η επιτάχυνση της οξείδωσης είναι μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνται ανιοντικοί γαλακτωματοποιητές. Σε αυτά τα γαλακτώματα, προκαλείται ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης διεπιφάνειας ελαίου-νερού και των θετικά φορτισμένων μεταλλικών ιόντων που υπάρχουν είτε ως προσμίξεις είτε ως πρόσθετα. Τα μέταλλα στην υδατική φάση ενυδατώνονται και αντιδρούν περισσότερο με τα πολικά υδροϋπεροξειδία και τις υδατοδιαλυτές ρίζες ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$) στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού (Hu & Jacobsen, 2016).

Πρωτεΐνες. Ως γαλακτωματοποιητές τροφίμων, οι πρωτεΐνες έχουν πολύπλοκη διεπιφανειακή επίδραση στην οξείδωση. Μετά τον κορεσμό της διεπιφάνειας με πρωτεΐνες οι υπόλοιπες παραμένουν στην υδατική φάση. Οι πρωτεΐνες μπορούν είτε να επιταχύνουν είτε να επιβραδύνουν τη διαδικασία σε ο/ω γαλακτώματα. Με την αύξηση του ιξώδους της μεμβράνης που περιβάλλει τα σταγονίδια, οι πρωτεΐνες μπορεί να περιορίσουν τη διείσδυση και τη διάχυση των εκκινητών στη φάση του ελαίου. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις, όταν οι πρωτεΐνες είναι διασπαρμένες στην υδατική φάση, μπορεί είτε να συλλέξουν τις ελεύθερες ρίζες είτε να οξειδωθούν οι ίδιες, καθυστερώντας με αυτό τον τρόπο την οξείδωση των λιπαρών (Frankel, 2012).

4. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΣΕ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις για το τομέα τις βιομηχανίας που ασχολείται με τα έλαια και τη χρήση τους στα τρόφιμα είναι η διατήρηση υψηλής ποιότητας στα προϊόντα από την στιγμή που σταματάει η επεξεργασία τους μέχρι την χρήση τους από τους καταναλωτές. Η σταθεροποίηση των λιπών βασίζεται στη χρήση φυσικών μεθόδων (έλεγχος θερμοκρασίας και έκθεσης στο φως κατά την αποθήκευση) και στη προσθήκη αντιοξειδωτικών. Πολλά τρόφιμα περιέχουν ενώσεις που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Παραδείγματα γνωστών φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελεί το ασκορβικό οξύ, οι τοκοφερόλες, τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή (Hafiz & Eissa, 2012).

4.1 Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες φυσικές ή συνθετικές που έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν τη συνέχιση της αλυσιδωτής αντίδρασης αυτοξειδωσης των ελαίων. Πρόκειται για ουσίες ευοξειδωτες που αναλίσκονται (οξειδώνονται) οι ίδιες έναντι των ελαίων, παρέχοντας έτσι προστασία σε αυτά. Η δράση τους είναι για περιορισμένο χρονικό διάστημα, ενώ η ποσότητα που προστίθεται στα έλαια πρέπει να εξετάζεται ώστε να λειτουργούν προστατευτικά και όχι προ-οξειδωτικά (όπως συμβαίνει σε ορισμένα μετά την υπέρβαση κάποιου ορίου χρήσης). Η αποδοτικότητα ενός αντιοξειδωτικού, όπως είναι φυσικό, έχει σχέση με την αρχική οξειδωτική κατάσταση του ελαίου στο οποίο προστίθεται. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα αντιοξειδωτικά είναι: οι τοκοφερόλες, η βιταμίνη C, το γαλλικό προπύλιο (PG), η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), η βουτυλιωμένη υδροξυτολουόλη (BHT), η βουτυλιωμένη υδροκινόλη (TBHQ). Η ασφάλεια των χημικών αντιοξειδωτικών και η πιθανή τοξική επίδραση τους στην υγεία ελέγχεται και εγκρίνεται από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA). Τα εγκεκριμένα ως ασφαλή για χρήση (GRAS) προστίθενται σε έλαια σε μικρές αναλογίες (0,2%) (Τζιά, et al., 2009).

Σε τρόφιμα που περιέχουν λιπίδια, τα αντιοξειδωτικά καθυστερούν την έναρξη της οξείδωσης ή επιβραδύνουν τον ρυθμό αυτής. Αυτές οι ουσίες μπορεί να είναι φυσικά συστατικά του συστήματος, αλλά μπορούν επίσης να προστεθούν σκόπιμα στα προϊόντα ή να σχηματιστούν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Ο ρόλος τους δεν είναι να βελτιώσουν την ποιότητα του τροφίμου, αλλά να διατηρήσουν την ποιότητα και να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής. Τα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα πρέπει να είναι φθηνά, μη τοξικά, αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σταθερά και ικανά να διατηρηθούν κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Επίσης το χρώμα, η γεύση και η οσμή τους πρέπει να είναι ελάχιστες. Η επιλογή του κατάλληλου αντιοξειδωτικού εξαρτάται από τη συμβατότητα με το τρόφιμο και την εκάστοτε νομοθεσία (Akoh & Min, 2002).

Τα αντιοξειδωτικά και οι βιταμίνες αποτελούν θεμελιώδεις ενώσεις για την ανθρώπινη υγεία. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη C και τα φλαβονοειδή (όπως η κερκετίνη, η κατεχίνη) είναι ενώσεις που έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες. Πολλές από τις κύριες ασθένειες που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία σχετίζονται με την διαδικασία της οξείδωσης, μεταξύ των οποίων οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αθηροσκλήρωση και ο καρκίνος. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν αυτές τις ασθένειες μειώνοντας τις δραστικές ρίζες (ROS) και περιορίζοντας τις κυτταρικές βλάβες που οφείλονται στις ROS. Όμως, τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι

επιρρεπή σε υποβάθμιση και η βιοδιαθεσιμότητα τους περιορίζεται λόγω της χαμηλής απορρόφησης από τον οργανισμό (Garti, 2008).

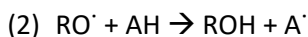
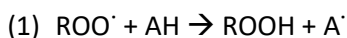
4.2 Κατηγοριοποίηση αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το μηχανισμό δράσης τους σε πρωτογενή και δευτερογενή. Οι χημικοί τρόποι δράσης ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό, διότι οι ουσίες αυτές είναι σε θέση να λειτουργήσουν σε όλα τα στάδια της αντίδρασης των ελεύθερων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά που έχουν περισσότερους από ένα μηχανισμό δράσης αναφέρονται ως αντιοξειδωτικά πολλαπλών δράσεων ή συνεργιστικά (Akoh & Min, 2002).

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αντιδρούν άμεσα με ελεύθερες ρίζες λιπιδίων και να τις μετατρέπουν σε σταθερά, μη δραστικά, προϊόντα. Έτσι, τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά τερματίζουν ή καθυστερούν τη διάδοση της οξείδωσης και τη διάσπαση των λιπαρών οξέων, κατά συνέπεια μειώνουν το σχηματισμό των πτητικών προϊόντων. Αντιθέτως, τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά δεν συμμετέχουν άμεσα στα διάφορα στάδια της οξείδωσης αλλά έμμεσα αντιδρώντας με τις ενώσεις που τα δημιουργούν. Ως εκ τούτου, τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που έχουν μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες ιδιότητες: χηλικός συμπλοκοποιητής μετάλλων, δεσμευτής οξυγόνου, δεσμευτής άλλων ουσιών, ενώ μπορεί να έχουν συνεργιστική δράση (Frankel, 2012).

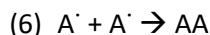
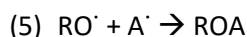
4.2.1 Πρωτογενή

Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά, είναι δέκτες ελεύθερων ριζών και δρουν καθυστερώντας ή αναστέλλοντας το στάδιο έναρξης ή διακόπτοντας το στάδιο διάδοσης της αυτοοξείδωσης. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας αντιδρούν με τις δραστικές ρίζες και τις μετατρέπουν σε σταθερά, μη δραστικά προϊόντα. Αυτές οι ουσίες δίνουν άτομα υδρογόνου στις ρίζες και παράγουν λιπιδικά παράγωγα και αντιοξειδωτικές ρίζες (A^{\cdot}) που είναι πιο σταθερές και λιγότερο διαθέσιμες για περαιτέρω προώθηση της οξείδωσης. Ως δότες υδρογόνου, τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις υπεροξειδικές ρίζες σε σχέση με τα λιπίδια. Επομένως αυτά τα αντιοξειδωτικά δρουν κατά τη διάρκεια της διάδοσης, βέβαια, μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με τις ρίζες των λιπιδίων. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται παρουσιάζονται παρακάτω.



Η αντιοξειδωτική ρίζα που παράγεται με τη δωρεά του υδρογόνου έχει πολύ χαμηλή δραστικότητα με τα λιπίδια. Αυτή η χαμηλή δραστικότητα μειώνει το ρυθμό διάδοσης, καθώς η ταχύτητα αντίδρασης της παραγομένης ρίζας με το οξυγόνο ή τα λιπίδια είναι πολύ μικρή. Οι αντιοξειδωτικές ρίζες είναι πιθανό να συμμετέχουν σε αντιδράσεις τερματισμού της οξείδωσης ή να αντιδρούν με παρόμοιες ρίζες. Ο σχηματισμός αντιοξειδωτικών διμερών είναι εμφανής στα λίπη και στα έλαια και δείχνει ότι οι φαινολικές αντιοξειδωτικές ρίζες υποβάλλονται εύκολα σε αντιδράσεις τερματισμού. Οι αντιδράσεις που είναι δυνατές με τη συμμετοχή της αντιοξειδωτικής ρίζας είναι οι (4)-(6).





Πριν από την έναρξη της αυτοξειδωσης πρέπει να υπάρχει μια περίοδος επώασης, στην οποία καταναλώνονται τα αντιοξειδωτικά και δημιουργούνται οι ελεύθερες ρίζες τους. Επομένως, τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά είναι πιο αποτελεσματικά αν αυτά προστεθούν κατά τη διάρκεια των σταδίων επώασης και έναρξης της οξείδωσης, όπου δεν έχουν ξεκινήσει ακόμα οι κυκλικές αντιδράσεις της διάδοσης. Η προσθήκη αυτών των αντιοξειδωτικών σε λίπη όπου έχουν παραχθεί σημαντικές ποσότητες ριζών θα κατέληγε γρήγορα σε απώλεια της αντιοξειδωτικής δράσης.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτογενή αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα είναι συνθετικές ενώσεις. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι η BHA, το BHT, ο PG και η TBHQ. Ωστόσο, μερικά συστατικά της τροφής λειτουργούν επίσης ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά και προστίθενται συνήθως στα τρόφιμα. Οι τοκοφερόλες είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυσικά αντιοξειδωτικά αυτής της κατηγορίας. Μια άλλη ομάδα τέτοιων ενώσεων είναι τα καροτενοειδή, αν και ο μηχανισμός τους διαφέρει από τις φαινόλες.

4.2.2 Δευτερογενή

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά, δρουν μέσω πολλών πιθανών μηχανισμών. Αυτά τα αντιοξειδωτικά επιβραδύνουν το ρυθμό της οξείδωσης με αρκετές διαφορετικές δράσεις, αλλά δεν μετατρέπουν τις δραστικές ρίζες σε πιο σταθερά προϊόντα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χηλικοποιήσουν τα προ-οξειδωτικά μέταλλα και να τα απενεργοποιήσουν, να συμπληρώσουν τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά με υδρογόνα, να αποσυνθέσουν τα υδροϋπεροξειδία κάνοντας τα μη δραστικά, να απενεργοποιήσουν το μονήρες οξυγόνο, να απορροφήσουν υπερϊώδη ακτινοβολία ή να δράσουν σαν δεσμευτές οξυγόνου. Αυτά τα αντιοξειδωτικά αναφέρονται, συχνά, ως συνεργιστικά γιατί προάγουν τη δράση των πρωτογενών. Το κιτρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, ο παλμιτικός ασκορβυλεστεράς, η λεκιθίνη και το τρυγικό οξύ είναι παραδείγματα συνεργιστικών αντιοξειδωτικών. Οι πιο σημαντικοί τύποι δευτερογενών αντιοξειδωτικών παρουσιάζονται παρακάτω.

Χηλικοί συμπλοκοποιητές. Αρκετά βαρέα μέταλλα με δύο ή περισσότερες καταστάσεις σθένους (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, V, Zn, Al) προάγουν την οξείδωση δρώντας ως καταλύτες αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Αυτά τα οξειδοαναγωγικά μεταβατικά μέταλλα μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια κατά τη διάρκεια αλλαγών στις καταστάσεις οξείδωσης. Η χηλική συμπλοκοποίηση των μετάλλων από ορισμένες ενώσεις μειώνει την προ-οξειδωτική τους δράση ελαττώνοντας τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά τους και σταθεροποιώντας την οξειδωμένη μορφή του μετάλλου. Οι χηλικές ενώσεις μπορούν, επίσης, να παρεμποδίσουν στερεοχημικά το σχηματισμό του συμπλόκου μετάλλου-υδροϋπεροξειδίου που συμβαίνει. Το κιτρικό, το μηλικό, το τρυγικό, το οξαλικό, το ηλεκτρικό, το φωσφορικό (και τα πολυφωσφορικά παράγωγα του) και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) μπορούν να δράσουν ως χηλικοί συμπλοκοποιητές. Εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση, πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν και άλλες μοναδικές λειτουργίες ως πρόσθετα τροφίμων. Το κιτρικό, το μηλικό και το τρυγικό οξύ λειτουργούν ως ρυθμιστικά οξύτητας. Τα φωσφορικά προστίθενται ως ρυθμιστικά οξύτητας και pH, αλλά και ως γαλακτωματοποιητές. Αυτής της

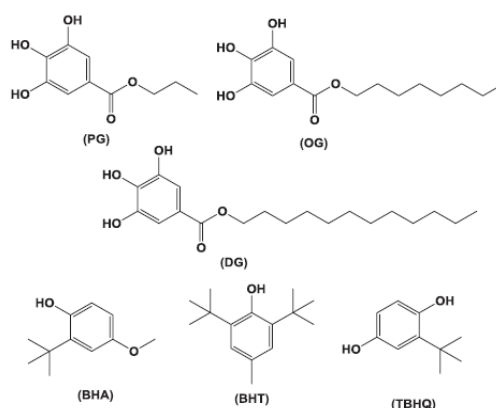
κατηγορίας τα αντιοξειδωτικά αναφέρονται και ως συνεργιστικά, αφού ενισχύουν τη δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

Μειωτήρες οξυγόνου. Το ασκορβικό οξύ, ο παλμιτικός ασκορβυλεστέρας, το ερυθροβικό οξύ, το ερυθροβικό νάτριο και ταθειώδη άλατα παρεμποδίζουν την οξείδωση με την απομάκρυνση του οξυγόνου, δρώντας ως αναγωγικά μέσα. Αυτός ο τρόπος είναι χρήσιμος όταν στα προϊόντα υπάρχει μεγάλη επαφή με την ατμόσφαιρα ή είναι διαλυμένη σε αυτά ποσότητα οξυγόνου. Οι αναγωγικοί παράγοντες δρουν δίνοντας άτομα υδρογόνου. Το ασκορβικό οξύ και ταθειώδη άλατα αντιδρούν απευθείας με το οξυγόνο και το εξαλείφουν από το προϊόν.

Καταστροφείς μονήρους οξυγόνου (singlet oxygen). Το μονήρες οξυγόνο είναι ένα μόριο υψηλής ενέργειας που είναι υπεύθυνο για τη φωτοοξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και την επακόλουθη δημιουργία υδροϋπεροξειδίων. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας μειώνουν τη συγκέντρωση αυτού του είδους οξυγόνου και διαχέουν τη πλεονάζουσα ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Τα καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένου του β-καροτενίου, του λυκοπενίου και της λουτεΐνης, ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία όταν η μερική πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή (Akoh & Min, 2002).

4.2.3 Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Υπάρχουν πολλές συνθετικές ενώσεις που παρουσιάζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση και είναι εύκολα διαθέσιμες. Αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά τρόφιμα και είναι κυρίως φαινολικές ενώσεις, οι πιο συνηθισμένες από αυτές είναι η TBHQ, BHA, το BHT, ο PG, ο OG (γαλλικός οκτυλεστέρας) και ο DG (γαλλικός δωδεκυλεστέρας) (Shahidi, 2015). Οι δομές τους παρουσιάζονται στην εικόνα 4.1. Η χρήση συνθετικών φαινολικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα ρυθμίζεται από αυστηρή νομοθεσία λόγω των τοξικών επιπτώσεων τους. Η BHA και το BHT, σε υψηλές συγκεντρώσεις, έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για ηπατική βλάβη και καρκινογένεση σε πειραματόζωα (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Επίσης υπάρχει πιθανότητα τα BHA, TBHQ και PG να σχηματίζουν μοριακά σύμπλοκα με δομή νουκλεϊκού οξέος και να προκαλούν βλάβη στη διπλή ελικοειδή δομή του DNA (Dolatabadi & Kashanian, 2010). Εξαιτίας του υψηλού κινδύνου που διέπει τη χρήση τους τα τελευταία χρόνια υπάρχει τάση για χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών που προέρχονται από φυτικές πρώτες ύλες.



Σχήμα 4.1 Δομές κυριότερων συνθετικών αντιοξειδωτικών

4.3 Λειτουργικά τρόφιμα

Σε ολόκληρη την Ευρώπη και στον υπόλοιπο ανεπτυγμένο κόσμο έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση του ενδιαφέροντος για την υγεία και την υγιεινή διατροφή. Η βιομηχανία τροφίμων ανταποκρίνεται σε αυτή τη τάση βρίσκοντας διάφορες λύσεις. Μια από αυτές ήταν η απομάκρυνση ή μείωση των συστατικών που θεωρούνται ανθυγιεινά, όπως το λίπος, η ζάχαρη και το αλάτι. Μια άλλη, όταν οι καταναλωτές απαίτησαν πιο φυσικά τρόφιμα, ήταν η απομάκρυνση των τεχνητών ενώσεων (όπως κάποιων συντηρητικών) και η αντικατάστασή τους από φυσικές εναλλακτικές ουσίες. Η τάση που επικρατεί περισσότερο αυτό τον καιρό είναι η επισήμανση και προώθηση τροφίμων (ονομάζονται λειτουργικά) που έχουν τη δυνατότητα να βελτιώνουν την υγεία και να μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών που απειλούν τη ζωή, όπως για παράδειγμα οι καρδιοπάθειες.

Η ανάπτυξη των λειτουργικών τροφίμων αποδίδεται στους Ιάπωνες και προωθήθηκε από την κίνηση της Ιαπωνικής κυβέρνησης το 1984 να εξετάσει τα όρια, τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και την γενικότερη συνεισφορά των φαρμάκων σε μια πιο υγιή κοινωνία. Παράλληλα στην Ευρώπη υπήρξε μικρότερος, αλλά παρόλα αυτά πολύ σημαντικός, αριθμός τροφίμων που χαρακτηριζόταν ως πιο υγιεινά (π.χ. με μειωμένη χοληστερόλη ή για ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος), αν και χωρίς το νομοθετικό πλαίσιο της Ιαπωνίας και με λιγότερο ενημερωμένους καταναλωτές. Παρόλο που υπήρξε, επίσης, μια αξιοσημείωτη αύξηση των λειτουργικών τροφίμων στη Βόρεια Αμερική, αυτή δεν ήταν στην ίδια κλίμακα με αυτή της Ευρώπης και της Ιαπωνίας λόγω της εστίασης στη χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ως οχήματα πρόσληψης επιθυμητών ουσιών (Gunstone, 2003).

Λειτουργικό ονομάζεται ένα τρόφιμο στο οποίο μπορεί είτε να έχει προστεθεί είτε να περιέχεται εξαρχής ένα ή περισσότερα ειδικά συστατικά τα οποία έχουν λειτουργική επιρροή για την υγεία και την ευημερία του καταναλωτή. Πιο συγκεκριμένα τέτοια συστατικά μπορούν να προστεθούν στο τρόφιμο (ωμέγα-3 λιπαρά οξέα), να αφαιρεθούν από αυτό (λίπος στο γάλα), να το ενισχύσουν μέσα από ειδικές συνθήκες (εμπλουτισμός σκόρδου με σελήνιο) ή να τροποποιηθούν ώστε να παρέχουν οφέλη για την υγεία (φυτοστερόλες, προβιοτικά). Είναι σημαντικό ότι τα τρόφιμα αυτής της κατηγορίας δεν προκαλούν, απαραίτητα, όφελος στην υγεία όλων των ανθρώπων (Caballero, et al., 2016). Ο (Diplock, 1999) όρισε τα λειτουργικά τρόφιμα ως εξής: Ένα προϊόν διατροφής το οποίο μαζί με τη βασική θρεπτική επίδραση, έχει και ωφέλιμες επιπτώσεις σε μια ή περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, βελτιώνοντας τις φυσικές συνθήκες ή/και μειώνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών. Η ποσότητα πρόσληψης και η μορφή του λειτουργικού τροφίμου πρέπει να είναι παρόμοια με αυτά που προβλέπονται για διατροφικούς σκοπούς. Ως εκ τούτου, δεν θα μπορούσε να είναι σε μορφή χαπιού ή κάψουλας όπως και η κανονική μορφή τροφής.

Γενικά τα λειτουργικά τρόφιμα (functional foods) συγχέονται συχνά με τις παρακάτω έννοιες:

1. Nutraceuticals: προϊόντα που παρασκευάζονται από τρόφιμα αλλά πωλούνται σαν χάπια, σκόνες ή σε κάποια άλλη μορφή δόσης και αποδεδειγμένα έχουν ευεργετικές ή προστατευτικές φυσιολογικές ιδιότητες έναντι χρόνιων ασθενειών.

2. **Pharmafoods:** ένας παγκοσμίως αποδεκτός όρος για τον προσδιορισμό των προϊόντων που βρίσκονται στην οριακή γραμμή τροφίμων-φαρμάκων, τα τρόφιμα αυτά εμφανίστηκαν πρώτη φορά στην Ιαπωνία. Αυτά τα τρόφιμα θεωρούνται ότι έχουν τα προληπτικά και θεραπευτικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων. Υπάρχουν πολύ λίγες επιστημονικές δημοσιεύσεις σχετικά με αυτό το είδος και ακόμα λιγότερες για την επίδραση του σε συγκεκριμένες μερίδες του πληθυσμού όπως τα παιδιά, οι έγκυες και οι ηλικιωμένοι (Caballero, et al., 2016).

4.4 Επίδραση δραστικών ριζών στον οργανισμό

Αν και το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την ανθρώπινη ζωή, ορισμένες ποσότητες οξυγόνου μετατρέπονται καθημερινά σε δραστικές ρίζες (ROS) στα μιτοχόνδρια. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου παίζουν ωφέλιμο ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου, συμμετέχοντας στην κυτταρική ανάπτυξη, την παραγωγή ενέργειας και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, αλλά ταυτόχρονα, οι ROS μπορεί να είναι επιβλαβείς για τους διαφορετικούς ιστούς λόγω της συμμετοχής τους στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, την τροποποίηση του DNA, την οξειδωση των υδατανθράκων και/ή την αλλοίωση των πρωτεϊνών.

Η κατάσταση στην οποία ένα βιολογικό σύστημα εκτίθεται σε υψηλό αριθμό δραστικών ριζών οξυγόνου και έχει περιορισμένη αντιοξειδωτική άμυνα ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Το ανθρώπινο σώμα έχει αναπτύξει μια εσωτερική άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων ελέγχουν τη συγκέντρωση των ελεύθερων μεταλλικών ιόντων και μειώνουν τον πιθανό κίνδυνο να δράσουν σαν προ-οξειδωτικά τα αντιοξειδωτικά μόρια, ενώ τα ενζυμικά και τα φυσικά αντιοξειδωτικά δρουν κυρίως ως καταστολείς ριζών, προστατεύοντας το κυτταρικό περιβάλλον από βλάβες που μπορεί να προκαλέσει το οξειδωτικό στρες. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά και οι πρωτεΐνες είναι, κυρίως, υδρόφιλα και συνεπώς δρουν σε ένα υδρόφιλο περιβάλλον. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από φυτά δρουν είτε σε υδρόφιλο είτε σε υδρόφοβο περιβάλλον, ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, και συμπληρώνουν την ενζυμική αμυντική γραμμή, ενισχύοντας την προστασία των μορίων. Εάν παρουσιασθεί οξειδωτικό στρες, το σύστημα επισκευής, που αποτελείται από διαφορετικά ένζυμα μπορεί να αποκαταστήσει τη ζημιά που προήλθε από τη διαδικασία της οξειδωσης, ενώ τα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από χημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Garti, 2008).

Αυτές οι ρίζες μπορεί να αποτελούν την αιτία ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, μεταβολικό σύνδρομο, αναιμία, διάφορους τύπους καρκίνου, διαβήτη, καταρράκτη, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος, φλεγμονώδεις αντιδράσεις, εκφυλιστικές ασθένειες του νευρικού συστήματος, καθώς και γήρανση. Το ανθρώπινο σώμα αμύνεται έναντι αυτών των δραστικών ενώσεων όχι μόνο μέσω ενδογενών αντιοξειδωτικών όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, αλλά σημαντική συμβολή έχουν, επίσης, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή, οι πολυφαινόλες και τα μέταλλα όπως το σελήνιο και ο ψευδάργυρος που είναι συστατικό των αντιοξειδωτικών μεταλλοπρωτεϊνών (Caballero, et al., 2016).

4.5 Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών σε λειτουργικά τρόφιμα

Η αντιμετώπιση των ενώσεων που προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου είναι ζωτικής σημασίας, ενώ τα μέσα που χρησιμοποιούνται για αυτό το λόγο είναι επιθυμητό να μην έχουν αρνητικές συνέπειες. Έτσι τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά μπορούν να καταναλωθούν για να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική άμυνα του σώματος και την πρόληψη ή την ελαχιστοποίηση αρκετών ασθενειών, χωρίς να έχουν άλλες παρενέργειες. Επίσης οι βιταμίνες, που αποτελούν απαραίτητες ουσίες για την φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου σώματος και στην πλειοψηφία τους δεν συντίθενται στο ανθρώπινο σώμα, πρέπει να λαμβάνονται από άλλες πηγές όπως τα φυτά. Την ίδια στιγμή υδροφόβες ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή, που προσλαμβάνονται και αυτές από φυτά έχουν κακή διαλυτότητα στο νερό, γεγονός που εμποδίζει την ενσωμάτωση τους στα τρόφιμα και την απορρόφηση τους από τον οργανισμό.

Οι βιοδραστικές ενώσεις που απομονώνονται από φυσικές πηγές συχνά δεν μπορούν να προστεθούν απευθείας σε συστήματα τροφίμων για τους ακόλουθους λόγους: 1) ασυμβατότητα με τη μήτρα του τροφίμου, 2) ταχεία αποικοδόμηση κατά την επεξεργασία, 3) ευπάθεια κατά τη διάρκεια της πέψης (Ting, et al., 2014). Έτσι, αυτά τα βιοενεργά συστατικά πρέπει να εγκλειστούν σε κατάλληλο φορέα για καλύτερη προστασία και ευκολότερη ενσωμάτωση στο σύστημα του τροφίμου (Hu, et al., 2017). Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό (ενθυλάκωση) βιοδραστικών ενώσεων σε λειτουργικά τρόφιμα. Ο κύριος στόχος του εγκλεισμού είναι η προστασία του υλικού του πυρήνα από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι ανεπιθύμητες επιδράσεις του φωτός, της υγρασίας και του οξυγόνου, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος και την προώθηση μιας ελεγχόμενης απελευθέρωσης της ουσίας (Fang & Bhandari, 2010). Οι λόγοι που πραγματοποιείται ο μικροεγκλεισμός του υλικού του πυρήνα έχουν συνοψιστεί από τους (Desai & Park, 2005) και είναι οι ακόλουθοι: (i) προστασία από την υποβάθμιση λόγω αντίδρασης με εξωτερικούς παράγοντες, (ii) μείωση του ρυθμού εξάτμισης και μεταφοράς της ουσίας στο εξωτερικό περιβάλλον, (iii) τροποποίηση των φυσικών χαρακτηριστικών και διευκόλυνση του χειρισμού, (iv) προσαρμογή της απελευθέρωσης της ουσίας με την πάροδο του χρόνου ή σε συγκεκριμένη στιγμή, (v) κάλυψη ανεπιθύμητου αρώματος ή γεύσης, (vi) αραίωση όταν απαιτούνται μικρές ποσότητες της ένωσης, επιτυγχάνοντας ομοιόμορφη διασπορά στο υλικό ξενιστή, (vii) διαχωρισμός ουσιών που εάν βρίσκονταν σε επαφή θα αντιδρούσαν μεταξύ τους.

Για τη προστασία ενώσεων έναντι της χημικής υποβάθμισης τους (οξειδωση ή αποικοδόμηση) κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης έχουν αναπτυχθεί πολλοί τύποι συστημάτων όπως πολυμερικά νανοσωματίδια, λιποσώματα, μικροσωματίδια και γαλακτώματα. Επιπλέον, η αξιοποίηση των συστημάτων αυτών προσφέρει τη δυνατότητα να μειώνονται οι παρενέργειες και να ελέγχεται η απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων. Πολλές θρεπτικές ουσίες και βιοδραστικά συστατικά (π.χ. η ρεσβερατρόλη, η λαβερκετίνη, η κουρκουμίνη και η βιταμίνη C) έχουν εγκλειστεί σε τέτοια συστήματα, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της διαλυτότητας στο νερό, της χημικής σταθερότητας και της βιοδραστικότητας.

Λόγω της ευρείας εμφάνισης τους στα συστήματα τροφίμων, τα γαλακτώματα αποτελούν δημοφιλή μέσα εγκλεισμού για διάφορα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των

προσθέτων χρώματος ή γεύσης, των συντηρητικών, των βιταμινών και άλλων λειτουργικών συστατικών. Η σταθερότητα και η αποτελεσματικότητα των προαναφερθέντων συστατικών βελτιώνονται αποτελεσματικά μετά τον εγκλεισμό τους σε γαλακτώματα, από τα οποία μπορούν να προστατευθούν και να απελευθερωθούν στο βιολογικό σύστημα στο σωστό σημείο και την κατάλληλη στιγμή. Τα γαλακτώματα είναι ένα αρκετά ευπροσάρμοστο σύστημα που μπορεί να κατασκευασθεί σε διάφορα μεγέθη και διαφορετικές δομές, ενώ και οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες μπορούν να διαφέρουν ανάλογα με την επιδιωκόμενη εφαρμογή (Garti, 2008).

Πολλές βιομηχανίες χρησιμοποιούν τα γαλακτώματα ως μέσο εγκλεισμού είτε για υδατικά είτε για λιπαρά βιοενεργά συστατικά ή και για τα δύο. Κάποιοι από τους κλάδους στους οποίους συμβαίνει αυτό είναι των φαρμάκων και των τροφίμων. Αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε άμεσα σε υγρή κατάσταση είτε μπορούν να ξηραθούν και να σχηματισθούν σκόνης. Σε κάθε περίπτωση υπάρχουν δύο παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν σχηματίζονται γαλακτώματα που λειτουργούν ως φορείς ενώσεων. Πρώτον, το σύστημα γαλακτώματος πρέπει να είναι σταθερό μέχρι τη στιγμή χρήσης του. Δεύτερον, κατά την εφαρμογή του το γαλάκτωμα πρέπει να συμπεριφέρεται με συνεπή τρόπο και να επιτυγχάνεται η επιθυμητή παροχή (Lakkis, 2007).

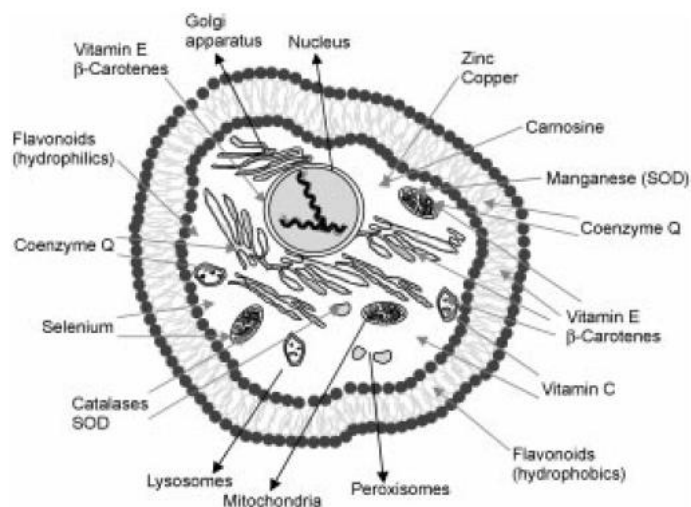
4.6 Φυσικά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σε λειτουργικά τρόφιμα

Τα φυτικά προϊόντα περιέχουν πολλές βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως «φυτοχημικά» και προάγουν την ανθρώπινη υγεία. Η ποικιλία στη δομή και το μέγεθος είναι μεγάλη και μπορεί να είναι απλά μόρια ή και πολυμερή. Παραδείγματα αυτών των ενώσεων αποτελούν τα καροτενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις, οι φυτοστερόλες και οι φυτοστανόλες, οι τοκοτριενόλες, οι θειούχες οργανικές ενώσεις και μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες όπως οι διαιτητικές ίνες και τα πρεβιοτικά (Alissa & Ferns, 2012).

Τα βιοενεργά συστατικά φυτικής προέλευσης έχει αποδειχθεί ότι έχουν πολλές ωφέλιμες ιδιότητες, ενώ η χρήση τους κερδίζει, συνεχώς, έδαφος λόγω προτίμησης των καταναλωτών για φυσικά προϊόντα. Αυτά τα συστατικά χρησιμοποιούνται, κυρίως, ως αντιοξειδωτικά, ώστε να περιορισθεί ή να αποφευχθεί η χρήση των συνθετικών (Casanova, et al., 2016 ; Cavalho, et al., 2016). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά και οι βιταμίνες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη διαλυτότητα τους σε δύο κατηγορίες, υδρόφοβα (αδιάλυτα στο νερό) και υδρόφιλα (υδατοδιαλυτά). Παραδείγματα υδρόφιλων αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C, ενώ η βιταμίνη E, το συνένζυμο Q₁₀ και τα καροτενοειδή είναι παραδείγματα υδρόφοβων αντιοξειδωτικών (Garti, 2008). Η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα των βιοενεργών ενώσεων *in vivo* σχετίζεται, όχι μόνο με τη χημική τους δραστηριότητα, αλλά και με την θέση και την ικανότητα τους να μετακινούνται. Η βιοδιαθεσιμότητα, η συνεργιστική δράση στην οξειδωτική διαδικασία και η προ-οξειδωτική δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην αξιολόγηση της πιθανής δράσης των ουσιών *in vivo*.

Οι ενώσεις αυτές ανάλογα με τη δομή τους, είναι δυνατό να βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία, η κατανομή των ενώσεων αυτών στο κύτταρο απεικονίζεται στην εικόνα 4.1. Οι διαφορετικές θέσεις δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών υποδεικνύουν ότι είναι σημαντικό να διατηρούνται επαρκείς συγκεντρώσεις τόσο των υδρόφοβων όσο και των

υδρόφιλων αντιοξειδωτικών μορίων, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος του οξειδωτικού στρες σε όλα τα διαμερίσματα των κυττάρων (Garti, 2008).



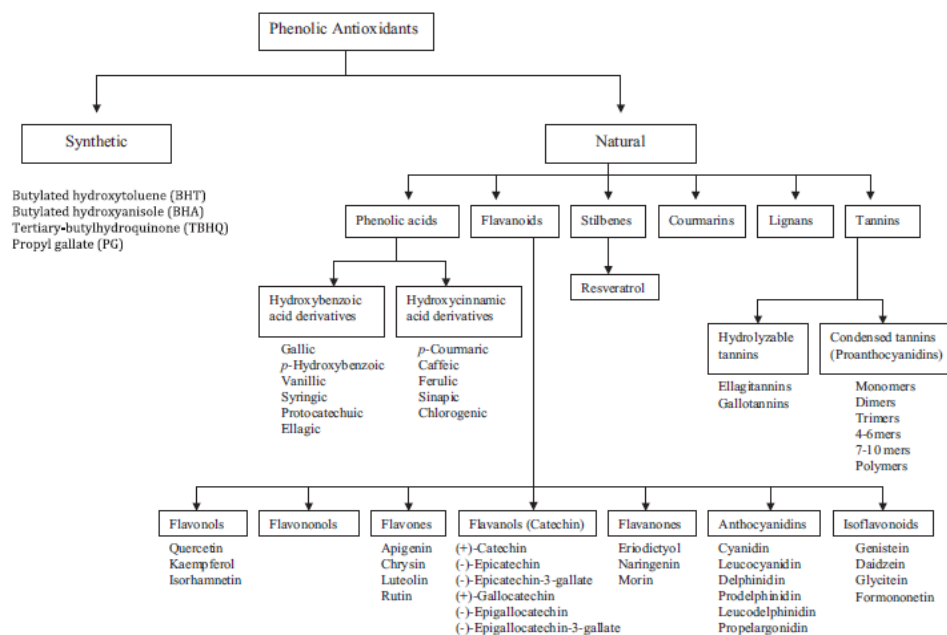
Εικόνα 4.1 Θέση διαφορετικών αντιοξειδωτικών μορίων στο κύτταρο

4.6.1 Φαινόλες

Οι φαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλα τα φυτικά προϊόντα και είναι αναπόσπαστο μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της πιθανής ωφέλειάς τους για την υγεία (Duthie, et al., 2000). Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές που είναι διασκορπισμένες σε όλο το φυτικό βασίλειο. Οι φαινόλες μπορεί να είναι απλές δομές που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο και είναι χαμηλού μοριακού βάρους, αλλά μπορεί να είναι και σύνθετες μεγάλες δομές όπως οι ταννίνες και τα παράγωγα των πολυφαινολών (Oroian & Escriche, 2015). Οι διατροφικές φαινόλες μπορούν να διακριθούν σε φλαβονοειδή και σε μη φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη ομάδα και έχουν εντοπιστεί πάνω από 6000 ενώσεις σε αυτή τη κατηγορία. Αυτές απαντώνται, στην πλειονότητα τους, ως γλυκοζίτες με μόρια σακχάρων, ενώ όταν δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα χαρακτηρίζονται ως αγλυκόνες.

Οι φαινόλες είναι μερικώς βιοδιαθέσιμες και οι ιδιότητές τους επηρεάζονται από τη δομή και τη διαλυτότητα τους. Τα περισσότερα διαλυτά φαινολικά βρίσκονται αδέσμευτα, ενώ τα αδιάλυτα είναι συνδεδεμένα με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα. Αυτές οι αδιάλυτες ενώσεις δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο, αλλά ζυμώνονται από εντερικά μικρόβια αποδίδοντας σε μεγάλο βαθμό φερουλικό οξύ και p-κουμαρικό οξύ. Εντός των κυττάρων, τα φαινολικά καταστέλλουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου δίνοντας υδρογόνα ή ηλεκτρόνια, απενεργοποιώντας τις ελεύθερες ρίζες και ενεργοποιώντας ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα. Επίσης, χηλικοποιούν προ-οξειδωτικές μεταλλοενώσεις. Παρόλο που τα φαινολικά αποδεικνύουν ότι καταστέλλουν ορισμένα είδη καρκίνου in vitro σε κύτταρα και in vivo σε ζωικά μοντέλα, οι μελέτες σε ανθρώπους είναι λιγότερο σαφείς. Τα φαινολικά χρησιμοποιούνται και ως αντιμικροβιακά συντηρητικά, χρωστικές τροφίμων και ενισχυτικά γεύσης (Wrigley, et al., 2016). Για ανθρώπους που στη διατροφή τους δεν περιέχονται

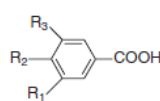
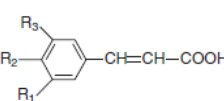
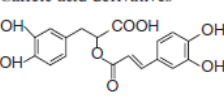
μεγάλες ποσότητες φρούτων και λαχανικών, η χρήση συμπληρωμάτων με εγκλεισμένες πολυφαινόλες μπορούν να έχουν ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία (Garti, 2008).

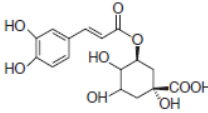
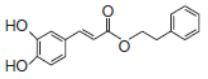
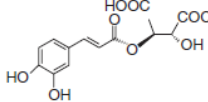
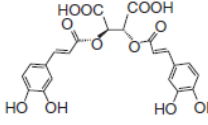
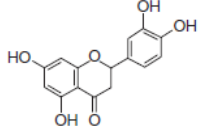
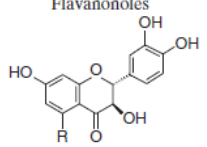
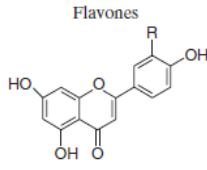
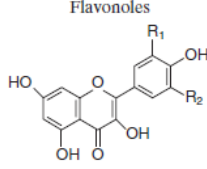
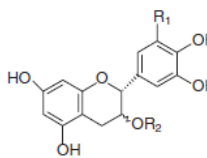


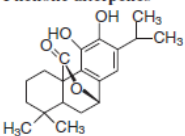
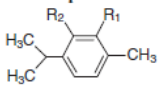
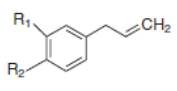
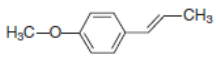
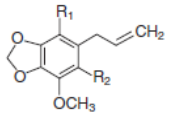
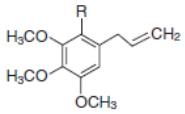
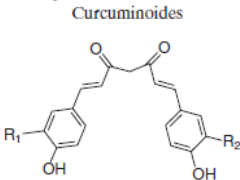
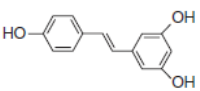
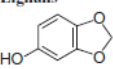
Σχήμα 4.2 Ταξινόμηση των φαιολικών αντιοξειδωτικών

Τα πιο δραστικά αντιοξειδωτικά στα βότανα που χρησιμοποιούνται ως μπαχαρικά είναι οι φαιολικές ενώσεις που έχουν τουλάχιστον δύο υδροξυλικές ομάδες σε όρθο ή πάρα θέσεις, όπως είναι το καφεϊκό οξύ, οι περισσότερες φλαβόνες και οι κατεχίνες. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται ορισμένα φυσικά αντιοξειδωτικά (Ροκορνύ & Ράnek, 2012).

Πίνακας 4.1 Δομή φυσικών αντιοξειδωτικών και φυτά από τα οποία προέρχονται

Group of compounds	Important compounds	Example of sources
Phenolic acids		
Benzoic acid derivatives	$R_1=R_2=OH, R_3=H$ Protocatechuic acid $R_1=R_2=R_3=OH$ Gallic acid	Common herbs
		
Cinnamic acid derivatives	$R_1=R_3=H, R_2=OH$ p-Coumaric acid $R_1=R_2=OH, R_3=H$ Caffeic acid $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$ Ferulic acid $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$ Sinapic acid	Common herbs
		
Caffeic acid derivatives	Rosmarinic acid	Thyme Sage Rosemary Oregano Basil Marjoram <i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Salvia officinalis</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Origanum vulgare</i> L. <i>Ocimum basilicum</i> L. <i>Majorana hortensis</i> Moench
		

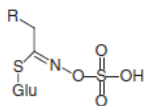
	Chlorogenic acid	Sage Rosemary Oregano Dill Bay leaf	<i>Salvia officinalis</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Origanum vulgare</i> L. <i>Anethum graveolens</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L.
	Caffeic acid Phenylethylester	Basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.
	Caffeoyl tartaric acid	Basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.
	Cichoric acid	Basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.
Flavonoids and catechins Flavanones	Eriodictiol	Sumac	<i>Rhus</i> spp. L.
			
Flavanonoles	R=OH Taxifolin R=H Fustin	Sumac	<i>Rhus</i> spp. L.
			
Flavones	R=H Apigenin R=OH Luteolin	Parsley Celery Garlic Onion Thyme Rosemary	<i>Petroselinum crispum</i> A.W.Hill <i>Apium graveolens</i> L. <i>Allium sativum</i> L. <i>Allium cepa</i> L. <i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.
			
Flavonoles	R ₁ =R ₂ =H Kaempferol R ₁ =OH, R ₂ =H Quercetin R ₁ =R ₂ =OH Myricetin R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =H Isorhamnetin	Celery Garlic Onion Chive Dill Bay leaf	<i>Apium graveolens</i> L. <i>Allium sativum</i> L. <i>Allium cepa</i> L. <i>Allium schoenoprasum</i> L. <i>Anethum graveolens</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L.
			
(+)-Catechins and (-)-Epicatechins	(+)-Catechin and (-)-Epicatechin (+)-Gallocatechin and (-)-Epigallocatechin and its gallates	Dill Bay leaf Oregano Savory	<i>Anethum graveolens</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L. <i>Origanum</i> spp. L. <i>Satureja</i> spp. Mill.
			

<p>Phenolic diterpenes</p> 	<p>Carnosol Related compounds: carnosic acid, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol</p>	<p>Rosemary Sage</p>	<p><i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Salvia officinalis</i> L.</p>
<p>Volatile phenols</p> 	<p>R₁=OH, R₂=H Carvacrol R₁=H, R₂=OH Thymol</p>		<p><i>Lamiaceae</i> family <i>Origanum</i> spp. L. <i>Satureja</i> spp. Mill. <i>Thymus</i> spp. L. <i>Thymbra</i> spp. L.</p>
	<p>R₁=H, R₂=O-CH₃ Estragol R₁=O-CH₃, R₂=OH Eugenol</p>	<p>Basil Star-anise Clove Cinnamon Anise Tarragon</p>	<p><i>Ocimum basilicum</i> L. <i>Illicium verum</i> Hook <i>Eugenia caryophyllata</i> (<i>Syzygium aromaticum</i> L.) <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl (<i>C. zeylanicum</i> Blume) <i>Pimpinella anisum</i> L. <i>Artemisia dracunculus</i> L.</p>
	<p>(<i>E</i>)-Anethol</p>	<p>Dill Caraway Coriander Star-anise</p>	<p><i>Anethum graveolens</i> L. <i>Carum carvi</i> L. <i>Coriandrum sativum</i> L. <i>Illicium verum</i> Hook</p>
<p>Polyalkoxybenzenes</p> 	<p>R₁=O-CH₃, R₂=H Apiol R₁=H, R₂=O-CH₃ Dillapiol R₁=R₂=H Myristicin</p>	<p>Parsley Celery Dill Caraway Bay leaf</p>	<p><i>Petroselinum crispum</i> A.W.Hill <i>Apium graveolens</i> L. <i>Anethum graveolens</i> L. <i>Carum carvi</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L.</p>
	<p>R=H Elemicin R=O-CH₃ Allyltetramethoxybenzene</p>		
<p>Other phenols</p> <p>Curcuminoides</p> 	<p>R₁=R₂=O-CH₃ Curcumin R₁=O-CH₃, R₂=H Demethoxycurcumin R₁=R₂=H Bisdemethoxycurcumin Related compounds: cyclocurcumin, calebin, etc.</p>	<p>Turmeric (curcuma) Galangal</p>	<p><i>Curcuma</i> spp. L. <i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.</p>
<p>Resveratrol</p> 		<p>Grape wine Bay leaf</p>	<p><i>Vitis vinifera</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L.</p>
<p>Lignans</p> 	<p>Sesamol</p>	<p>Sesame</p>	<p><i>Sesamum indicum</i> L.</p>

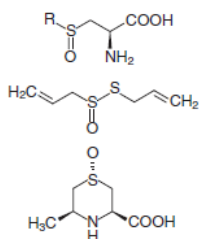
Sulphuric compounds

Thiols	Cysteine Homocysteine N-acetylcysteine Glutathione γ -Glutamylcysteine	Ginger Mustard Fenugreek Turmeric Cardamom	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe <i>Sinapis alba</i> L. <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. <i>Curcuma longa</i> L. <i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton
--------	---	--	---

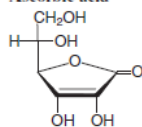
Glucosinolates	R = 4-hydroxybenzyl Sinalbin	Mustard	<i>Sinapis alba</i> L.
----------------	---------------------------------	---------	------------------------



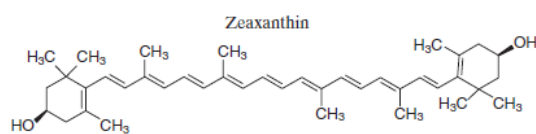
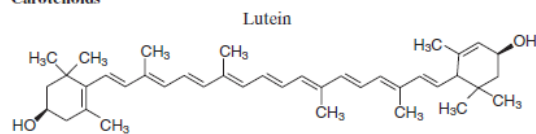
Alliin and related compounds	R=CH ₂ =CH-CH ₂ Alliin R=CH ₃ -CH=CH Isoalliin R=CH ₃ methiin Allicin Cycloalliin	Onion Garlic Leek Chive	<i>Allium</i> spp. <i>Allium cepa</i> L. <i>Allium sativum</i> L. <i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> (L.) J. Gay <i>Allium schoenoprasum</i> L.
------------------------------	---	----------------------------------	--



Ascorbic acid	L-ascorbic acid	Common herbs
---------------	-----------------	--------------



Carotenoids



Parsley
Celery
Basil
Coriander
Dill

Petroselinum crispum A.W.Hill
Apium graveolens L.
Ocimum basilicum L.
Coriandrum sativum L.
Anethum graveolens L.

4.6.1.1 Φλαβονοειδή

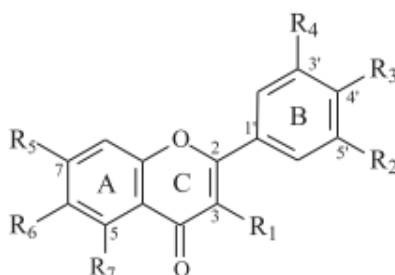
Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία των πολυφαινολών που βρίσκονται στα φρούτα και στα λαχανικά (Lucas-Abellan, et al., 2008). Τα ευεργετικά αποτελέσματα, που σχετίζονται με την υγεία, αυτών των αντιοξειδωτικών ενώσεων έχουν συσχετιστεί με αντινεοπλαστικές, αντιμεταλλαξιογόνες και αντιγηραντικές ιδιότητες (Zaveri, 2006). Η κατανάλωση φυτών πλούσιων σε φλαβονοειδή όπως το κακάο, το κρασί, το τσάι και τα μούρα έχουν συσχετιστεί με την προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις και ορισμένα είδη καρκίνου (Biot, et al., 1997) (Lucas-Abellan, et al., 2008).

Οι φλαβονόλες αποτελούν μια κύρια υποομάδα των φλαβονοειδών. Αυτές οι ουσίες εντοπίζονται σε πολλά τρόφιμα όπως σε μήλα, κεράσια, εσπεριδοειδή, κρεμμύδια, μπρόκολα και σε άλλα πράσινα λαχανικά. Η δομή αυτών των ενώσεων είναι καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η οποία έχει συσχετιστεί με τη χηλικόποιηση μετάλλων (Symonowicz & Kolanek, 2012), την αναστολή οξειδωτικών ενζύμων (Panche, et al., 2016) και την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Alia, et al., 2006) (Roig & Josepa Salvadó, 2002).

4.6.1.1.1 Κερκετίνη

Η κερκετίνη (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one) είναι ένα διατροφικό φλαβονοειδές, το οποίο υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες στην κάπαρη και τον κόλιανδρο, ενώ σε μικρότερες συναντάται στο κρεμμύδι, στα σταφύλια, στα κεράσια και σε άλλα φρούτα και λαχανικά (Bischoff, 2008). Στα φυτά, η κερκετίνη είναι συνήθως συνδεδεμένη με σάκχαρα, αιθέρες ή φαινολικά οξέα (Wang, et al., 2016). Διαφορετικές μορφές παράγωγων της κερκετίνης επηρεάζουν το ρυθμό απορρόφησης αυτών από το λεπτό έντερο και το στομάχι (Walle, 2004) (Mullen, et al., 2008). Το περιεχόμενο και το είδος των παράγωγων αυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση (Rahman, et al., 2006) (Wiczowski & Piskula, 2004).

Η κερκετίνη έχει μια τυπική δομή φλαβονοειδούς και περιέχει 5 υδροξυλομάδες. Στο σχήμα 4.3 παρουσιάζονται τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών: 2 βενζολικοί δακτύλιοι (A και B) συνδέονται με ένα δακτύλιο πυρενίου (C) που περιέχει οξυγόνο.



Σχήμα 4.3 Δομή κερκετίνης

Η κερκετίνη βρίσκεται συνήθως στη γλυκοσιδική της μορφή, στην οποία αντικαθίσταται μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες από διαφορετικού τύπου σάκχαρα. Οι κυριότερες ομάδες παράγωγων κερκετίνης παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2. Τα κυριότερα παράγωγα της κερκετίνης είναι Ο-γλυκοζίτες. Η κερκετίνη και τα παράγωγα της συνήθως βρίσκονται σε μορφή κίτρινης σκόνης ή κρυστάλλων (Wang, et al., 2016).

Πίνακας 4.2 Τα παράγωγα της κερκετίνης

Systematic name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin)	O-Rha	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→ 6)-glucoside (rutin)	O-RG	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin)	O-Glu	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside (Hyperoside)	O-Gal	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 7- <i>O</i> -glucoside	OH	OH	OH	H	OH	H	O-Glu
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside-7- <i>O</i> -glucoside	O-Rha	OH	OH	O-Glu	OH	H	OH
Quercetin 6- <i>C</i> - glucoside	OH	OH	OH	H	OH	Glu	OH
Quercetin 3'- methyl ether (isohramnetin)	OH	O-Met	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 7- methyl ether (rhamnetin)	OH	OH	OH	H	OH	H	O-Met
Quercetin 4'- methyl ether (tamarixetin)	OH	OH	O-Met	H	OH	H	OH

Gal: galactose; Glu: glucose; Rha: rhamnose; RG: rhamnosyl glucose; Met: methyl

Αυτή η φλαβονόλη έχει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα, είναι χημικά ασταθής και έχει μικρό χρόνο ημιζωής, χαρακτηριστικά τα οποία μειώνουν την αποτελεσματικότητα της όταν χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και φάρμακα (Wang, et al., 2016). Η κερκετίνη είναι μια λιπόφιλη ένωση, μέτρια διαλυτή στην αιθανόλη (Priprem, et al., 2008) και ιδιαίτερα διαλυτή στο διμεθυλοσουλφοξείδιο (Ferry, et al., 1996). Όμως, η διαλυτότητα του στο νερό είναι περίπου 0,01mg/mL (25 °C) (Gao, et al., 2011). Επομένως, είναι δύσκολο να ενσωματωθούν απευθείας μεγάλες ποσότητες κερκετίνης σε μήτρες τροφίμων που έχουν σαν βάση το νερό.

Ωστόσο, η κερκετίνη έχει προσελκύσει αυξημένο ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών (González-Manzano, et al., 2010), αντιπαχυσαρκικών (Nabavi, et al., 2015), αντικαρκινικών (Brito, et al., 2015), αντιϊκών (WU, et al., 2015), αντιβακτηριακών (Jaisinghani & Mansukhani, 2017) και αντιφλεγμονωδών (Comalada, et al., 2005) αποτελεσμάτων της. Η ένωση αυτή έχει αναφερθεί ότι έχει καλές δυνατότητες για τη χρήση της στη θεραπεία του καρκίνου (Baghel, et al., 2012). Μελέτες έδειξαν ότι η κερκετίνη μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό διάφορων τύπων καρκινικών κυττάρων (π.χ. κυττάρων του παχέος εντέρου, του προστάτη, του ήπατος, του παγκρέατος και του πνεύμονα) ρυθμίζοντας τις κυτταρικές διεργασίες τους και περιορίζοντας την ανάπτυξη τους (Wang, et al., 2016). Αναφέρεται σε έρευνες ότι η αντικαρκινική λειτουργία της κερκετίνης συνδέεται ουσιαστικά με την ισχυρή αντιοξειδωτική της ικανότητα (Bathiaie & Tamanoi, 2015). Η σταθερότητα της κερκετίνης έχει μελετηθεί εκτεταμένα για να διερευνηθούν οι χημικές αλλαγές της κατά την επεξεργασία και την συντήρηση των τροφίμων. Η περιεκτικότητα σε κερκετίνη ή σε παράγωγα της μπορεί να μειωθεί δραματικά ως αποτέλεσμα της οξειδωσης και της υποβάθμισης αυτών κατά την επεξεργασία και αποθήκευση (Buchner, et al., 2006) (Casagrande, et al., 2006) (Borghetti & Bassani, 2012). Η σταθερότητα της κερκετίνης σε διαφορετικά συστήματα τροφίμων μπορεί να επηρεαστεί από τη συγκέντρωση του

οξυγόνου, το pH, τη θερμοκρασία, όπως και από τη παρουσία άλλων αντιοξειδωτικών, μεταλλικών ιόντων ή άλλων συστατικών όπως η γλουταθειόνη (GSH) (Boots, et al., 2003).

Η κερκετίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό *in vitro* και είναι ένας από τους ισχυρότερους δεσμευτές των δραστικών ειδών οξυγόνου όπως οι ρίζες $O_2^{\bullet-}$ και $ONOO^-$. Μπορεί να απενεργοποιήσει δραστικές ρίζες οξυγόνου και να περιορίσει τη λιπιδική οξείδωση με τη χηλικοποίηση των ιόντων σιδήρου. Έχει τη δυνατότητα να προωθήσει τη μετατροπή του Fe^{+2} σε Fe^{+3} , το οποίο είναι λιγότερο αποτελεσματικό στη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Η αντιοξειδωτική της δραστηριότητα αποδίδεται στα εξής χαρακτηριστικά: μια κατεχολική ομάδα στον Β δακτύλιο, ένας 2,3 διπλός δεσμός σε σύζευξη με μια 4-οχο ομάδα στο δακτύλιο C και δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 5 και 7 στο δακτύλιο A και μία υδρόξυ ομάδα στη θέση 3 στον ετεροκυκλικό δακτύλιο. Η δράση της κερκετίνης μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα να δωρίζει ηλεκτρόνια από το βενζολικό δακτύλιο, ενώ αυτός παραμένει σχετικά σταθερός (Wang, et al., 2016).

Η κερκετίνη θεωρείται καλύτερο αντιοξειδωτικό από τα συνθετικά BHA και BHT (Lucas-Abellan, et al., 2008), αλλά και από το παλμιτικό ασκορβύλιο, το trolox και τη ρουτίνη (Linkeviciute, et al., 2015).

Όσο αφορά την αντιφλεγμονώδη ικανότητα της κερκετίνης συνδέεται με τις ιδιότητες δέσμευσης των οξειδωτικών και των ελεύθερων δραστικών ριζών. Τα δραστικά είδη οξυγόνου δεν υπάρχουν μόνο στη διαδικασία οξείδωσης, αλλά συμμετέχουν επίσης στη φλεγμονή με την ενεργοποίηση παραγόντων μεταφοράς. Η εξάλειψη των δραστικών ειδών οξυγόνου μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση και να αναστείλει τη φλεγμονή ταυτόχρονα.

Πρόσφατα, ορισμένες μελέτες ανέφεραν ότι η τακτική πρόσληψη φλαβονοειδών με τη τροφή μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Ενώ άλλες έρευνες έδειξαν την επίδραση της κερκετίνης στην αναστολή των καρδιοαγγειακών παθήσεων. Για τους υπερτασικούς ασθενείς, η πρόσληψη κερκετίνης (730 mg/day, για 4 βδομάδες) βρέθηκε να μειώνει τη συστολική, τη διαστολική και την αρτηριακή πίεση (Wang, et al., 2016).

Η ημερήσια πρόσληψη της υπολογίζεται κατά μέσο όρο σε 10 mg, ενώ η ένωση είναι διαθέσιμη ως συμπλήρωμα διατροφής με ημερήσιες δόσεις μεταξύ 200 και 1200 mg (Catauro, et al., 2016). Ο κύριος περιορισμός της θεραπευτικής χρήσης της κερκετίνης είναι η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα της και η αστάθεια της μέσα σε παραδοσιακά σκευάσματα που χορηγούνται από το στόμα (Linkeviciute, et al., 2015). Προκειμένου να επεκταθεί η χρήση της σε κλινικές εφαρμογές και να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της διαλυτότητας, της αστάθειας και της βιοδιαθεσιμότητας, είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί ένα κατάλληλο σύστημα διανομής με τη παγίδευση/προσρόφηση της ουσίας σε ευνοϊκό περιβάλλον. Μια τέτοια πρακτική είναι η χρήση γαλακτωμάτων (Jain, et al., 2013) (Casagrande, et al., 2007).

4.6.1.2 Φαινολικά οξέα

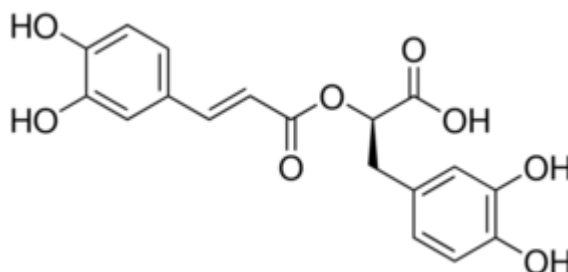
Μια άλλη σημαντική κατηγορία των φαινολών είναι και τα φαινολικά οξέα που συναντώνται στα περισσότερα φυτά και στην πλειονότητα τους συμβάλλουν στο χρώμα και τη γεύση τους. Χημικά, τα φαινολικά οξέα μπορούν να οριστούν ως ουσίες που διαθέτουν ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο με ένα ή περισσότερους υδρογονωμένους

υποκαταστάτες, συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών παραγώγων τους. Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων: παράγωγα βενζοϊκού οξέος και παράγωγα κινναμωμικού οξέος (Bartosz, 2014).

4.6.1.2.1 Ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ είναι ένας εστέρας του καφεϊκού και του λακτικού οξέος (Ou, et al., 2017), ενώ αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του δεντρολίβανου (Bai, et al., 2010), της μέντας (Shekarchi, et al., 2012) και του θυμαριού (Kruma, et al., 2008). Είναι επίσης κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων των φυτών *Oregano vulgare* (ρίγανη), *Salvia fruticosa* (φασκόμηλο) και *Satureja hortensis* (θρούμπι) (Exarchou, et al., 2002). Οι κύριες βιολογικές δράσεις αυτών των φυτών, τα οποία συχνά χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική, σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το περιεχόμενο ροσμαρινικό οξύ αλλά και με τη παρουσία άλλων συστατικών όπως κερκετίνης και ρουτίνης (Gião, et al., 2009).

Το ροσμαρινικό οξύ εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις του, είναι επιπλέον αντιαλλεργικό, αντικό και αντιβακτηριακό, ενώ εμφανίζει και πολύ χαμηλή τοξικότητα (Petersen & Simmonds, 2003) (Furtado, et al., 2008). Ως αντιοξειδωτικό βοηθάει στη πρόληψη και τη μείωση του οξειδωτικού στρες, μειώνοντας έτσι τη βλάβη των κυττάρων και τον κίνδυνο σχηματισμού καρκίνου. Στην πραγματικότητα, οι επιπτώσεις του καρκίνου του δέρματος έχουν αποφευχθεί και αντιστραφεί με τη τοπική εφαρμογή ροσμαρινικού οξέος. Επίσης η χορήγηση του σε πειραματόζωα κατάφερε να βελτιώσει τη μνήμη τους, δρώντας σαν αναστολέας της δράσης των ONOO^- τα οποία είναι υπεύθυνα σε μεγάλο ποσοστό για τη νόσο του Αλσχάϊμερ (Alkam, et al., 2007).



Σχήμα 4.4 Δομή ροσμαρινικού οξέος

4.6.2 Τοκοφερόλες (βιταμίνη E)

Η βιταμίνη E είναι μια υδρόφοβη βιταμίνη η οποία έχει μελετηθεί εντατικά εξαιτίας τόσο των αντιοξειδωτικών όσο και των μη αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων. Η οικογένεια των βιταμινών E αποτελείται από τέσσερις τοκοφερόλες (α,β,γ,δ) και από τέσσερις τοκοτριενόλες (α,β,γ,δ). Πηγές βιταμίνης E είναι τα φυτικά έλαια, ο ηλιόσπορος, το αμύγδαλο, τα καρύδια, τα δημητριακά και άλλα. Η βιταμίνη E απορροφάται στο έντερο για να σχηματίσει χυλομικρά σωματίδια. Η κυκλοφορία των σωματιδίων αυτών, που σχηματίζονται από λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, βιταμίνη E και άλλες υδρόφοβες ομάδες, στο πλάσμα αποτελεί ένα μηχανισμό μεταφοράς της βιταμίνης στους μύς, το λιπώδη ιστό και τον εγκέφαλο. Οι τοκοφερόλες, μόλις φτάσουν στους ιστούς, περιορίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες και λειτουργούν προστατευτικά για αυτές, αλλά και για τα νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται εντός των κυττάρων (Li, et al., 2014). Ο ρόλος της βιταμίνης E στην πρόληψη ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η

αθηροσκλήρωση, η αρθρίτιδα, η νόσος του Αλσχάιμερ και η νόσος του Πάρκινσον, έχει τεκμηριωθεί και συνδέεται με την ικανότητα της να παγιδεύει υπεροξυλικές ρίζες και να σπάει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Έρευνες δείχνουν, επίσης, την κατασταλτική λειτουργία της έναντι διάφορων όγκων. Η στοχοθετημένη χορήγηση της βιταμίνης E στα κυτταροπλασματικά διαμερίσματα μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της ως αντιοξειδωτικό και μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

4.6.3 Συνένζυμο 10 (Q₁₀)

Το συνένζυμο 10 είναι ένα υδρόφοβο μόριο. Μπορεί να λειτουργεί ως φορέας ηλεκτρονίων και μετατοπιστής πρωτονίων. Το συνένζυμο Q₁₀ συναντάται σε φυτά, ζώα και κάποιους μικροοργανισμούς. Αυτή η ένωση διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην ενεργειακή μετατροπή, την αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών, την αναστολή του κυτταρικού θανάτου και τη ρύθμιση τα κυτταρικής ανάπτυξης. Η εντερική απορρόφηση γίνεται με παρόμοιο τρόπο με τη βιταμίνη E, κυρίως, λόγω των λιπόφιλων χαρακτηριστικών του και ενισχύεται από τη παρουσία λιπιδίων. Συμπληρώματα με αυτή την ουσία έχουν χρησιμοποιηθεί για τα πιθανά οφέλη τους σε καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις, καρκίνο, γήρανση, ημικρανία και άλλα. Ωστόσο, τα συμπληρώματα του Q₁₀ που χορηγούνται από το στόμα έχει αποδειχθεί ότι έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα (περίπου 3±5%), κυρίως λόγω των υδρόφοβων χαρακτηριστικών του συστατικού. Σκευάσματα ελαίου, γαλακτωμάτων και σκόνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της απορρόφησης με θετικά αποτελέσματα (Garti, 2008).

4.6.4 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι μια κατηγορία αντιοξειδωτικών που αποτελείται από περισσότερες από 500 ταυτοποιημένες ενώσεις, ενώ βρίσκονται σε αφθονία σε έγχρωμα λαχανικά όπως τα καρότα, το μπρόκολο, το σπανάκι, τα βερίκοκα, τις ντομάτες, τα μπιζέλια, τα πορτοκάλια και τις πιπεριές. Το χαρακτηριστικό των καροτενοειδών είναι ο ακόρεστος σκελετός 40 ανθράκων, ο οποίος περιέχει πολλούς διπλούς δεσμούς, και προσδίδει υδροφοβικότητα στην ένωση. Τα πιο συνηθισμένα καροτενοειδή στα φυτά είναι το β-καροτένιο, το γ-καροτένιο και το λυκοπένιο ενώ τα αυτά που απαντώνται σε αφθονία στους ανθρώπους είναι το α και β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη, η κρυπτοξανθίνη και η λουτεΐνη. Η απορρόφηση και σε αυτή τη περίπτωση είναι παρόμοια με αυτή των τοκοφερολών. Η λιποφιλικότητα και η δομή επηρεάζουν την κατανομή των ενώσεων στα κυτταρικά συστήματα *in vivo*. Αυτά τα συστατικά, επειδή έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, συσχετίζονται με άλλα συστατικά για να βελτιωθεί η απορρόφηση τους, όπως με λιποπρωτεΐνες, ενώ εντοπίζονται σε λιπόφιλα τμήματα του κυττάρου (δηλαδή πλασματική μεμβράνη, μιτοχόνδρια, σύμπλεγμα Golgi) (Garti, 2008). Μπορούν να εξουδετερώσουν το μονήρες οξυγόνο και επίσης μπορούν να αντιδράσουν με τις δραστικές ρίζες με τρεις τρόπους με μεταφορά ηλεκτρονίων, μεταφορά υδρογόνου και σύζευξη ριζών. Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι αυτές οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν προστατευτικές δράσεις έναντι του διαβήτη, των νευροεκφυλιστικών, των καρδιαγγειακών και των φλεγμονωδών ασθενειών (Li, et al., 2014).

4.6.5 Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Το ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή ένωση που συναντάται κυρίως σε φρέσκα λαχανικά (μπρόκολο, πιπεριές, λαχανάκια Βρυξελών) και σε φρούτα (πορτοκάλι, παπάγια, φράουλες) (Garti, 2008). Ως υδατοδιαλυτή ένωση δρα ως αντιοξειδωτικό μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος, των σωματικών υγρών και των κυττάρων, προστατεύοντας τα κύτταρα και τους ιστούς από τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον ως δότης υδρογόνου, μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως έμμεσο αντιοξειδωτικό μειώνοντας την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E. Λόγω αυτού του γεγονότος το ασκορβικό οξύ αποτελεί, σε συνεργασία με τη βιταμίνη E, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Συνεργιστική δράση έχει αναφερθεί και όταν η εν λόγω βιταμίνη συνδυάζεται με την βιταμίνη E και καροτενοειδή με αποτέλεσμα την αντιμετώπιση της οξειδωτικής βλάβης που δημιουργείται από δραστικές ρίζες αζώτου. Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το ασκορβικό οξύ προστατεύει το σώμα από πολλές ασθένειες που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο και κίρρωση (Li, et al., 2014).

4.6.6 Δράση αρωματικών φυτών στα τρόφιμα

Τα βότανα και τα μπαχαρικά έχουν χρησιμοποιηθεί για αιώνες για να διατηρήσουν τα τρόφιμα και να τα καταστήσουν πιο εύγευστα και νόστιμα. Πολλά από αυτά τα φυτά χρησιμοποιούνταν ευρέως για να καλύψουν τις άσχημες μυρωδιές που εκπεμπόταν από τα τρόφιμα όταν δεν είχε ανακαλυφθεί ακόμα το ψυγείο. Ωστόσο, άλλα βότανα και μπαχαρικά μπορούν να δράσουν ως λειτουργικά συστατικά. Σε αυτή τη περίπτωση οι ενώσεις που περιέχονται στα φυτά διαθέτουν χημική λειτουργικότητα, έτσι αυτές παρεμβαίνουν στις χημικές και βιολογικές διεργασίες της γήρανσης και της αλλοίωσης των τροφίμων (Berdahl & McKeague, 2015). Τα μπαχαρικά και τα βότανα αποτελούν πλούσιες πηγές φυτοχημικών (Embuscado, 2015).

4.6.6.1 Θρούμπι (*Satureja thymbra*)

Η οικογένεια με το μεγαλύτερο αριθμό αρωματικών φυτών που απαντάται στην ελληνική χλωρίδα είναι η οικογένεια *Lamiaceae*, διότι τα περισσότερα μέλη της παράγουν αιθέρια έλαια, είναι ενδημικά και συμμετέχουν σε όλους τους τύπους βλάστησης των διάφορων κλιματικών περιοχών της χώρας (Πανταζοπούλου, 2012). Σχεδόν 7000 είδη ανήκουν σε περισσότερα από 230 γένη της οικογένειας των χειλανθών (*Lamiaceae*). Μεταξύ αυτών το γένος *Satureja* περιλαμβάνει πάνω από 200 διαφορετικά είδη βοτάνων και θάμνων, τα περισσότερα από τα οποία είναι αρωματικά και βρίσκονται κυρίως στη Μεσόγειο, την Ασία, αλλά και σε κάποια τμήματα των ΗΠΑ (Jafari, et al., 2016). Τα λουλούδια, τα φύλλα, οι μίσχοι και οι σπόροι αυτών των φυτών χρησιμοποιούνται παγκοσμίως ως γιατροσόφια για διάφορες ασθένειες όπως ναυτία, διάρροια, μυϊκούς πόνους, καούρες και μολυσματικές ασθένειες (Güllüce, et al., 2003).

Τα βότανα της οικογένειας *Lamiaceae* είναι γνωστές πρώτες ύλες που περιέχουν βιοδραστικές, αντιμικροβιακές ή αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η τρέχουσα μεταποίηση αυτών των βοτάνων περιορίζεται στην ανάκτηση του αιθέριου ελαίου, ενώ τα υπόλοιπα απορρίπτονται ως απόβλητα δημιουργώντας συχνά δυσμενείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Ωστόσο, το αιθέριο έλαιο αποτελεί ένα μικρό κλάσμα του φυτού, ενώ τα στερεά απόβλητα που παραμένουν μετά την ανάκτηση του αιθέριου ελαίου περιέχουν πολυφαινολικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί ή αντιοξειδωτικοί

παράγοντες. Τα φλαβονοειδή, οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών και τα φαινολικά οξέα μπορούν να ανακτηθούν από αρωματικά φυτά με διαδοχικές εκχυλίσεις με οργανικούς διαλύτες (Tsimogiannis, et al., 2017).

Το φυτό *Satureja thymbra* είναι ένα ενδημικό φυτό το οποίο χαρακτηρίζεται από μια μυρωδιά παρόμοια με αυτή της ρίγανης. Η κύρια παραγωγή του είναι στην κεντρική και ανατολική Μεσόγειο (Skoula, et al., 2005). Τα φαινολικά συστατικά του *S. thymbra*, ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή και οι γλυκοζίτες τους, μπορούν να αποτελέσουν αντιοξειδωτικά πρόσθετα (Öztürk, 2012). Μελέτες σχετικά με το αιθέριο έλαιο του φυτού *Satureja thymbra* έδειξαν την αποτελεσματικότητα αυτού του είδους στην καταπολέμηση θετικών και αρνητικών Gram στελεχών (Jafari, et al., 2016).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΕΜΠ έδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του φυτού *S. thymbra* περιέχουν σε μεγάλη ποσότητα ροσμαρινικό οξύ. Ένα άλλο συστατικό των εκχυλισμάτων είναι το σαλβιανολικό οξύ. Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα περιέχει επίσης σημαντική ποσότητα καρβακρόλης σε αντίθεση με το αιθανολικό, ενώ και τα δύο περιέχουν απειροελάχιστη ποσότητα κερκετίνης (Choulitoudi, et al., 2016).

4.7 Αντιοξειδωτική δράση σε γαλακτώματα

Η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται από τη μοριακή δομή των ενώσεων. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό της δράσης και το χαρακτηρισμό μιας ένωσης ως αντιοξειδωτική. Παρόλα αυτά, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τη δράση ενώσεων, με αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση, δεν κατέληξαν στα ίδια αποτελέσματα όταν προστέθηκαν σε γαλακτώματα. Για αυτό το λόγο, η επιλογή του αντιοξειδωτικού που θα χρησιμοποιηθεί σε κάποιο τρόφιμο δεν πρέπει να βασίζεται, αποκλειστικά, στην αντιοξειδωτική του δράση, αλλά θα πρέπει να συνυπολογίζεται και η αλληλεπίδραση τους με τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος.

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επιδράσουν στην οξείδωση των γαλακτωμάτων, ορισμένοι από αυτούς μπορούν να επηρεάσουν και την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών. Η θέση των αντιοξειδωτικών στα συστήματα τροφίμων έχει μεγάλη επίδραση στα δράση τους. Ωστόσο, κάποιοι παράγοντες μπορεί να μεταβάλλουν τις θέσεις (π.χ. γαλακτωματοποιητές) των αντιοξειδωτικών και έτσι να επηρεαστεί η αποτελεσματικότητά τους.

Στα γαλακτώματα, τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι είτε στην υδατική φάση, είτε στη λιπαρή φάση είτε στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Δεδομένου ότι η οξείδωση των γαλακτωμάτων αρχίζει στη διεπιφάνεια, η θέση του αντιοξειδωτικού είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Για την επιλογή του κατάλληλου αντιοξειδωτικού στα γαλακτωματοποιημένα τρόφιμα πρέπει να ληφθεί υπόψη η πολυπλοκότητα των συστημάτων (Shahidi, 2015).

Γαλακτωματοποιητής. Η κύρια συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή είναι στη διεπιφάνεια, στη περιοχή δηλαδή που αρχίζει η οξείδωση. Το φορτίο ενός γαλακτωματοποιητή μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητά του αντιοξειδωτικού. Οι (Sørensen, et al., 2008) ανέφεραν ότι η επίδραση του καφεϊκού οξέος σε ο/w

γαλακτώματα επηρεάστηκε από τη χρήση του γαλακτωματοποιητή (Citrem → ανιονικός και Tween 80 → μη ιονικός). Σε pH 6 με Tween 80 ως γαλακτωματοποιητή, το καφεϊκό οξύ προώθησε το σχηματισμό δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε Citrem το καφεϊκό οξύ δεν είχε καμιά επίδραση στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων παρουσία ιόντων σιδήρου, ενώ απουσία αυτών παρατηρήθηκε μικρής κλίμακας αντιοξειδωτική δράση. Η συγκέντρωση του γαλακτωματοποιητή μπορεί, επίσης, να μεταβάλλει τη δράση του προστιθέμενου αντιοξειδωτικού.

pH. Το pH μπορεί να επηρεάσει την αποικοδόμηση των αντιοξειδωτικών. Οι (Narita & Inouye, 2013) διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση του χλωρογενικού και του καφεϊκού οξέος μειώθηκε, λόγω αποικοδόμησης, με αύξηση του pH στο εύρος 5,0-9,0. Πέρα από την αποικοδόμηση των αντιοξειδωτικών, το pH επιδρά και στη δράση τους. Για παράδειγμα ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (EGCG) έδρασε προ-οξειδωτικά σε γαλακτώματα με έλαιο λιναρόσπορου και σε pH μεταξύ 2,0 και 4,0. Δεδομένου ότι τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αποικοδομηθούν ή να οδηγήσουν σε προ-οξειδωτική δράση σε ορισμένες τιμές pH, πρέπει να γίνεται προσεκτικά η επιλογή των αντιοξειδωτικών στα διαφορετικά τρόφιμα (Zhou & Elias, 2013).

Συγκέντρωση αντιοξειδωτικού. Ανεξάρτητα από την πολυπλοκότητα των γαλακτωμάτων τροφίμων, η αποτελεσματική δράση επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Ορισμένα αντιοξειδωτικά, όπως ο παλμιτικός ασκορβυλεστέρας, μπορεί να έχουν προ-οξειδωτική δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις (Let, et al., 2007). Επιπλέον, τα προστιθέμενα αντιοξειδωτικά μπορεί να έχουν συνεργιστική ή προ-οξειδωτική δράση συνδυασμένα με ενδογενή αντιοξειδωτικά ή με κάποιο άλλο συστατικό του τροφίμου.

4.7.1 Επίδραση της κερκετίνης στην οξείδωση γαλακτωμάτων

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση της κερκετίνης σε γαλακτώματα με διαφορετική λιπαρή ύλη, παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά κατασκευής των γαλακτωμάτων, οι συνθήκες φύλαξης, το είδος των μετρήσεων και η αντιοξειδωτική δράση της φλαβονόλης.

Πίνακας 4.3 Μελέτες σχετικές με την επίδραση της κερκετίνης σε γαλακτώματα

Συγκέντρωση	Λιπαρή φάση	Γαλακτωματοποιητής	pH	Θερμοκρασία	Μετρούμενη μονάδα/ μέθοδος ανάλυσης	Σημειώσεις	Βιβλιογραφία
200 ppm	Κραμβέλαιο (Κανόλα)	SDS	-	54 °C	O ₂	300 ppm Cu ²⁺ / Αντιοξειδωτική δράση	(Chen, et al., 1996)
50 μM	Έλαιο λιναρόσπορου	Tween 20	7,4	37 °C (για τα γαλακτώματα που προστέθηκε Fe ²⁺)	TBARs	Ακτινοβόληση με UV ή προσθήκη Fe ²⁺ για την έναρξη της οξείδωσης/ Αντιοξειδωτική δράση	(Chen & Ahn, 1998)
100 - 500 μM	Ηλιέλαιο χωρίς τοκοφερόλες	Tween 20	7,4	30 °C	PV, CD, hexanal	Απουσία αντιοξειδωτικής δράσης σε pH=7,4.	(Roedig-Penman & Gordon, 1999)
5 μM	Λινελαϊκό οξύ	-	7,0	37 °C	CD	Προσθήκη Fe ⁺²⁻ EDTA/Αντιοξειδωτική	(Ju & Bramlage, 1999)

0,01 μM	Λινελαϊκό οξύ	Tween 20	5,8	25 °C	Κατανάλωση O ₂	δράση Αντιοξειδωτική δράση	(Madsen, et al., 2000)
α	Λινελαϊκό οξύ	Tween 20	7,0	37 °C	thiocyanate method	Αντιοξειδωτική δράση	(Gulcin, et al., 2002)
α	Λινελαϊκό οξύ/β-καροτίνη	Tween 20	Οξυγονω-μένο απεσταγένο νερό	50 °C	β-Carotene Bleaching Method	Αντιοξειδωτική δράση	(Burda & Oleszek, 2001)
0,02% (ως προς τη λιπαρή φάση)	Κραμβέλαιο (Κανόλα)	WPI	3,0-7,0	50 °C	PV, AV, Totox	Προ-οξειδωτική δράση σε όξινο περιβάλλον	(Osborn & Akoh, 2003)
50-250 μM	Μέθυλο-λινελαϊκό οξύ	Λεκιθίνη	5,1-6,0	40 °C	CD	Αντιοξειδωτική δράση	(Kahkonen & Heinonen, 2003)
α	Λινελαϊκό οξύ/β-καροτίνη	Tween 20	-	50 °C	β-Carotene Bleaching Method	Αντιοξειδωτική δράση	(Materska & Perucka, 2005)
1-2-3,9-7,9-15,8 μM	Μέθυλο-λινελαϊκό οξύ	Tween 20	6,8	25 °C	Κατανάλωση O ₂	Αντιοξειδωτική δράση	(Becker, et al., 2007)
1,5,10,20, 40 μM	Λινελαϊκό οξύ, Λινολενικό οξύ	SDS	-	60 °C	CD	Λινελαϊκό οξύ-απουσία αντιοξειδωτικής δράσης, Λινολενικό οξύ-αντιοξειδωτική δράση	(Nogala-Kalucka, et al., 2013)
10,50,100 μM	Μέθυλο-λινελαϊκό οξύ, παλμιτικό οξύ, ιχθυέλαιο	Tween 20	7,0	50 °C	TBARs	Αντιοξειδωτική δράση	(Huber, et al., 2009)
250,350, 500 μM	Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο	Tween 20	5,5	40 °C	PV, TBARs	Αντιοξειδωτική δράση	(Mattia, et al., 2009)
100 μM	Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο	Tween 20	7,0	40 °C	PV, TBARs	Αντιοξειδωτική δράση	(Mattia, et al., 2010)
α	Λινελαϊκό οξύ/β-καροτίνη	Tween 40	-	50 °C	β-Carotene Bleaching Method	Αντιοξειδωτική δράση	(Ruzic, et al., 2010)
0,2-1 μM	Λινελαϊκό οξύ	Tween 20	7,0	37 °C	PV	Προ-οξειδωτική δράση όταν C=1μM, αντιοξειδωτική δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις	(Beker, et al., 2011)
2mM	Ραφιναρισμένο έλαιο καμέλιας	Tween 20	-	60 °C	PV, nonanal	Προ-οξειδωτική δράση	(Zhu, et al., 2013)
1-200 μM	Λινελαϊκό οξύ	TritonX100	7,4	37 °C	PV, CD	Έναρξη οξείδωσης λόγω προσθήκης AAPH ή Cu ²⁺ /Αντιοξειδωτική δράση	(Nogala-Kalucka, et al., 2013)
500-1000 ppm	Λάδι από έχιο	Tween 20	7,0	25 °C	PV, TBARs	Αντιοξειδωτική δράση	(Espinosa, et al., 2015)

^α Δεν αναγράφεται η ποσότητα της κερκετίνης

Οι Chen, et al., 1996 πραγματοποίησαν μελέτες για την δράση διάφορων φαινολικών ενώσεων σε συστήματα με λιπαρή φάση κραμβέλαιο. Η δράση των ενώσεων αυτών μελετήθηκε τόσο στην περίπτωση του καθαρού ελαίου όσο και σε γαλακτώματα τα οποία το περιείχαν. Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκε ότι η μυρισετίνη απέτρεψε αποτελεσματικότερα την απορρόφηση του οξυγόνου από το έλαιο ακολουθούμενη από την κερκετίνη και την καμπερόλη. Οι ενώσεις αυτές αποδείχτηκε ότι έχουν αντιοξειδωτική

δράση και στα γαλακτώματα, η οποία όμως είναι πιο ασθενής, ενώ πιο αποτελεσματική σε αυτή την περίπτωση αποδείχτηκε ότι είναι η κερκετίνη.

Οι Chen & Ahn, 1998 μελέτησαν το αποτέλεσμα που είχε η παρουσία έξι φαινολικών ενώσεων σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση προερχόμενη από λιναρόσπορο. Τα γαλακτώματα αυτά είχαν σταθερό pH=7,4, ενώ η έναρξη της οξείδωσης προήλθε από ακτινοβόληση αυτών ή την προσθήκη μετάλλων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, TBARs, ανιχνεύει δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης. Στην περίπτωση που η οξείδωση οφείλεται σε εφαρμογή ακτινοβολίας η αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων ακολουθεί τη σειρά: κερκετίνη > ρουτίνη = καφεϊκό οξύ = φερουλικό οξύ = σισαμόλη (ένωση που συναντάται κατά κύριο λόγο στο σησάμι) > κατεχίνη. Η ανασταλτική λειτουργία της κερκετίνης ήταν σημαντικότερη, μεταξύ των ενώσεων που μελετήθηκαν, και στην δεύτερη περίπτωση όπου η οξείδωση οφείλεται στην παρουσία ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}).

Οι Roedig-Penman & Gordon, 1999 μελέτησαν τη δράση διάφορων συγκεντρώσεων κερκετίνης τόσο σε χύμα ηλιέλαιο όσο και σε γαλακτώματα με αυτό. Για τον σκοπό αυτής της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν αναλύσεις που δείχνουν πρωτογενή (υδροϋπεροξειδία, συζυγή διένια) και δευτερογενή (πεντανάλη, εξανάλη) προϊόντα οξείδωσης. Στην περίπτωση που τα γαλακτώματα παρασκευάστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε το pH τους να είναι σταθερό και ίσο με 7,4 και σε αυτά περιέχονταν άλατα σιδήρου ή δισθενούς μετάλλου δεν εμφανίστηκε αντιοξειδωτική δράση της φλαβονόλης. Παρόλα αυτά κατά την μελέτη σε συστήματα χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα, η οξείδωση φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από το μεταβαλλόμενο pH παρά από τη συγκέντρωση της προστιθέμενης ουσίας. Επιπλέον οι ερευνητές μελέτησαν τη δράση της μυρικετίνης. Σε σύγκριση με αυτή την ένωση η κερκετίνη έχει ασθενέστερη δραστηριότητα δέσμευσης ριζών, αλλά βρέθηκε ότι δρα μέσω χηλικοποίησης μετάλλων. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η δράση της κερκετίνης όταν στα γαλακτώματα είναι παρούσες και άλλες ενώσεις. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν ήταν ότι η κερκετίνη ως αντιοξειδωτικό είναι αρκετά ισχυρό όταν στο γαλακτώμα υπάρχουν τοκοφερόλες, ενώ όταν εκτός από τις τοκοφερόλες στο σύστημα περιέχεται και κιτρικό οξύ η δράση της κερκετίνης μειώνεται.

Η μελέτη που έγινε από τους (Ju & Bramlage, 1999) σχετικά με την αποτελεσματική αντιμετώπιση της οξείδωσης σε γαλακτώματα με λιναλαϊκό οξύ με την χρήση φαινολικών ενώσεων τελικής συγκέντρωσης 5 μ M έδειξε ότι η κερκετίνη (φλαβονοειδές) εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το γαλλικό οξύ (φαινολικό οξύ) και την α-τοκοφερόλη. Το pH στην περίπτωση αυτή ήταν σταθερό και ίσο με 7.

Λιναλαϊκό οξύ ως λιπαρή φάση για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών χρησιμοποίησαν και οι (Madsen, et al., 2000). Οι συνθήκες διαφέρουν κατά πολύ από την προηγούμενη έρευνα καθώς η συγκέντρωση της κερκετίνης είναι 0,01 μ M, το περιβάλλον είναι πιο όξινο με pH=5,8 και η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ήταν η κατανάλωση του οξυγόνου. Σε αυτή τη περίπτωση έγινε σύγκριση της κερκετίνης με αρκετές άλλες ουσίες και η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων ακολουθεί την εξής σειρά: (+)κατεχίνη > (\pm)ταξιφολίνη \geq λουτεολίνη > καμφερόλη > κερκετίνη >> ναριγγενίνη. Σε αντίθεση με τις

προηγούμενες έρευνες η κερκετίνη, αν και εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση, παρουσιάζεται ως πιο αδύναμο αντιοξειδωτικό σε σχέση με άλλες φαινόλες.

Οι Gulcin, et al., 2002 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση διάφορων συνθετικών και φυσικών ενώσεων μετρώντας τις ανιοντικές ρίζες υπεροξειδίου που βρίσκονταν σε γαλακτώματα λινελαϊκού οξέος. Από αυτά τα πειράματα προέκυψε ότι στο σύστημα αυτό τα συνθετικά αντιοξειδωτικά BHA και BHT έχουν καλύτερη δράση, ενώ ακολουθεί η κερκετίνη.

Μια προσπάθεια προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης διάφορων φλαβονοειδών έγινε από τους Burda & Oleszek, 2001. Η ομάδα αυτή μελέτησε τη δράση 42 φλαβονοειδών σε γαλάκτωμα που περιείχε β-καροτένιο και λινελαϊκό οξύ. Σε αυτή τη μέθοδο το β-καροτένιο ως μόριο στόχος εκτίθεται σε ρίζες ROO[·], που προέρχονται από την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος, και αποχρωματίζεται. Ο αποχρωματισμός της ουσίας μπορεί να επιβραδυνθεί εάν στο σύστημα εμφανιστεί κάποια ένωση που δίνει άτομα υδρογόνου και απενεργοποιεί τις δραστικές ρίζες. Την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στο σύστημα που μελετάται παρουσιάζουν οι συνθετικές ενώσεις BHT και D,L-R-τοκοφερόλη. Ικανοποιητική συμπεριφορά έναντι της οξείδωσης εμφανίζουν και οι φλαβονόλες με ελεύθερη ομάδα υδροξυλίου στη θέση C-3 όπως είναι η κερκετίνη και η καμπφερόλη. Η μελέτη των γλυκοζιτικών και των μεθυλικών παραγώγων, της προηγούμενης ομάδας φαινολών, απέδειξε ότι ο φραγμός στη θέση C-3 οδηγεί σε πλήρη απώλεια της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας.

Η δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών α-τοκοφερόλη, γαλλικό οξύ και κερκετίνη μελετήθηκε από τους Osborn & Akoh, 2003 ώστε να διερευνηθούν οι διαφορές σε όξινο ή ουδέτερο περιβάλλον που περιέχει ιόντα σιδήρου. Στην περίπτωση που το περιβάλλον είναι όξινο και η συγκέντρωση του σιδήρου είναι 50 μM και οι τρεις ενώσεις παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση με βάση τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης. Στην περίπτωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης Fe (100 μM) τα αντιοξειδωτικά δεν εμφανίζουν ούτε αντιοξειδωτική ούτε προ-οξειδωτική δράση. Ένα άλλο ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι ότι για pH=3 η καταλυόμενη από το σίδηρο οξείδωση είναι μεγαλύτερης κλίμακας σε σχέση με το pH=7, επομένως οι ενώσεις που εξετάστηκαν δρουν καλύτερα σε ουδέτερο περιβάλλον. Από τη μελέτη αυτή επιβεβαιώνεται ότι τόσο η παρουσία μετάλλων όσο και το pH του συστήματος επηρεάζουν την ικανότητα διάφορων ενώσεων να διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο έναντι της οξείδωσης της λιπιδικής φάσης.

Οι Kahkonen & Heinonen, 2003 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση διάφορων ενώσεων σε μεθυλο-λινελαϊκό οξύ και σε γαλακτώματα με την ίδια λιπαρή φάση. Τα γαλακτώματα δεν παρασκευάστηκαν με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος και ως εκ τούτου κατά τη διάρκεια του πειράματος το pH παρουσίασε διακυμάνσεις μεταξύ των τιμών 5,1-6,0. Για τον προσδιορισμό των ενώσεων που δρουν ανασταλτικά ως προς την οξείδωση στο συγκεκριμένο σύστημα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης συζυγών διενίων. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της κερκετίνης στα 250 μM στο σύστημα του γαλακτώματος επέφερε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα 50 μM, ενώ αποτέλεσε ένα από τα αποτελεσματικότερα αντιοξειδωτικά, εφάμιλλο του καφεϊκού οξέος και της α-τοκοφερόλης. Το φλαβονοειδές αυτό ήταν αποτελεσματικό και κατά την

προσθήκη στη λιπαρή φάση, με τα αποτελέσματα να υποδεικνύουν ότι μετά την προσθήκη ίδιας ποσότητα η ένωση, αυτή, είναι πιο αποτελεσματική όταν προστεθεί κατευθείαν στην λιπαρή ένωση.

Η μέθοδος μέτρησης της οξειδωσης με βάση τον αποχρωματισμό του β-καροτένιου το οποίο βρίσκεται σε γαλακτώμα λινελαϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκε και από τους Materska & Pegucka, 2005. Οι ερευνητές αυτοί βρήκαν, ότι ανάμεσα στις ενώσεις που μελετήθηκαν, καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισε το trans-p-σιναπικό οξύ, ενώ ακολουθεί με αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση η κερκετίνη. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία μια γλυκοζιτική δομή της κερκετίνης (quercetin 3-O-R-L-rhamnoside) παρουσίασε πολύ ασθενή αντιοξειδωτική δράση. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Burda & Oleszek, 2001, δηλαδή η δράση της αγλυκόνης είναι πιθανό να διαφέρει αρκετά από τη γλυκοζιμένη της μορφή.

Η αντιοξειδωτική δράση της κερκετίνης, όπως επίσης της ρουτίνης, της ασταξανθίνης και της α-τοκοφερόλης μελετήθηκε από τους Becker, et al., 2007. Τα γαλακτώματα στα οποία προστέθηκαν αυτές οι ενώσεις ήταν με μεθυλο-λινελαϊκό οξύ ενώ το pH τους ήταν σταθερό και ίσο με 6,8. Ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε στο εν λόγω πείραμα ήταν η κατανάλωση του οξυγόνου. Πέρα από τη μελέτη των μεμονωμένων ενώσεων που απέδειξε την αντιοξειδωτική δράση αυτών των ενώσεων και την υπέρσχυση της κερκετίνης (σειρά αντιοξειδωτικής δράσης κερκετίνη > α-τοκοφερόλη >> ασταξανθίνη > ρουτίνη), πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συνδυαστικής δράσης των ενώσεων με την κερκετίνη. Ο συνδυασμός της κερκετίνης με την α-τοκοφερόλη έδειξε έντονη συνεργιστική δράση, ενώ με την ασταξανθίνη υπήρξε ελαφρώς αυξητική τάση της ικανότητας προστασίας των γαλακτωμάτων από την οξείδωση. Αυτά τα αποτελέσματα προέκυψαν τόσο στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων όσο και χαμηλών. Ο συνδυασμός της κερκετίνης με την ρουτίνη διαφοροποιείται ανάλογα με την συγκέντρωση, δρώντας συνεργιστικά για υψηλές και προσθετικά για χαμηλές.

Οι Nogala-Kalucka, et al., 2007 μελέτησαν τη δράση φυσικών ενώσεων σε γαλακτώματα που περιείχαν είτε λινελαϊκό οξύ είτε λινολενικό οξύ. Στην περίπτωση του γαλακτώματος λινελαϊκού οξέος η ανίχνευση της ποσότητας και του είδους των υδροϋπεροξειδίων δεν φανερώνει αντιοξειδωτική δράση της κερκετίνης σε αυτό το σύστημα. Σε συγκέντρωση 40 μΜ παρουσιάζεται ελαφριά αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οι υπεροξειδικές ρίζες έχουν ανοδική τάση, το γεγονός αυτό φανερώνει πιθανή προ-οξειδωτική δράση. Όσον αφορά το λινολενικό οξύ το σύνολο των μετρούμενων υδροϋπεροξειδίων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης δείχνει ότι η προσθήκη 40 mM κερκετίνης μπορεί να μειώσει την ποσότητα τους στο μισό. Αντίθετα, μικρότερη συγκέντρωση δεν επιδρά σημαντικά στην αναστολή της παραγωγής των υπεροξειδικών ριζών. Η ταυτόχρονη προσθήκη στα δύο διαφορετικά γαλακτώματα κερκετίνης και α-τοκοφερόλης έδειξε αποτελεσματικότερη δράση έναντι της οξείδωσης υποδεικνύοντας συνεργιστική δράση.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες φλαβονολών που συναντώνται στη φύση (κερκετίνη και γλυκοζίτες της) εξετάστηκαν από τους Huber, et al., 2009 και συγκρίθηκαν με το BHT και την α-τοκοφερόλη, ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται κατά κόρον στα τρόφιμα. Τα

αντιοξειδωτικά ενσωματώθηκαν σε επιλεγμένα πολυακόρεστα λιπαρά (μεθυλο-λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ), σε ιχθυέλαιο και σε υδατικά γαλακτώματα αυτών. Οι παράμετροι επιτάχυνσης της οξείδωσης ήταν η θέρμανση, το φως, χημικές αντιδράσεις ή η προσθήκη ιόντων σιδήρου. Η πορεία της οξείδωσης προσδιορίστηκε με την ποσοτικοποίηση των TBARs. Για τα γαλακτώματα με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση των φλαβονόλων τόσο αποτελεσματικότερα ήταν, ενώ το BHT εμφάνισε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ακολουθούμενο από την κερκετίνη. Στην περίπτωση του ιχθυελαίου η δράση της συνθετικής ένωσης ήταν ακόμα μεγαλύτερη ενώ η αποτελεσματικότητα των γλυκοζιτών ήταν παρόμοια με την α -τοκοφερόλη.

Στη συνέχεια ερεύνησαν και την επίδραση του τμήματος σακχάρου στο C-3 άκρο της κερκετίνης μελετώντας τη δράση των γλυκοζιτικών δομών (κερκετίνη-3-O-γλυκοσίδη, κερκετίνη-3-O-γαλακτοσίδη, κερκετίνη-3-O-ραμνοσίδη, κερκετίνη-3-O-ρουτινοσίδη) ως προς την οξείδωση των γαλακτωμάτων. Οι γλυκοζιτικές δομές είτε επέδειξαν χαμηλή αντιοξειδωτική δράση είτε δεν επηρέασαν καθόλου τα συστήματα.

Οι Mattia, et al., 2009 προσδιόρισαν τη δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων του γαλλικού οξέος, της κερκετίνης και της κατεχίνης σε συστήματα που περιείχαν ελαιόλαδο με την μέτρηση τόσο πρωτογενών (υδροϋπεροξειδία) όσο και δευτερογενών (TBARs) προϊόντων οξείδωσης. Η παραγόμενη ποσότητα των υδροϋπεροξειδίων στα γαλακτώματα έδειξε ότι το γαλλικό οξύ και η κατεχίνη δεν είναι ικανά να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν τον σχηματισμό αυτών των ενώσεων. Η κερκετίνη αντίθετα επέδειξε αντιοξειδωτική δράση. Το γαλλικό οξύ σε συγκεντρώσεις 350 και 500 μ M έδειξε την ίδια τάση με το control ως προς την παραγωγή των δευτερογενών προϊόντων σε αντίθεση με την μικρότερη συγκέντρωση (250 μ M) όπου έδειξε προ-οξειδωτική δράση. Η κατεχίνη επέδρασε θετικά στη μείωση αυτών των ενώσεων σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ η κερκετίνη δεν επηρέασε στην χαμηλότερη συγκέντρωση που προστέθηκε, όμως στη μεγαλύτερη έδρασε κατασταλτικά.

Παρόμοια διαδικασία ανάλυσης πραγματοποιήθηκε από την ίδια ομάδα (Mattia, et al., 2010) για γαλακτώματα ελαιολάδου με διαφορετικό pH. Τα, σχετικά με το γαλλικό οξύ και την κατεχίνη, αποτελέσματα σε αυτή την έρευνα έρχονται σε αντίθεση με αυτά της προηγούμενης έρευνας. Το γαλλικό οξύ, παρά το διαχωρισμό του στην υδατική φάση λόγω της πολικότητάς του, καθυστέρησε το σχηματισμό τόσο των υδροϋπεροξειδίων όσο και των TBARs και περιόρισε τη συσσώρευση τους. Η κατεχίνη δεν επηρέασε το σχηματισμό προϊόντων οξείδωσης, ενώ η κερκετίνη προκάλεσε το μικρότερο σχηματισμό και στα δύο είδη ενώσεων.

Οι Ruzic, et al., 2010 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση διάφορων φλαβονοειδών και την επίδραση που έχει η δομή αυτών στην ικανότητα αναστολής της οξείδωσης και στην μετατροπή των ελεύθερων ριζών σε λιγότερο δραστικά μόρια. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν γαλάκτωμα που περιείχε β -καροτένιο/λινελαϊκό οξύ, ενώ το ποσοστό της οξείδωσης προκύπτει από τον αποχρωματισμό του β -καροτένιου. Την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, με φθίνουσα σειρά, έχουν η καμπερόλη, η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η λουτεολίνη, μάλιστα οι δύο πρώτες ενώσεις εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα από το συνθετικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο BHT.

Οι Beker, et al., 2011 ανέλυσαν την επίδραση τριών διαφορετικών φλαβονοειδών με παρόμοια δομή (κερκετίνη, μορίνη και κατεχίνη), που έχουν τον ίδιο αριθμό -OH ανά μόριο, στην οξειδωση γαλακτωμάτων με λιπαρή φάση λινελαϊκού οξέος. Η έναρξη της οξειδωσης προκλήθηκε με προσθήκη ασκορβικού οξέος και ιόντων μετάλλων. Η ανασταλτική κατάταξη των φλαβονοειδών στην προστασία της υπεροξειδωσης λιπιδίων ήταν : μορίνη > κατεχίνη ≥ κερκετίνη, με την μορίνη να δείχνει αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις ενώ η κατεχίνη και η κερκετίνη έδειξαν τόσο αντιοξειδωτικές όσο και προ-οξειδωτικές επιδράσεις ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους.

Οι Zhu, et al., 2013 χρησιμοποίησαν για την έρευνα τους σχετικά με την δράση διάφορων φαινολών έλαιο καμέλιας. Ένα άλλο μέγεθος που διαφέρει αρκετά σε σχέση με άλλες μελέτες είναι η ποσότητα του ελαίου στο γαλάκτωμα που είναι 40% w/w, ποσότητα που είναι μεγαλύτερη από ότι συνήθως. Η ανίχνευση της ποσότητας των υδροϋπεροξειδίων και της εννεανάλης ήταν οι δείκτες που έδειξαν την πορεία της οξειδωτικής διαδικασίας. Η οξειδωτική σταθερότητα κατατάχθηκε με την ακόλουθη σειρά: γαλλικός προπυλεστέρας > κατεχίνη > γαλάκτωμα μάρτυρας > γαλλικό οξύ > κερκετίνη. Πιο συγκεκριμένα η κερκετίνη φαίνεται να εμφανίζει τις πρώτες δέκα μέρες αντιοξειδωτική δράση, η οποία κατά την εξέλιξη του πειράματος μετατρέπεται σε προ-οξειδωτική. Ενδιαφέρον είναι ότι κατά την προσθήκη της κερκετίνης σε χύμα έλαιο καμέλιας εμφανίζεται μόνο αντιοξειδωτική δράση.

Ο στόχος των Nogala-Kalucka, et al., 2013 ήταν ο προσδιορισμός της συνέργειας ή του ανταγωνισμού της κερκετίνης, της ρουτίνης και επιλεγμένων τοκοτριενολών ως προς την προστασία γαλακτωμάτων λινελαϊκού οξέος από την οξειδωση. Η τελική συγκέντρωση των προστιθέμενων αντιοξειδωτικών στα συστήματα ήταν 1-200 μM και οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν τα υδροϋπεροξειδία και η εννεανάλη. Με την αύξηση της συγκέντρωσης της κερκετίνης παρατηρείται μείωση των παραγόμενων υδροϋπεροξειδίων, ενώ η ρουτίνη σε όλες τις συγκεντρώσεις έχει παρεμφερή αποτελέσματα εκτός από τη συγκέντρωση 1 μM όπου εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση. Η κερκετίνη βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματική από την ρουτίνη για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 μM . Οι τοκοτριενόλες ήταν πιο αποτελεσματικές από τις φλαβόνες μόνο στην περίπτωση που η συγκέντρωση ήταν 1 μM . Η χρήση από κοινού κερκετίνης και γ -τοκοτριενόλης επέφεραν τα καλύτερα αποτελέσματα, σε αντίθεση με το συνδυασμό της κερκετίνης με τις άλλες δύο τοκοτριενόλες που δεν εντοπίστηκε συνεργιστική δράση.

Οι Espinosa, et al., 2015 μελέτησαν τη δράση φαινολικών ενώσεων σε γαλακτώματα παρασκευασμένα με έλαιο από το φυτό έχιο. Ένδειξη της οξειδωσης στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο αριθμός υδροϋπεροξειδίων και τα TBARS. Οι δύο διαφορετικές αναλύσεις έδειξαν ότι η κερκετίνη δρα προστατευτικά έναντι της οξειδωσης και στην περίπτωση αυτού του γαλακτώματος.

Η δράση της κερκετίνης στην οξειδωση των λιπαρών υλών είναι πιθανό να διαφέρει και να επηρεάζεται από πολλά χαρακτηριστικά. Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η συμπεριφορά της ουσίας είναι η μορφή του συστήματος (χύμα λιπαρή ουσία-γαλάκτωμα), το είδος της λιπαρής ύλης, το pH, η συγκέντρωση της ουσίας, ενώ διαφορετικά αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν και ανάλογα με την μέτρηση που πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό της πορείας της οξειδωσης.

Από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η κερκετίνη μπορεί να δράσει είτε αντιοξειδωτικά είτε προ-οξειδωτικά όταν προστεθεί σε κάποια λιπαρή φάση. Σε όσες περιπτώσεις μελετήθηκε η δράση της φλαβονόλης σε χύμα λιπαρή φάση αποδείχτηκε ότι υπάρχει αντιοξειδωτική δράση (Chenet al., 1996; Kahkonen & Heinonen, 2003; Zhu, et al., 2013), ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις γαλακτωμάτων υπήρξε προ-οξειδωτική δράση.

Τα γαλακτώματα στα οποία εμφανίστηκε προ-οξειδωτική ή καμία δράση της μελετώμενης ένωσης διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους. Για παράδειγμα η λιπαρή φάση, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, είναι διαφορετική. Τα είδη λιπαρών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν ηλιέλαιο χωρίς τοκοφερόλες, κραμβέλαιο, λινελαϊκό οξύ, λινολενικό οξύ και ραφινάρισμένο έλαιο καμέλιας. Η επίδραση του συγκεκριμένου παράγοντα στη δράση της κερκετίνης έγινε φανερή από τους Nogala-Kalucka, et al., 2013 με τη μελέτη που πραγματοποίησαν να δείχνει ότι η κερκετίνη κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτούργησε προστατευτικά για το λινολενικό οξύ σε αντίθεση με το λινελαϊκό οξύ όπου η προσθήκη της ένωσης δεν επηρέασε με κάποιο τρόπο.

Τα περισσότερα γαλακτώματα που μελετώνται είναι παρασκευασμένα με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε το pH του συστήματος να είναι σταθερό και οι τιμές που λαμβάνει, συνήθως, είναι ανάμεσα στο 5,5 και 7,4. Παρόλα αυτά μελέτες που έχουν γίνει σε γαλακτώματα στα οποία όλα τα χαρακτηριστικά είναι κοινά, εξαιρουμένου του pH, έχει προκύψει ότι το περιβάλλον επιδρά στη συμπεριφορά της κερκετίνης. Σύμφωνα με τους Osborn & Akoh, 2003 η ένωση αυτή δρα προ-οξειδωτικά σε pH=3. Επομένως είναι απαραίτητη η ρύθμιση του pH σε μεγαλύτερες τιμές όταν χρησιμοποιείται αυτή η ένωση ως αντιοξειδωτικό.

Σημαντικά φαίνεται να επιδρά και η συγκέντρωση της προστιθέμενης ένωσης μέσα στα συστήματα. Υπάρχουν έρευνες που έδειξαν ότι η προσθήκη κερκετίνης σε συγκέντρωση 1μM οδήγησε σε προ-οξειδωτική δράση (Nogala-Kalucka, et al., 2007) (Beker, et al., 2011), ενώ η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας σε παρόμοια συστήματα φάνέρωσε αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, διαφορετικά αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η πορεία της οξείδωσης. Σύμφωνα με τους Gulcin, et al., 2002 η κερκετίνη εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση, ενώ σύμφωνα με τους Beker, et al., 2011 εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση. Η διαφορά μεταξύ των δύο μελετών έγκειται στη διαφορετική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της πορείας της οξείδωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι, επίσης, η έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Mattia, et al., 2009 στην οποία φαίνονται ορισμένες ενώσεις να μην επηρεάζουν την παραγωγή πρωτογενών προϊόντων, ωστόσο περιορίζουν την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων. Επομένως είναι σημαντικό να πραγματοποιούνται αναλύσεις διαφορετικών στοιχείων που υποδεικνύουν την πορεία της οξειδωτικής διαδικασίας και τα συμπεράσματα που εξαγονται να μην προκύπτουν μόνο από έναν παράγοντα.

4.7.2 Επίδραση του ροσμαρινικού οξέος στην οξείδωση γαλακτωμάτων

Η δράση το ροσμαρινικού οξέος έναντι της οξείδωσης των γαλακτωμάτων έχει εξεταστεί από αρκετούς ερευνητές. Η ένωση αυτή ανάλογα με τη συγκέντρωση της και το περιβάλλον

στο οποίο βρίσκεται μπορεί να δράσει είτε αντιοξειδωτικά είτε προ-οξειδωτικά. Παρακάτω ακολουθεί εκτενής παρουσίαση των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί για να προσδιορίσουν τη δράση αυτής της ουσίας.

Πίνακας 4.4 Μελέτες σχετικές με την επίδραση του ροσμαρινικού οξέος σε γαλακτώματα

Συγκέντρωση	Λιπαρή φάση	Γαλακτωματοποιητής	pH	Θερμοκρασία	Μετρούμενη μονάδα/ μέθοδος ανάλυσης	Σημειώσεις	Βιβλιογραφία
30-50 ppm	Καλαμποκέλαιο (10%)	Tween 20 (1%)	4-7	60 °C	PV, Hexanal	Αντιοξειδωτική δράση	(Frankel, et al., 1996)
150 μM	Καλαμποκέλαιο (3%)	Triton X-100 (0,3%)		60 °C	Rancimat method	Αντιοξειδωτική δράση	(Chen & Ho, 1997)
a	Λινελαϊκό οξύ (170 μM)	Tween 20 (244 μM)	6,4	30 °C	CD	Επαγόμενη οξείδωση από σίδηρο/ασκορβικό οξύ/ Ασθενή αντιοξειδωτική δράση	(Cuvelier, et al., 2000)
a	Λινελαϊκό οξύ	-	7	40 °C	PV	Αντιοξειδωτική δράση	(Erkan, et al., 2008)
50 μM	Καλαμποκέλαιο (5%)	Brij 35 (0,5%)	7	37 °C	PV, hexanal	Αντιοξειδωτική δράση	(Alamed, et al., 2009)
a	Λινελαϊκό οξύ/β-καροτίνη	Tween 20	Οξυγονω-μένο απεσταγμένο νερό	50 °C	β-Carotene Bleaching Method	Αντιοξειδωτική δράση	(Terpinc & Abramovic, 2010)
30 μM	Ραφιναρισμένο σογιέλαιο (1%)	Tween 20 (0,1%)	7	25 °C	PV,hexanal	Αντιοξειδωτική δράση	(Panya, et al., 2012)

^a Δεν αναγράφεται η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος

^β Όλες οι περιεκτικότητες είναι % w/w

Η καλύτερη αντιοξειδωτική δράση του ροσμαρινικού οξέος σύμφωνα με τους Frankel, et al., 1996 στο χύμα καλαμποκέλαιο ως προς το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων εμφανίζεται για συγκέντρωση 50 ppm. Σε συγκέντρωση 30 ppm το ροσμαρινικό έχει μικρότερη δράση. Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από την παραγωγή εξανάλης. Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων τα αποτελέσματα φαίνεται να διαφοροποιούνται καθώς στη συγκέντρωση των 30 ppm εμφανίζεται μικρής κλίμακας αντιοξειδωτική δράση ενώ για την περίπτωση των 50 ppm παρατηρείται προ-οξειδωτική δράση. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε και για τους δύο δείκτες που μελετήθηκαν. Το pH δεν επηρέασε τη δράση.

Από τους Chen & Ho, 1997 πραγματοποιήθηκε η προσθήκη πολυφαινολών σε στερεό λίπος προερχόμενο από χοίρο και σε καλαμποκέλαιο. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν το καφεϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ, η α-τοκοφερόλη και το συνθετικό BHT. Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων αυτών διαφοροποιήθηκε ανάμεσα στις δύο λιπαρές φάσεις. Στην περίπτωση του στερεού λίπους η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων φαίνεται να είναι με φθίνουσα σειρά καφεϊκό οξύ ≈ α-τοκοφερόλη, ροσμαρινικό οξύ, χλωρογενικό οξύ και έπονται με πολύ χειρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα το BHT και το φερουλικό οξύ. Όσον αφορά το χύμα καλαμποκέλαιο την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφανίζει το ροσμαρινικό οξύ και ακολουθούν το καφεϊκό οξύ ≈ χλωρογενικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, το BHT και τέλος με την χειρότερη αντιοξειδωτική

δράση παρουσιάζεται ξανά το φερουλικό οξύ. Τέλος στην περίπτωση των γαλακτωμάτων υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις με την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση να εμφανίζει το BHT και έπονται το καφεϊκό, το ροσμαρινικό, το φερουλικό, το χλωρογενικό οξύ και τέλος η α -τοκοφερόλη. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υδρόφιλες ενώσεις έχουν καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στο χύμα λάδι, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τα γαλακτώματα στα οποία φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικές οι υδρόφοβες ενώσεις.

Ο δείκτης οξείδωσης που αναλύθηκε από τους Cuvelier, et al., 2000 ώστε να πραγματοποιηθεί η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των πρόσθετων ενώσεων σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση λινελαϊκό οξύ ήταν τα συζυγή διένια. Η έναρξη της οξείδωσης προκλήθηκε με προσθήκη σιδήρου και ασκορβικού οξέος (σε μικρή ποσότητα ώστε να μη δράσει ως αντιοξειδωτικό). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα αντιοξειδωτικά που προστέθηκαν δεν μπορούν να αποτρέψουν τον αρχικό σχηματισμό διενίων, εντούτοις δεν συμβαίνει το ίδιο με τα διένια που σχηματίζονται κατά το στάδιο της διάδοσης. Ενώ η ανάσχεση της δημιουργίας αυτών των προϊόντων έδειξε ότι εξαρτάται περισσότερο από την πολικότητα των αντιοξειδωτικών παρά από την δομή τους (αριθμός υδροξυλομάδων ή περιοχές χηλικοποίησης), έτσι καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφάνισε η α -τοκοφερόλη, το BHT, το BHA και η ισοευγενόλη, ενώ το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ εμφάνισαν ασθενή αντιοξειδωτική δράση.

Οι Erkan, et al., 2008 πραγματοποίησαν μελέτη τα αντιοξειδωτικής δράσης των πρότυπων ενώσεων σισαμόλης (sesamol), ροσμαρινικού οξέος και κερνοσικού οξέος σε γαλάκτωμα με λιπαρή φάση το λινελαϊκό οξύ. Σε αυτή τη περίπτωση το ροσμαρινικό εμφανίζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση ενώ την χειρότερη παρουσιάζει η σισαμόλη.

Οι Alamed, et al., 2009 πραγματοποίησαν ανάλυση της συμπεριφοράς διάφορων ενώσεων σε γαλακτώματα καλαμποκέλαιου. Για το σκοπό αυτό έγινε μέτρηση των αριθμών υπεροξειδίων και της παραγόμενης εξανάλης. Οι ενώσεις γαλλικός προπυλεστεράς, γαλλικό οξύ και φερουλικό οξύ στη συγκέντρωση 50 μ M εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση. Ενώ οι ενώσεις TBHQ και ροσμαρινικό οξύ, στην ίδια συγκέντρωση, εμφανίζουν αναστολή της ανάπτυξης τόσο των υδροϋπεροξειδίων όσο και της εξανάλης.

Οι Terpinic & Abramovic, 2010 χρησιμοποίησαν ένα υδατικό γαλάκτωμα λινελαϊκού οξέος και β -καροτένιου ώστε να εκτιμήσουν την αντιοξειδωτική δράση διάφορων ενώσεων. Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι το πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό είναι το φερουλικό οξύ και ακολουθούν το ροσμαρινικό, το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ.

Από τους Panja, et al., 2012 πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης τόσο του ροσμαρινικού οξέος και εστέρων του όσο και της α -τοκοφερόλης. Η δημιουργία και των πρωτογενών και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης έδειξε ότι αυτές οι ενώσεις σε συγκέντρωση 30 μ M εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Η αποτελεσματικότητα των εστέρων του ροσμαρινικού οξέος ακολουθεί την παρακάτω σειρά $R4 > R12 > R0 > R20$. Επιπλέον, η ταυτόχρονη προσθήκη όλων των παραπάνω ενώσεων με την α -τοκοφερόλη έδειξε συνεργιστική δράση.

Οι έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με τη χρήση του ροσμαρινικού οξέος ως αντιοξειδωτικό σε συστήματα τροφίμων δεν έχουν οδηγήσει σε σαφή αποτελέσματα. Είναι πιθανό ανάλογα με το είδος της λιπαρής ύλης και τη μορφή με την οποία αυτή είναι στο σύστημα η ένωση αυτή να δράσει είτε ως ισχυρό είτε ως ασθενές αντιοξειδωτικό. Ένα ζωτικής σημασίας χαρακτηριστικό του ροσμαρινικού οξέος είναι ότι πάνω από ορισμένες συγκεντρώσεις μπορεί να εμφανίσει προ-οξειδωτική δράση, υποβαθμίζοντας με αυτό τον τρόπο την ποιότητα του προϊόντος. Παρόλα αυτά και η χρήση μικρής συγκέντρωσης σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως υποδεικνύουν οι Frankel, et al., 1996, μπορεί να οδηγήσει σε χειρότερα αποτελέσματα από ότι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Για αυτό το λόγο πριν τη χρησιμοποίηση αυτής της ένωσης σε βιομηχανική κλίμακα απαιτείται η μελέτη της δράσης της στο συγκεκριμένο σύστημα και η επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης που θα προστεθεί.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παραγωγή γαλακτωμάτων με φυσικά αντιοξειδωτικά που είναι πιθανόν να έχουν ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης των φυσικών αντιοξειδωτικών στην προστασία των γαλακτωμάτων από την οξείδωση. Τα γαλακτώματα προσομοιάζουν διάφορα τρόφιμα, όπως σάλτσες για σαλάτα, αλειφόμενα προϊόντα, μαγιονέζα, κ.ά., ενώ μπορούν σε μικρές ποσότητες να προστεθούν σε τρόφιμα, όπως χυμούς λαχανικών. Ως φυσικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από το αρωματικό φυτό *Satureja Thymbra* (θρούμπι) καθώς και οι πρότυπες ενώσεις κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ. Η επιλογή των δύο πρότυπων ενώσεων στηρίχθηκε στο γεγονός ότι αποτελούν αντιπροσωπευτικά συστατικά των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων, αντίστοιχα, του αρωματικού φυτού, και στην καλή δράση τους στη δέσμευση ελευθέρων ριζών και στην προστασία ελαίων από την οξείδωση. Για να εξετασθεί η επίδραση της πολικότητας των φαινολικών συστατικών στη διατηρησιμότητα τους και στην οξείδωση του γαλακτώματος παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα με οξικό αιθυλεστέρα, που περιέχει κυρίως τα άπολα φλαβονοειδή συστατικά (όπως κερκετίνη και παρόμοιες ενώσεις), και με αιθανόλη, που περιέχει πιο πολικά συστατικά (ροσμαρινικό οξύ και γλυκοζίτες των φλαβονοειδών).

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν πέντε σειρές δειγμάτων, δείγματα control (Control-c), δείγματα με κερκετίνη (Quercetin-q), δείγματα με ροσμαρινικό οξύ (Rosmarinic acid), δείγματα με αιθανολικό εκχύλισμα (Es) και με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EACs) από θρούμπι σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (5, 25, 40 °C).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στα δύο οργανικά εκχυλίσματα του αρωματικού φυτού. Συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των κύριων κορυφών με HPLC-DAD, ώστε να προσδιορισθούν τα φαινολικά συστατικά τους, μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών, και μέτρηση του περιεχομένου των ολικών φαινολών. Με βάση τη μέτρηση των ολικών φαινολών, προσδιορίσθηκε η κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος που πρέπει να προστεθεί στα γαλακτώματα για να υπάρχει συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών. Το επίπεδο προσθήκης τόσο των εκχυλισμάτων όσο και των πρότυπων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 500 ppm ολικών φαινολών ή πρότυπων ενώσεων επί της λιπαρής φάσης των γαλακτωμάτων. Ως λιπαρή φάση χρησιμοποιήθηκε ηλιέλαιο, έλαιο που χρησιμοποιείται ευρέως από τις βιομηχανίες τροφίμων για την παρασκευή μαγιονέζας και dressing για σαλάτες, ενώ ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε ο Tween 20.

Τα γαλακτώματα συσκευάστηκαν σε αδιαφανές πολυστρωματικό υλικό συσκευασίας και αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας των 5, 25 και 40 °C. Η επιλογή των τριών θερμοκρασιών αντιπροσωπεύει τη διατήρηση σε ψυγείο, στο περιβάλλον, και σε επιταχυνόμενες συνθήκες οξείδωσης. Επομένως θα επιτρέψει τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τη διατηρησιμότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών και την ικανότητά τους να προστατεύουν το γαλάκτωμα στις διαφορετικές συνθήκες, καθώς και για την επίδραση της θερμοκρασίας στην οξείδωση και την ανάσχεσή της.

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός τόσο των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (αριθμός υπεροξειδίων, P.V.), ώστε να μελετηθεί η επίδραση των προσθέτων στα αρχικά στάδια της οξείδωσης όσο και των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης (πτητικά), που αποτελούν τους κυρίως αντιληπτούς παράγοντες ταγγισμού. Ως πρόσθετος δείκτης της πορείας της οξείδωσης μετριόταν η κατανάλωση του οξυγόνου στη συσκευασία. Επιπλέον, μελετήθηκε η διατηρησιμότητα των βιοδραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων με χρήση υγρής χρωματογραφίας και τις μεθόδους Folin-Ciocalteu και των πρότυπων ουσιών φωτομετρικά.

5.2 Πρώτες ύλες-Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ηλιέλαιο (SOL, Ελαΐς, Αθήνα) Tween 20 (Fisher Scientific, Loughborough, UK), νερό, φωσφορικά άλατα Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) και NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) και αζίδιο του νατρίου (99%, Acros Organics, New Jersey, USA).

Οι ουσίες που προστέθηκαν ως αντιοξειδωτικά ήταν η κερκετίνη (Quercetin hydrate 95%, Acros Organics, New Jersey, USA), το ροσμαρινικό οξύ (98%, Sigma Aldrich, St.Louis, USA), το αιθανολικό εκχύλισμα (Es) και το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EAcS) του φυτού *Satureja thymbra* (θρούμπι) το οποίο παραλήφθηκε από τον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό Δήμητρα (ΕΛΓΟ).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των δειγμάτων ήταν τα εξής: ήλιο (Air Liquide, Houston, USA), θειοθειϊκό νάτριο (0.1N, for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), διαλυτό άμυλο (Panreac, Barcelona, Spain), οξικό οξύ (for analysis, Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), χλωροφόρμιο (analytical reagent grade, Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom), ιωδιούχο κάλιο (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil Cedex, France), αντιδραστήριο Follin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany), αντιδραστήριο DPPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), ανθρακικό νάτριο (Mallinckrodt, St. Louis, Missouri), ακετονιτρίλιο (ACN), μεθανόλη, βουτανόλη, νερό (HPLC and MS grade) (Fisher Scientific, Loughborough, UK), τριφθοροοξικού οξύ (Fisher Scientific, Loughborough, UK), αιθανόλη 96° και ακετόνη (Fisher Scientific, Loughborough, United Kingdom).

5.3 Συσκευές

Για την παραλαβή του εκχυλίσματος από το φυτό θρούμπι χρησιμοποιήθηκε αποστακτήρας πιλοτικής κλίμακας ανοιχτού κυκλώματος, κατασκευασμένος από χαλκό. Τα φυτικά υπολείμματα ξηράνθηκαν σε φούρνο (Function Line UT20, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany), αφού προηγουμένως αλέσθηκαν από μύλο (Retch ZM 1; Haan, Germany). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των εκχυλισμάτων με τη χρήση συσκευής Soxhlet.

Η απομάκρυνση των διαλυτών τόσο από τα εκχυλίσματα του φυτού *Satureja thymbra* όσο και των διαλυτοποιημένων πρότυπων ενώσεων έγινε με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστή κενού Büchi Re 111 με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi 461 (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Switzerland).

Η προγαλακτωματοποίηση πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας CAT Unidrive 1000d, Paso Robles, California στις 5000 στροφές για 15 min. Στη συνέχεια τα

προγαλακτώματα αυτά μεταφέρθηκαν σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης (APV SYSTEMS Albertslund, Denmark) δύο σταδίων (1^ο στάδιο: 20 bar, 2^ο στάδιο: 400 bar).

Τα γαλακτώματα αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας 5, 25 και 40 °C, ενώ μετά την δειγματοληψία τους οδηγήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη.

Η ανάλυση των πτητικών αερίων πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο Agilent HP 6890 με συζευγμένο φασματογράφο μάζας (GC-MS) Agilent HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, California). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια Agilent HP-5, διαστάσεων 30 m x 320 μm x 0,25 μm (Hewlett Packard, Palo Alto, California).

Η μέτρηση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα εντός της συσκευασίας των γαλακτωμάτων έγινε με τη συσκευή Gas-analyser CheckMate 9900 O₂/CO₂ PBI Dansensor (Ringsted, Denmark).

Η διάσπαση του γαλακτώματος ώστε να γίνει μελέτη της υδατικής και της λιπαρής φάσης έγινε με τη χρήση υδατόλουτρου και φυγόκεντρου Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge.

Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στα γαλακτώματα προσδιορίστηκε τόσο φωτομετρικά με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC-DAD. Η συσκευή HPLC (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) ήταν εξοπλισμένη με αντλία βαθμωτής έκλουσης (HP1100) και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD), καθώς και λογισμικό καταγραφής των δεδομένων Chemstation 7. Ενώ η στήλη που χρησιμοποιείται είναι Hypersil C18 (ODS 5 μm, 250 x 4.6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany).

5.4 Πειραματικές τεχνικές

5.4.1 Διαλυτοποίηση ενώσεων και απομάκρυνση διαλυτών

Η κερκετίνη, η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό, διαλυτοποιήθηκε σε ακετόνη (2.8 mg/mL). Το ροσμαρινικό οξύ, διαλυτοποιήθηκε σε αιθανόλη (2.5mg/mL). Τόσο στις πρότυπες ενώσεις, όσο και στα εκχυλίσματα οι διαλύτες έπρεπε να απομακρυνθούν πριν την παρασκευή των γαλακτωμάτων. Έτσι, αφού προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα λαδιού ώστε η συγκέντρωση του λαδιού να είναι 30% w/w στο γαλάκτωμα και η απαραίτητη ποσότητα των ουσιών ώστε να υπάρχουν 500 mg ολικών φαινολών/kg λιπαρής φάσης, πραγματοποιήθηκε πλήρης ανάμιξη και απομάκρυνση των διαλυτών με περιστροφικό εξατμιστή κενού Büchi Re 111 με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi 461 (Büchi Laboratoriums Technik AG).

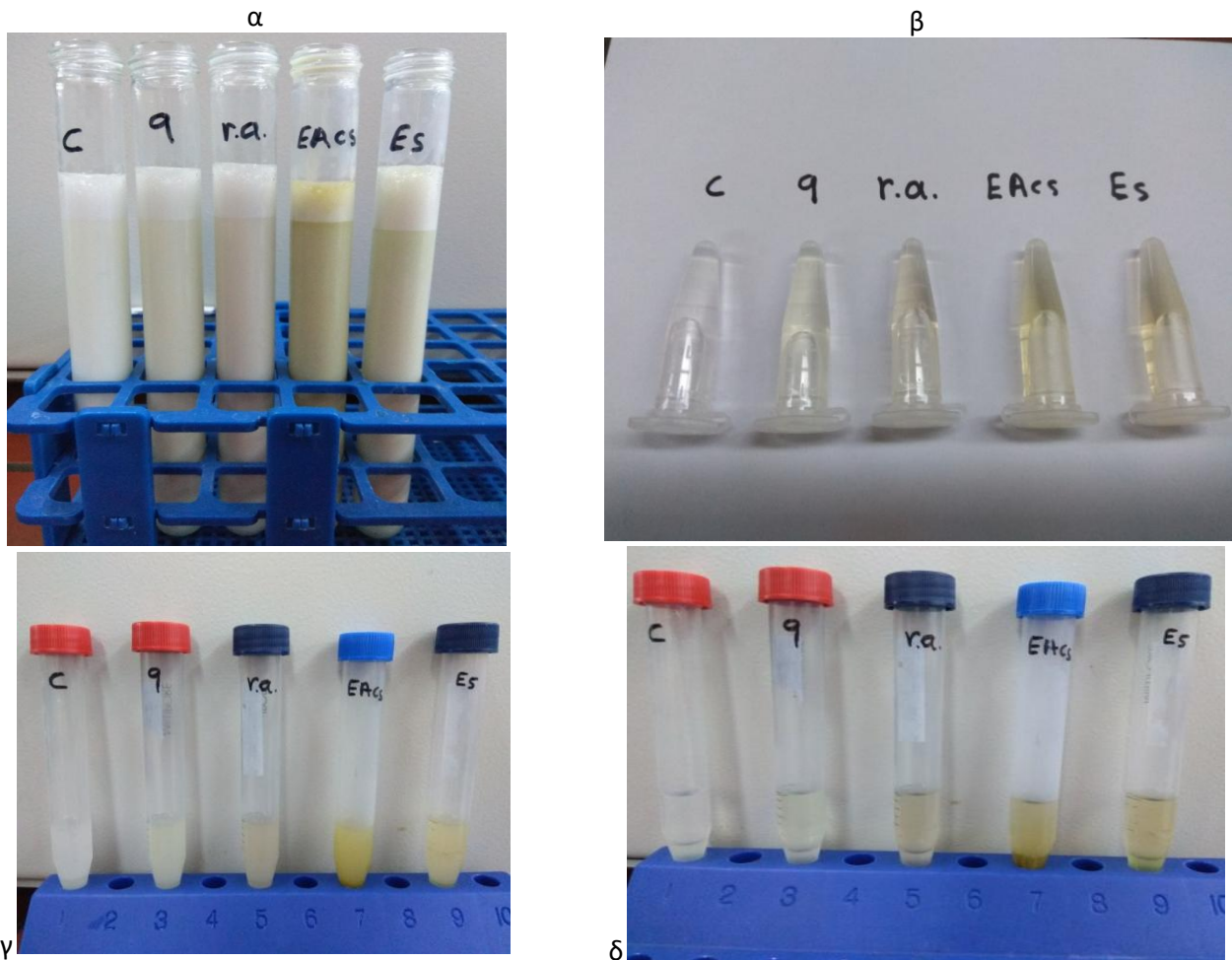
5.4.2 Παρασκευή γαλακτωμάτων και αποθήκευση

Η παρασκευή των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Αφού έγινε η ενσωμάτωση των πρότυπων ενώσεων και των εκχυλισμάτων στην λιπαρή φάση, παρασκευάστηκε και η υδατική φάση. Η υδατική φάση ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων έτσι ώστε το pH να ρυθμιστεί στην τιμή 6.8. Για αυτό το σκοπό προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα των αλάτων Na₂HPO₄ και NaH₂PO₄. Επιπλέον στο διάλυμα προστέθηκε αζίδιο του νατρίου ως αντιμικροβιακό σε συγκέντρωση 0,01% w/v και Tween 20 ως γαλακτωματοποιητής σε συγκέντρωση 2% w/w ως προς το γαλάκτωμα. Μετά την παρασκευή της λιπαρής και της υδατικής φάσης έγινε ομογενοποίηση αυτών με χρήση

ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, για 10 min σε 8000 rpm, για τη δημιουργία προ-γαλακτώματος. Ακολούθως το προ-γαλάκτωμα οδηγήθηκε σε ομογενοποιητή υψηλής πίεσης δύο σταδίων (1ο στάδιο: 20 bar, 2^ο στάδιο: 400 bar) όπου και παρασκευάστηκε το γαλάκτωμα στην τελική του μορφή. Τα γαλακτώματα συσκευάστηκαν σε πολυστρωματικές συσκευασίες ίδιου μεγέθους, όπου κάθε συσκευασία περιείχε 20 mL γαλακτώματος και 45 mL υπερκείμενο ατμοσφαιρικό αέρα. Τα γαλακτώματα με τις ενσωματωμένες ουσίες ή τα εκχυλίσματα, καθώς και ένα γαλάκτωμα που δεν περιέχει κάποια ουσία ως αντιοξειδωτικό πρόσθετο, αποθηκεύτηκαν σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας των 5 °C, 25 °C και 40 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα αφαιρούντο 2 δείγματα από κάθε διαφορετική σειρά στα οποία πραγματοποιούνται οι ακόλουθες μετρήσεις: περιεκτικότητα οξυγόνου και πτητικά συστατικά μέσα στη συσκευασία, πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης στο έλαιο μετά τη διάσπαση του γαλακτώματος με την μέτρηση των υδροϋπεροξειδίων και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δραστικών ενώσεων που περιέχονταν στα γαλακτώματα με τη μέτρηση των ολικών φαινολών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Follin-Ciocalteu και των δραστικών ενώσεων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τα γαλακτώματα στα οποία είχαν προστεθεί τα εκχυλίσματα και με τη μέτρηση των δραστικών ενώσεων με τη χρήση φωτομέτρου στην περίπτωση των γαλακτωμάτων στα οποία είχαν προστεθεί οι πρότυπες ενώσεις. Η διάσπαση του γαλακτώματος έγινε όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.4.3

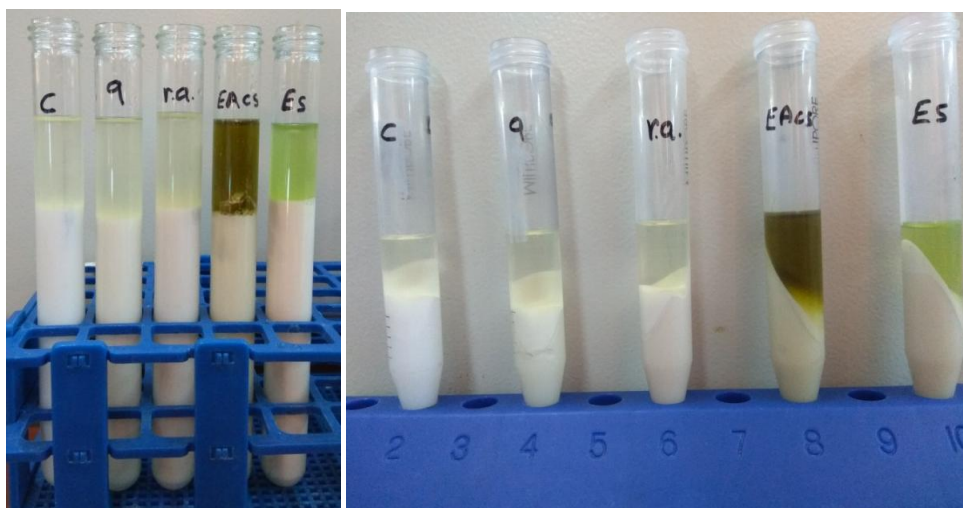
5.4.3 Διάσπαση γαλακτωμάτων, παραλαβή υδατικής και λιπαρής φάσης

Με την τοποθέτηση στην κατάψυξη το γαλάκτωμα διασπάται τουλάχιστον μερικώς. Για την λήψη της υδατικής φάσης των γαλακτωμάτων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Τα γαλακτώματα, που βρίσκονταν σε κατάψυξη, αφέθηκαν αρχικά να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως, έγινε ομογενοποίηση των γαλακτωμάτων, με τη χρήση vortex, ώστε να εξασφαλισθεί η ομοιογένεια τους (εικόνα 5.1-α). Από το ομογενοποιημένο δείγμα ελήφθησαν 3 mL και σε αυτό, ακολούθως, προστέθηκαν 3 mL ACN. Το προκύπτον μίγμα ομογενοποιήθηκε με τη χρήση vortex τους (εικόνα 5.1-γ) και έπειτα οδηγήθηκε σε φυγόκεντρο (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge) προκειμένου να παραλειφθεί η υδατική φάση. Η φυγοκέντρωση διαρκούσε 5 min και η ταχύτητα είναι 8000 rpm. Μετά από αυτή τη διαδικασία είχε πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του γαλακτώματος ο οποίος περιλαμβάνει δύο φάσεις (εικόνα 5.1-δ), την λιπαρή και την υδατική (εικόνα 5.1-β) που επιθυμούμε για περαιτέρω αναλύσεις και στην οποία βρίσκεται και το οργανικό ACN. Για λόγους ευκολίας από εδώ και στο εξής αυτό το διάλυμα θα ονομάζεται υδατική φάση.



Εικόνα 5.1 Παραλαβή υδατικής φάσης γαλακτώματος

Το γαλάκτωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε, τοποθετήθηκε εκ νέου στην κατάψυξη ώστε να πραγματοποιηθεί ένας κύκλος ψύξεως-θέρμανσης. Αφού παρέμεινε το δείγμα τουλάχιστον 24 ώρες στην κατάψυξη, ακολούθωσε η τοποθέτηση του σε υδατόλουτρο των 40 °C για 20 min. Στο γαλάκτωμα, εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge) για 10 min σε 8000 rpm. Από το προκύπτον παραλήφθηκε η λιπαρή φάση για περαιτέρω αναλύσεις.



Εικόνα 5.2 Παραλαβή λιπαρής φάσης από τα γαλακτώματα, στην εικόνα αριστερά είναι τα γαλακτώματα πριν την φυγοκέντρηση και στη δεξιά εικόνα είναι τα γαλακτώματα μετά την φυγοκέντρηση

5.4.4 Παρασκευή διαλυμάτων για τις αναλυτικές μεθόδους

Διαλύματα χρειάστηκαν για τρεις αναλυτικές μεθόδους, για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων, για τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Για τον προσδιορισμό αριθμού υπεροξειδίων:

Η δημιουργία του διαλύματος αμύλου έγινε με την διάλυση 1 g σκόνης αμύλου σε 100 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε συνδυασμό με παροχή θερμότητας έως ότου γίνει διαυγές.

Η δημιουργία του δείκτη KI έγινε με τον παρακάτω τρόπο: μέσα σε δοχείο με απιονισμένο νερό διαλύθηκε στερεό KI μέχρις ότου το διάλυμα γίνει υπέρκορο.

Για τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης:

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε χρησιμοποιεί ως διαλύτες μεθανόλη, νερό, ακετονιτρίλιο και βουτανόλη. Σε όλους τους διαλύτες, εκτός από τη βουτανόλη, προστέθηκε ποσότητα τριφθοροξικού οξέος (trifluoroacetic acid, TFA) έτσι ώστε στον τελικό όγκο η συγκέντρωση του να είναι 0,2% v/v.

Για την μέθοδο του Folin-Ciocalteu:

Παρασκευάστηκε κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 . Για το σκοπό αυτό προστέθηκαν 200 g άνυδρου Na_2CO_3 σε 800 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού υπό ανάδευση και εν συνεχεία αφέθηκε να ψυχθεί. Προστέθηκαν μερικοί κρύσταλλοι Na_2CO_3 και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 24 h. Ακολούθησε διήθηση με ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L η οποία συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

5.4.5 Παρασκευή εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra*

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε υδροατμοαπόσταξη για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου. Η αποσμημένη φυτόμαζα ξηράνθηκε (Function Line UT20, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany) στους 35 °C για 24h και κονιοποιήθηκε (Retch ZM 1; Haan, Germany), ώστε να περνά από κόσκινο διαμέτρου 0.5 mm. Η κονιοποιημένη φυτόμαζα υποβλήθηκε σε εξαντλητική εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet αρχικά με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (6h) για την παραλαβή των άπολων συστατικών των εκχυλισμάτων και στην συνέχεια με αιθανόλη (6h) για την παραλαβή των πιο πολικών συστατικών. 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 αποθηκεύτηκαν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

5.5 Ενόργανες και αναλυτικές μέθοδοι

5.5.1 Μέτρηση πτητικών αλδευδών

Τα δευτερογενή πτητικά προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών στα γαλακτώματα απομονώθηκαν με την τεχνική της μικροεκχύλισης σε στερεή φάση από τον υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME, headspace solid phase microextraction) και μετρήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (Agilent HP 6890) συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (Agilent HP 5973, Hewlett Packard, Palo Alto, California). Η συσκευή SPME αποτελείται από μια τριχοειδή ίνα τύπου πυριτίου (fused silica fiber). Η ίνα επικαλύπτεται στην εξωτερική της επιφάνεια από μία στατική φάση, η οποία συνδέεται σε ένα ατσάλινο έμβολο και συγκρατείται από μια συσκευή (holder), που μοιάζει με μικροσύριγγα. Πριν από κάθε δειγματοληψία η ίνα τοποθετείται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου και πραγματοποιείται καθαρισμός της από τυχόν ακαθαρσίες.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, η ίνα εισάγεται στη συσκευασία που έχει προθερμανθεί στους 45 °C, και εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος για 30 min στην ίδια θερμοκρασία. Κατόπιν, η ίνα εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου, όπου εκροφώνται οι ουσίες από τη στατική φάση. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια Agilent HP-5, διαστάσεων 30 m x 320 μm x 0,25 μm (Hewlett Packard, Palo Alto, California). Οι συνθήκες ανάλυσης ήταν οι ακόλουθες: Η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται από τους 50 °C μέχρι τους 100 °C με ρυθμό 10 °C/min και έπειτα μέχρι τους 220 °C με ρυθμό 15 °C/min, όπου και διατηρείται για 7 min. Το φέρον αέριο είναι 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 τη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους

με πρότυπα φάσματα μαζών (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg; Wiley, New York).

5.5.2 Μέτρηση οξυγόνου υπερκείμενης ατμόσφαιρας

Η μέτρηση του οξυγόνου του υπερκείμενου χώρου των γαλακτωμάτων έγινε με τη συσκευή Gas-analyser CheckMate 9900 O₂/CO₂ PBI Dansensor (Ringsted, Denmark), σε θερμοκρασία 45 °C. Όταν το γαλάκτωμα έφτασε σε αυτή τη θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της βελόνας της συσκευής στη συσκευασία και έγινε καταγραφή της συγκέντρωσης του οξυγόνου %v/v.

5.5.5 Μέθοδος μέτρησης αριθμού υπεροξειδίων (P.V)

Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων γίνεται σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο της IUPAC, 2.501 (IUPAC, 1987). 1 g λιπαρής ύλης ζυγίζεται σε κωνική φιάλη των 100 mL και γίνεται καταγραφή της ακριβούς μάζας σε ζυγό τεσσάρων δεκαδικών. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 20 mL διαλύματος οξικού οξέος-χλωροφορμίου αναλογίας 3:2 v/v και 500 μL κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Ακολουθεί ανάδευση για 1 min και έπειτα προστίθενται 20 mL απιονισμένου νερού και 500 μL διαλύματος αμύλου (1% w/v). Το επόμενο βήμα είναι η τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου 0,01 N και η καταγραφή του απαιτούμενου όγκου του διαλύματος. Παράλληλα γίνεται τιτλοδότηση και σε ένα τυφλό δείγμα έτσι ώστε να ελεγχθεί τυχόν ανάπτυξη υπεροξειδίων στο διάλυμα ιωδιούχου καλίου και στο μίγμα των διαλυτών. Ο αριθμός των υπεροξειδίων (Peroxide Value (PV)) υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

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

όπου:

S - ο όγκος του Na₂S₂O₃ που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του δείγματος ελαίου (mL)

B - όγκος του Na₂S₂O₃ που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος (mL)

N - η κανονικότητα του διαλύματος Na₂S₂O₃

m - η μάζα του δείγματος (g)

5.5.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων με τη χρήση φωτόμετρου

Η υδατική φάση, που παραλαμβάνεται από τα γαλακτώματα που έχουν παρασκευαστεί με την προσθήκη κερκετίνης και ροσμαρινικού οξέος, αφού αραιωθεί κατάλληλα με τη χρήση ACN οδηγείται στο φωτόμετρο σε κυψελίδα χαλαζία βάθους 10 mm. Εκεί γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος λ=360 nm για τα δείγματα που προέρχονται από γαλακτώματα με πρόσθετη ουσία την κερκετίνη και σε λ=320 nm για αυτά στα οποία είχε προστεθεί ροσμαρινικό οξύ. Πριν από τη μέτρηση του δείγματος το φωτόμετρο μηδενίζεται με ACN. Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων γίνεται με βάση καμπύλες αναφοράς που παρασκευάστηκαν για τις δύο πρότυπες ενώσεις.

Η ανίχνευση των βιοδραστικών ενώσεων στα γαλακτώματα έγινε στην υδατική φάση, αφού προηγουμένως είχαν προηγηθεί πειράματα για να εξακριβωθεί σε ποια φάση των

γαλακτωμάτων κατανέμονται αυτές οι ουσίες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ως εξής: παρασκευάστηκαν γαλακτώματα με την ίδια σύσταση με αυτή των γαλακτωμάτων του πειράματος στα οποία προστέθηκαν οι πρότυπες ενώσεις σε συγκέντρωση C=500 ppm (οι ουσίες προστέθηκαν στη λιπαρή φάση), αμέσως μετά ακολούθησε διάσπαση του γαλακτώματος και παραλαβή της υδατικής και της λιπαρής φάσης. Πέρα από τα γαλακτώματα παρασκευάστηκαν διαλύματα των ενώσεων ίδιας συγκέντρωσης. Ακολούθησε φωτομέτρηση της υδατικής φάσης των γαλακτωμάτων και των διαλυμάτων των ενώσεων στα αντίστοιχα μήκη κύματος. Η σύγκριση αυτών των τιμών και στην περίπτωση της κερκετίνης και σε αυτή του ροσμαρινικού οξέος έδειξε ότι αυτές οι τιμές ήταν αρκετά κοντά. Το γεγονός αυτό φανερώνει την σχεδόν πλήρη κατανομή των πρότυπων ενώσεων στην υδατική φάση των γαλακτωμάτων, γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε η ανάλυση να γίνει σε αυτή τη φάση.

5.5.7 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων με HPLC

Ο προσδιορισμός των συστατικών των αρχικών εκχυλισμάτων καθώς και αυτών που βρίσκονται στην υδατική φάση του γαλακτώματος οποιαδήποτε χρονική στιγμή του πειράματος πραγματοποιήθηκε με HPLC-DAD, με στήλη αντίστροφης φάσης, σύμφωνα με τη μέθοδο Tsimoogiannis et. al., 2017. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι διαλύτες A: νερό και διαλύτης B: μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (60:40) με την ακόλουθη γραμμική βαθμίδα: 0 min 90% A, 35 min 71% A και 70 min 0% A. Ο ρυθμός ροής διατηρείται στα 0,4 mL/min, ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μ L και η ανίχνευση DAD ρυθμίσθηκε στα 280 nm. Η ποσοτικοποίηση των συστατικών έγινε με τη χρήση καμπυλών αναφοράς.

5.5.8 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2005) χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό του περιεχομένου των ολικών φαινόλων (TP) των εκχυλισμάτων και της υδατικής φάσης των γαλακτωμάτων. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 7,9 mL απιονισμένο νερό, 0,1 mL από την παραληφθείσα υδατική φάση και 0,5 mL αντιδραστήριο Folin. Ακολουθεί ανάδευση και στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα γίνεται η προσθήκη 1,5 mL Na₂CO₃. Έπειτα από έντονη ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να ηρεμήσουν σε σκοτεινό χώρο για 2 h και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi, U29000). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE), μέσω κατασκευής καμπύλης αναφοράς.

5.5.9 Αντιριζική δραστηριότητα εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH

Η αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου DPPH σύμφωνα με τη μέθοδο που πρότειναν οι Brand-Williams et al. (1995). Αρχικά κατασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας εκχυλισμάτων. Παρασκευάστηκαν τρεις αραιώσεις για κάθε εκχύλισμα, στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα οι αραιώσεις ήταν 1:15, 1:20 και 1:25 ενώ για το αιθανολικό εκχύλισμα ήταν 1:40, 1:50 και 1:60. Κατόπιν παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH με την προσθήκη 2,5 mg DPPH σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και πλήρωσης της με μεθανόλη. Η προσθήκη της μεθανόλης έγινε σταδιακά, αρχικά προστέθηκαν περί τα 50 mL μεθανόλη και το σύστημα ανακινήθηκε ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης διαλυτοποίηση του αντιδραστηρίου, μετά από αυτή τη διαδικασία προστέθηκε η υπόλοιπη ποσότητα μεθανόλης. Τέλος σε δοκιμαστικούς σωλήνες

προστέθηκαν 3,9 mL διαλύματος DPPH και 100 μ L των αραιωμένων εκχυλισμάτων, αυτοί τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος για 2h και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 515nm.

5.5.10 Στερεό υπόλειμμα

Αφού οι περιέκτες πλυθούν προσεκτικά, τοποθετούνται σε φούρνο 100 °C για 10 min και στη συνέχεια σε ξηραντήρα για 10 min. Ακολούθως πραγματοποιείται ζύγιση των περιεκτών σε ζυγό τεσσάρων δεκαδικών και έπειτα εισάγονται 5 mL των εκχυλισμάτων στους περιέκτες οι οποίοι τοποθετούνται σε φούρνο 100 °C για 1 d. Μετά από το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος οι περιέκτες τοποθετούνται για 10 min σε ξηραντήρα και τελικά πραγματοποιείται ζύγιση για την εύρεση του στερεού υπολείμματος σε mg/mL.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων

Τα φαινολικά συστατικά που περιέχονταν στα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των γαλακτωμάτων ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση καμπύλες αναφοράς. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των κύριων φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1

Πίνακας 6.1 Προσδιορισμός των κύριων φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

Βιοδραστικά συστατικά	EACs	Es
C_{εκχυλίσματος} (mg/L)		
Φαινολικά οξέα		
Rosmarinic acid	290±23	1033±72
Salvianolic acid A ^a	2±1	36±3
Lithospermic acid ^a	-	12±2
Caffeic acid ^a	-	8±3
Total phenolic acids^a	304±12	1089±31
Φαινολικά τερπένια		
Carvacrol	213±32	-
Thymol ^b	170±10	-
Φλαβόνες-Φλαβονόλες		
Quercetin	19±5	-
Apigenin ^c	122±57	54±12
Apigenin glycoside ^c	17±7	115±47
Apigenin diglycoside ^c	-	105±9
Luteolin ^c	14±1	-
Luteolin 7,4'-di-O-glucuronide ^c	-	155±36
6-OH luteolin 7,3'-dimethyl ether ^c	9±1	206±23
6-OH luteolin 7,3',4'-trimethyl ether ^c	8±2	81±11
Total flavones/flavonols^c	351±32	1420±67
Φλαβονοειδή / dihydroflavonols		
Eriodictyol	52±17	7±1
Narigenin ^d	81±14	-
Total flavonones/dihydroflavonols^d	141±11	7±1

^a εκφρασμένα σε ισοδύναμα ροσμαρινικού οξέος, ^b εκφρασμένα σε ισοδύναμα καρβακρόλης,

^c εκφρασμένα σε ισοδύναμα κερκετίνης, ^d εκφρασμένα σε ισοδύναμα εριοδικτυόλης

Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιείται παραλαμβάνονται διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Έτσι ο οξικός αιθυλεστέρας έχει ανακτήσει σε μεγαλύτερο ποσοστό λιγότερο πολικά βιοδραστικά συστατικά (φαινολικά τερπένια, φλαβονοειδή) όπως η καρβακρόλη, η θυμόλη, η εριοδικτυόλη και η ναριγγενίνη, ουσίες που δεν εντοπίζονται στο αιθανολικό εκχύλισμα ή εντοπίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό. Αντίθετα στο εκχύλισμα με διαλύτη την αιθανόλη εντοπίζονται πιο πολικές ενώσεις σε μεγαλύτερες ποσότητες (φαινολικά οξέα, γλυκοζίτες φλαβονοειδών), ενώ η ένωση που κυριαρχεί στο εκχύλισμα είναι το ροσμαρινικό οξύ.

Πέρα από τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για την μέτρηση τις αντιριζικής τους ικανότητας και το στερεό υπόλειμμα τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Προσδιορισμός των χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

	mg GAE/L αρχικού διαλύματος ^α	mg Trolox/ L εκχυλίσματος ^β	mg/mL εκχυλίσματος ^γ
EACs	675	1038	7.72
Es	4231	7793	14.87

^α Αποτελέσματα από την μέθοδο Follin

^β Αποτελέσματα από τη μέθοδο DPPH

^γ Στερεό υπόλειμμα

6.2 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων και πρότυπων ουσιών σε γαλακτώματα

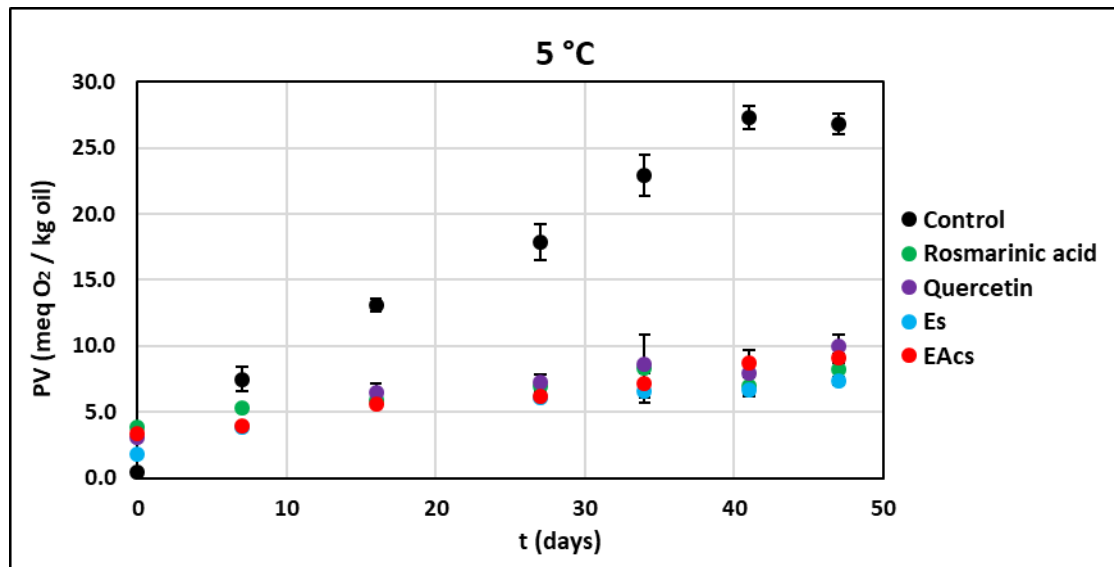
Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης τόσο των πρότυπων ουσιών όσο και των εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στα γαλακτώματα πραγματοποιήθηκε μελετώντας τρεις συνιστώσες. Η πρώτη σχετίζεται με τα πρωτογενή προϊόντα της οξείδωσης και έγινε με τη μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων. Η δεύτερη αφορά τα πτητικά δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης και έγινε μέσω της μέτρησης των πτητικών αλδευδών στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας των γαλακτωμάτων. Τέλος, η τρίτη σχετίζεται με την κατανάλωση του οξυγόνου.

6.2.1 Επίδραση της προσθήκης διαφορετικών ουσιών στα γαλακτώματα

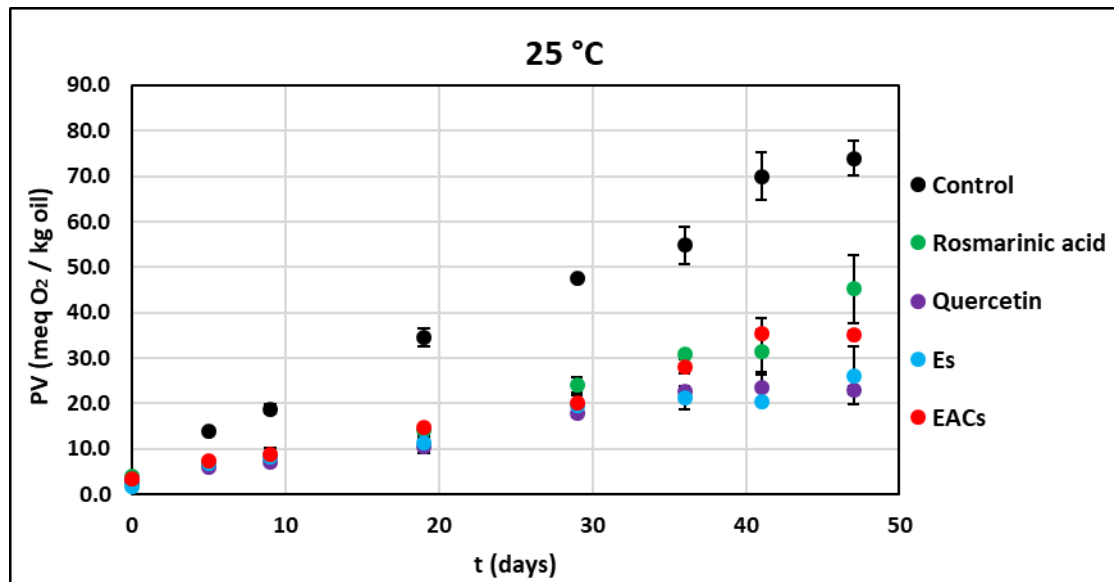
Η μελέτη της δράσης των αντιοξειδωτικών στα γαλακτώματα πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (5, 25, 40 °C). Στην ενότητα αυτή γίνεται σύγκριση της διαφορετικής αντιοξειδωτικής δράσης που παρουσιάζουν οι ενώσεις που ενσωματώθηκαν σε κάθε θερμοκρασία.

Όπως αναφέρεται και στην πειραματική διαδικασία τα δείγματα των γαλακτωμάτων τοποθετήθηκαν σε ισοθερμοκρασιακούς θαλάμους, ενώ κάποια προκαθορισμένη στιγμή δείγματα αυτών εξάγονταν για να μελετηθούν διάφορα χαρακτηριστικά τους. Στην εικόνα 6.1 παρατηρείται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων σε συνάρτηση με το χρόνο για τις τρεις θερμοκρασίες που μελετώνται.

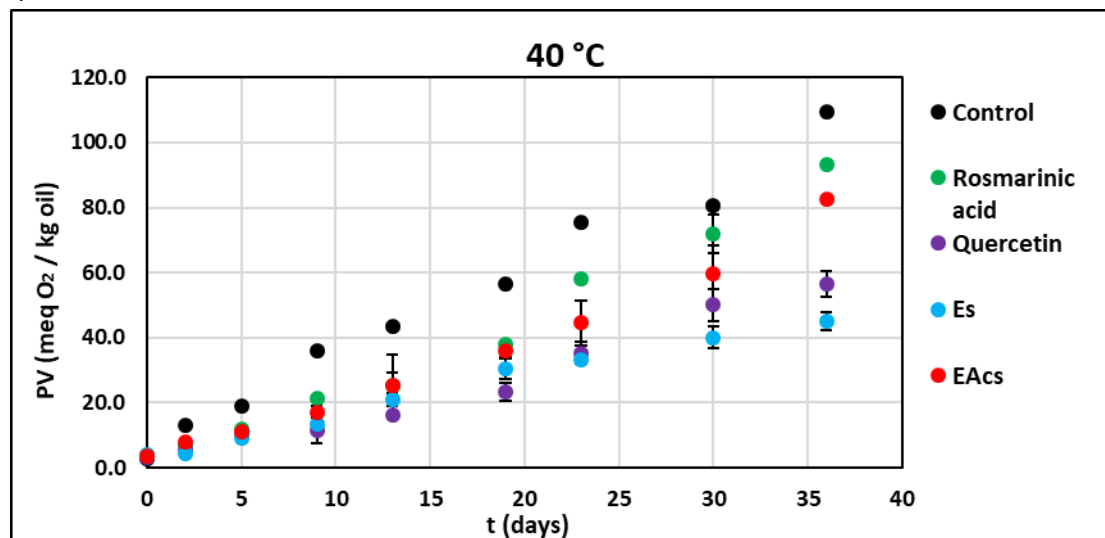
a)



b)



c)

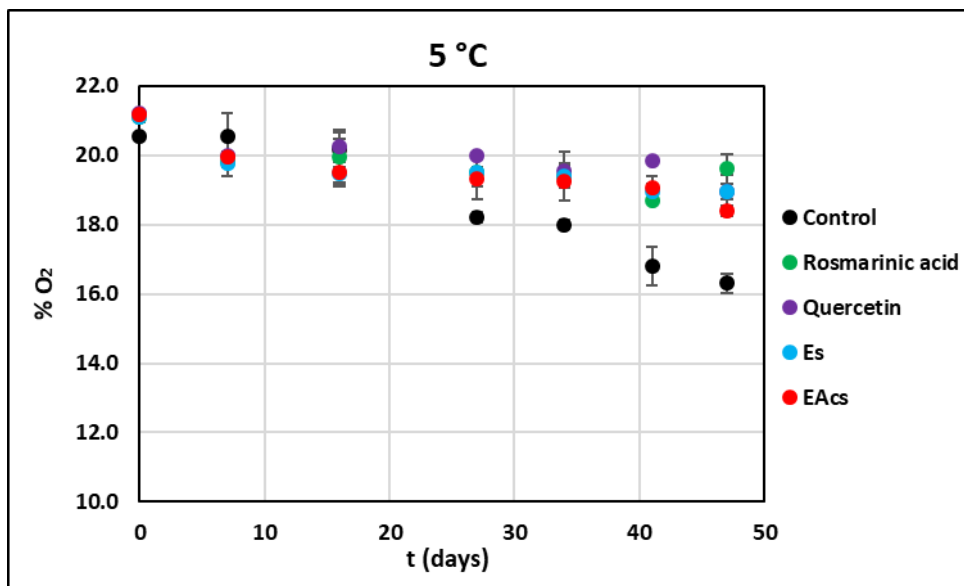


Εικόνα 6.1 Επίδραση της προσθήκης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στην δημιουργία υδροϋπεροξειδίων σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο στους α) 5 °C, β) 25 °C και γ) 40 °C (Es: αιθανολικό εκχύλισμα, EAcs: εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα)

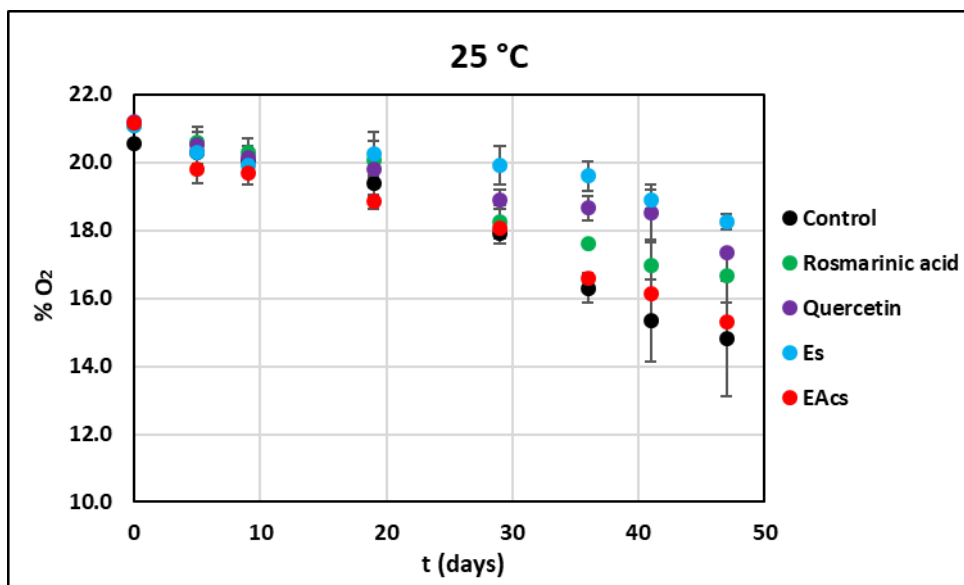
Δύο είναι τα κυριότερα σημεία που παρατηρούνται και στις τρεις θερμοκρασίες. Αρχικά φαίνεται ότι όλες οι ουσίες που ενσωματώθηκαν στη λιπαρή φάση των γαλακτωμάτων προστάτησαν έναντι της δημιουργίας πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης αφού ο αριθμός υπεροξειδίων του control είναι αρκετά μεγαλύτερος σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες σειρές δειγμάτων που εξετάστηκαν. Επίσης δεν παρατηρήθηκε χρόνος επώασης σε κανένα από τα υπό μελέτη γαλακτώματα. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση είναι πως όσο ο αριθμός των υπεροξειδίων είναι μικρότερος ή και ίσος του 10 δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στη αντιοξειδωτική δράση που προσφέρουν τα διαφορετικά αντιοξειδωτικά. Παρόλα αυτά τόσο στην περίπτωση των 40 °C όσο και των 25 °C παρατηρείται ότι την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν η κερκετίνη και το Es, ακολουθεί το EAcs ενώ η χειρότερη συνεισφορά προέρχεται από το ροσμαρινικό οξύ. Η στατιστική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε απέδειξε ότι η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων εξαρτάται τόσο από την ουσία που προστέθηκε όσο και από τον χρόνο αποθήκευσης. Επίσης φαίνεται ότι μετά από τις 20 μέρες υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σειρών δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Στην εικόνα 6.2 παρουσιάζεται ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας σε συνάρτηση με το χρόνο.

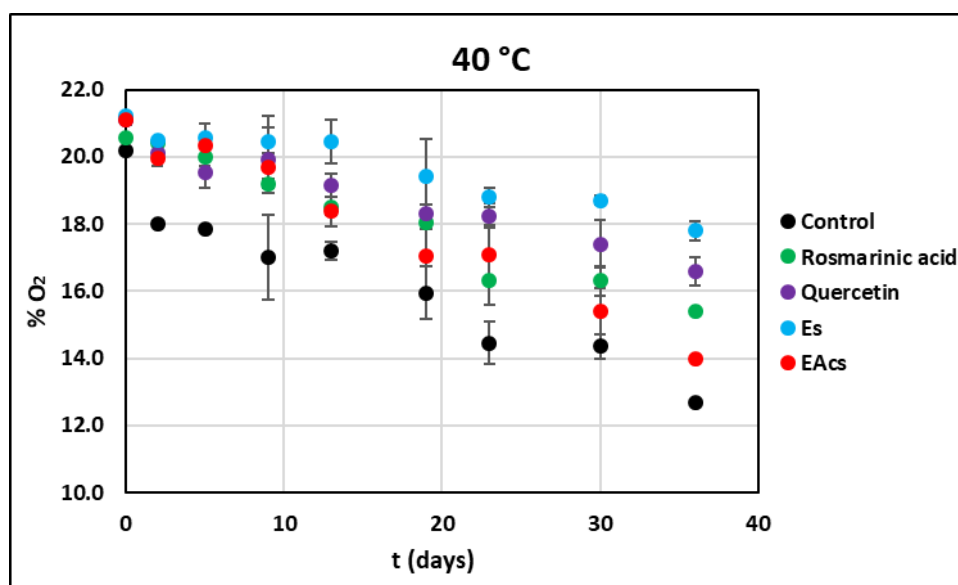
a)



b)



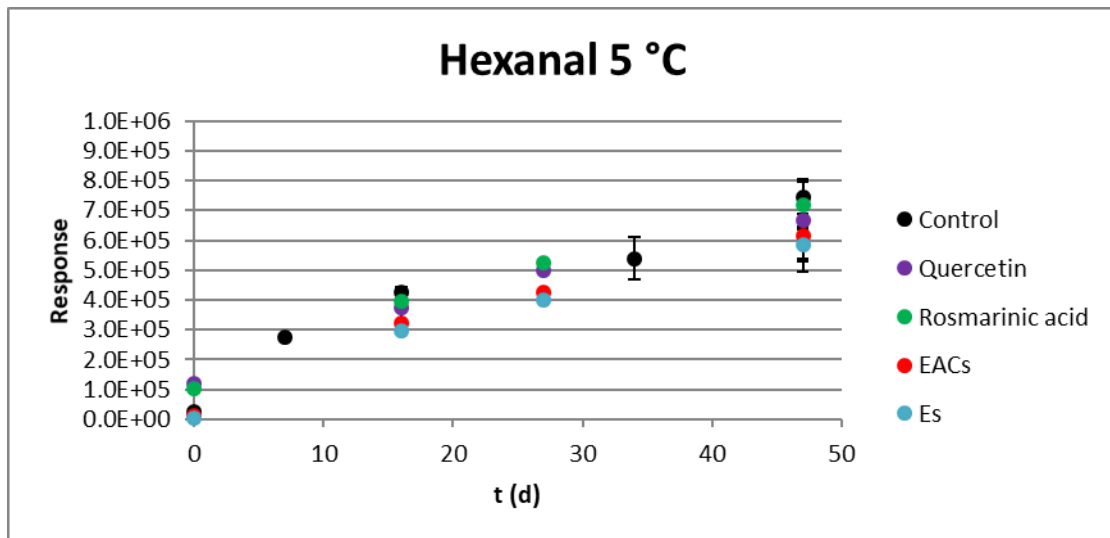
c)



Εικόνα 6.2 Επίδραση της προσθήκης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στην κατανάλωση οξυγόνου σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο στους α) 5 °C, β) 25 °C και γ) 40 °C (Es: αιθανολικό εκχύλισμα, EAcs: εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα)

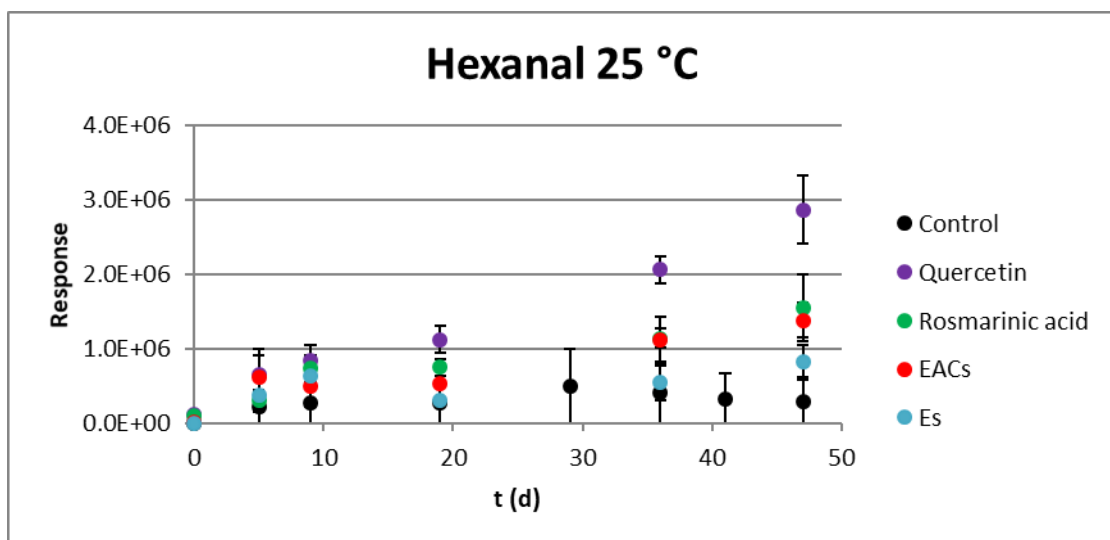
Ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου είναι αντίστροφα ανάλογος με τον ρυθμό παραγωγής υπεροξειδίων. Όπως είναι αναμενόμενο καθώς πραγματοποιείται οξείδωση, σε όλες τις σειρές δειγμάτων παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Όλα τα control δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν τη μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου, ακολουθούμενα από τα δείγματα EAcs και ροσμαρινικού οξέος. Την χαμηλότερη κατανάλωση οξυγόνου είχαν οι σειρές δειγμάτων Es και κερκετίνης. Στο πείραμα των 5 °C, καθώς η οξείδωση δεν έχει προχωρήσει λόγω χαμηλής θερμοκρασίας, μόνο το control φαίνεται να διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ όλες οι υπόλοιπες σειρές δειγμάτων φαίνεται ότι παρέχουν παρόμοια αντιοξειδωτική προστασία έναντι της οξείδωσης των γαλακτωμάτων. Στους 25 °C και 40 °C παρατηρείται μια πιο καθαρή εικόνα του ρυθμού μείωσης του οξυγόνου. Αυξανόμενη της θερμοκρασίας παρατηρείται διαφοροποίηση του ρυθμού κατανάλωσης του οξυγόνου στις σειρές δειγμάτων που μελετήθηκαν. Η μικρότερη μεταβολή στη συγκέντρωση του οξυγόνου παρατηρείται για τα δείγματα Es και κερκετίνης ακολουθούμενα από εκείνα ροσμαρινικού οξέος και EAcs. Η στατιστική ανάλυση απέδειξε ότι η κατανάλωση του οξυγόνου εξαρτάται τόσο από την ουσία που προστέθηκε στο γαλακτώμα όσο και από το χρόνο αποθήκευσης.

Ο επόμενος παράγοντας που αναλύθηκε και σχετίζεται με τα δευτερογενή πτητικά προϊόντα της οξείδωσης, με μέτρηση της παραγόμενης εξανάλης του υπερκείμενου χώρου της συσκευασίας, η οποία είναι από τα πρώτα δευτερογενή προϊόντα που παράγονται. Κατά την ανάλυση των πτητικών ενώσεων με τη μέθοδο HS-SPME ανιχνεύτηκε, επίσης, παραγωγή αμελητέας ποσότητας επτανάλης, ενώ δεν εντοπίστηκε παραγόμενη οκτανάλη και εννεανάλη, γι' αυτό παρακάτω παρουσιάζονται μόνο τα δεδομένα που προέκυψαν για την εξανάλη.



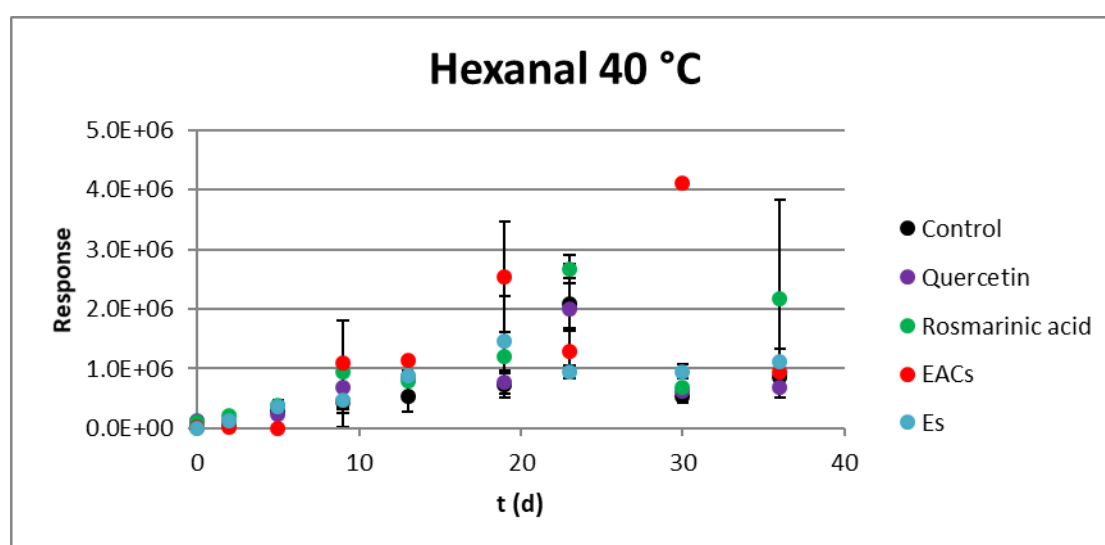
Εικόνα 6.3 Επίδραση της προσθήκης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στην δημιουργία εξανάλης σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο στους 5 °C (Es: αιθανολικό εκχύλισμα, EACs: εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα)

Στο πείραμα των 5 °C δεν παρατηρείται μεγάλη παραγωγή εξανάλης, κατά τη διάρκεια των πενήντα ημερών διεξαγωγής του πειράματος, πιθανώς λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας η οποία δεν ευνοεί την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών υπό εξέταση σειρών δειγμάτων και παρόλο που υπάρχει μικρή αύξηση της πτητικής ένωσης, αυτή δεν φαίνεται να διαφοροποιείται στα δείγματα που μελετήθηκαν.



Εικόνα 6.4 Επίδραση της προσθήκης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στην δημιουργία εξανάλης σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο στους 25 °C (Es: αιθανολικό εκχύλισμα, EACs: εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα)

Στο πείραμα των 25 °C, η απόκριση της εξανάλης που ανιχνεύεται είναι μεγαλύτερη από εκείνη του πειράματος των 5 °C, γεγονός που θεωρείται αναμενόμενο καθώς αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται αύξηση των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης. Τα control δείγματα δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται σημαντικά από τα δείγματα με κερκετίνη. Ωστόσο τόσο τα δείγματα με τα δραστικά εκχυλίσματα από θρούμπι όσο και τα δείγματα με ροσμαρινικό οξύ παρουσίασαν μικρότερο ρυθμό παραγωγής εξανάλης, με την καλύτερη συμπεριφορά να εμφανίζουν τα δείγματα με Es. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι ενώ τα δείγματα με κερκετίνη είχαν χαμηλό αριθμό υπεροξειδίων, καθιστώντας την κερκετίνη ένα από τα καλύτερα αντιοξειδωτικά πρόσθετα που μελετήθηκαν, εντούτοις αυτό έρχεται σε αντίθεση με τον υψηλότερο βαθμό παραγωγής εξανάλης των δειγμάτων αυτών γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν τα πρωτογενή προϊόντα να διασπώνται γρήγορα σε δευτερογενή.



Εικόνα 6.5 Επίδραση της προσθήκης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων από το φυτό *Satureja thymbra* στην δημιουργία εξανάλης σε γαλακτώματα με λιπαρή φάση ηλιέλαιο στους 40 °C (Es: αιθανολικό εκχύλισμα, EACs: εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα)

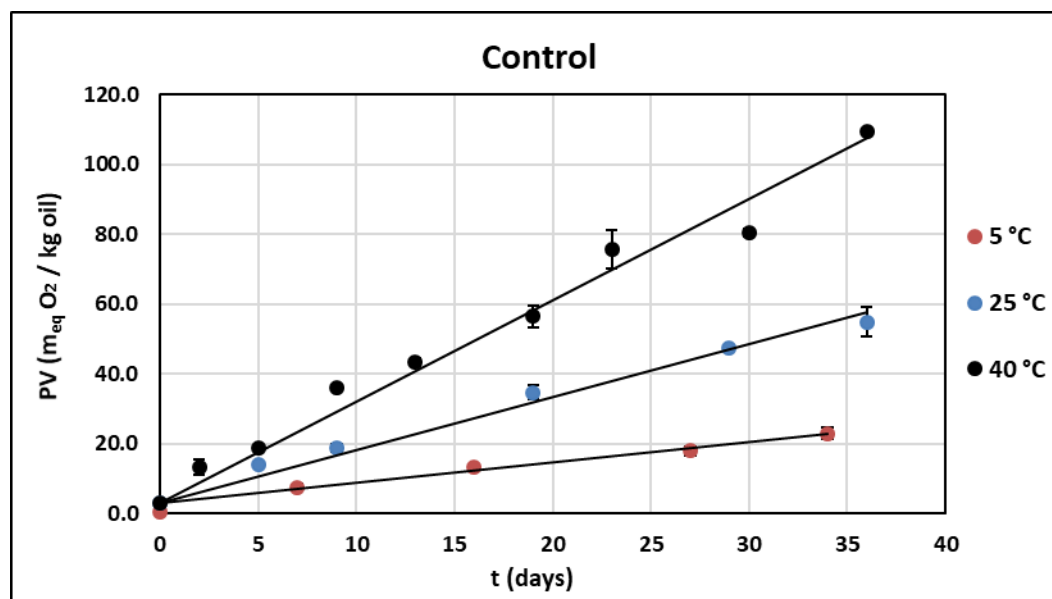
Στο πείραμα των 40 °C, η παρουσία της εξανάλης δεν διαφοροποιείται σημαντικά για καμία από τις σειρές δειγμάτων που μελετήθηκαν. Σε σχέση με τα πειράματα χαμηλότερων θερμοκρασιών παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή εξανάλης για τα δείγματα πριν από τις 30 ημέρες. Ενώ μετά από αυτό το χρονικό διάστημα η παραγόμενη εξανάλη στους 40 °C φαίνεται να είναι σε μικρότερη ποσότητα σε σχέση με αυτή στους 25 °C, αυτό συμβαίνει σε όλα τα δείγματα εξαιρουμένων αυτών στα οποία έχει προστεθεί το αιθανολικό εκχύλισμα. Το γεγονός αυτό, πιθανά, οφείλεται στη διάσπαση της εξανάλης ή και στην παραγωγή πτητικών ενώσεων μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας όπως η επτανάλη. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, οι πίνακες παρατίθενται στο παράρτημα, στις θερμοκρασίες που προσομοιάζουν την ψύξη και την αποθήκευση στο περιβάλλον η παραγωγή της εξανάλης επηρεάζεται τόσο από το χρόνο όσο και από την υπό μελέτη ουσία. Καθώς η θερμοκρασία αποθήκευσης μεγαλώνει, η επίδραση της προστιθέμενης ουσίας στην παραγωγή εξανάλης φαίνεται να περιορίζεται.

Τα εκχυλίσματα του φυτού *Satureja Thymbra* που μελετήθηκαν στη παρούσα διπλωματική εργασία αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας και για τους (Tsimogiannis, et al., 2017). Κατά την μελέτη αυτή εξετάστηκε η δράση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα και του αιθανολικού εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού σε γαλακτώματα παρόμοιας σύστασης με αυτά της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η βασική διαφορά μεταξύ των γαλακτωμάτων ήταν το φοινικέλαιο, το οποίο αποτελούσε τη λιπαρή φάση. Παρόλα αυτά και σε αυτήν την έρευνα το αιθανολικό εκχύλισμα υπερείχε έναντι του άλλου εκχυλίσματος ως προς την προστασία των γαλακτωμάτων από την οξείδωση.

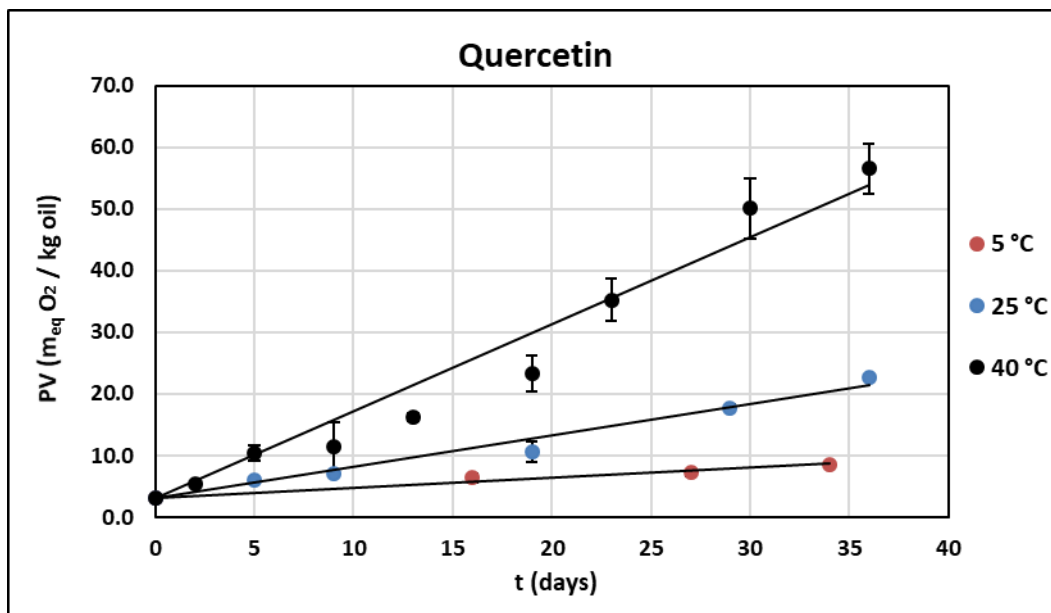
6.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό οξείδωσης των γαλακτωμάτων

Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό επιλέχθηκε η μελέτη της δράσης των αντιοξειδωτικών σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες έτσι ώστε να βρεθεί ο ρυθμός παραγωγής των πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται οι μεταβολές του αριθμού υπεροξειδίων με το χρόνο για τις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες εκτέθηκε κάθε γαλάκτωμα. Από τις καμπύλες που προκύπτουν για την κάθε ουσία και την κάθε θερμοκρασία, φαίνεται ότι οι εξισώσεις που προσαρμόζονται καλύτερα είναι της μορφής $PV=k*t+PV_0$, όπου το k είναι η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης με μονάδες $\frac{m_{eq} O_2}{kg_{oil} \cdot d}$ και PV_0 είναι ο αριθμός υπεροξειδίων του αντίστοιχου γαλακτώματος τη χρονική στιγμή $t=0$.

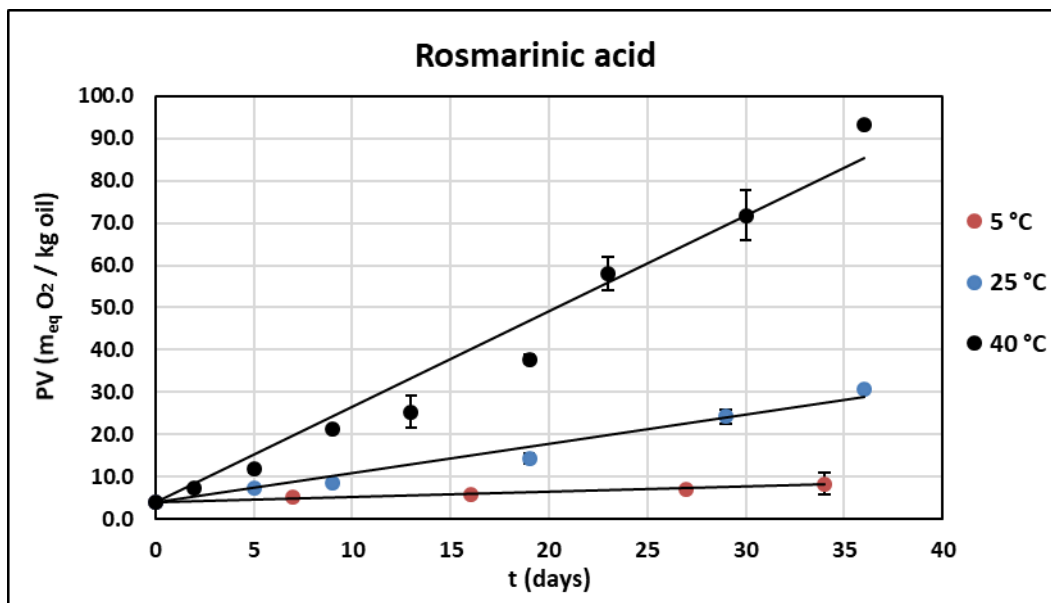
a)



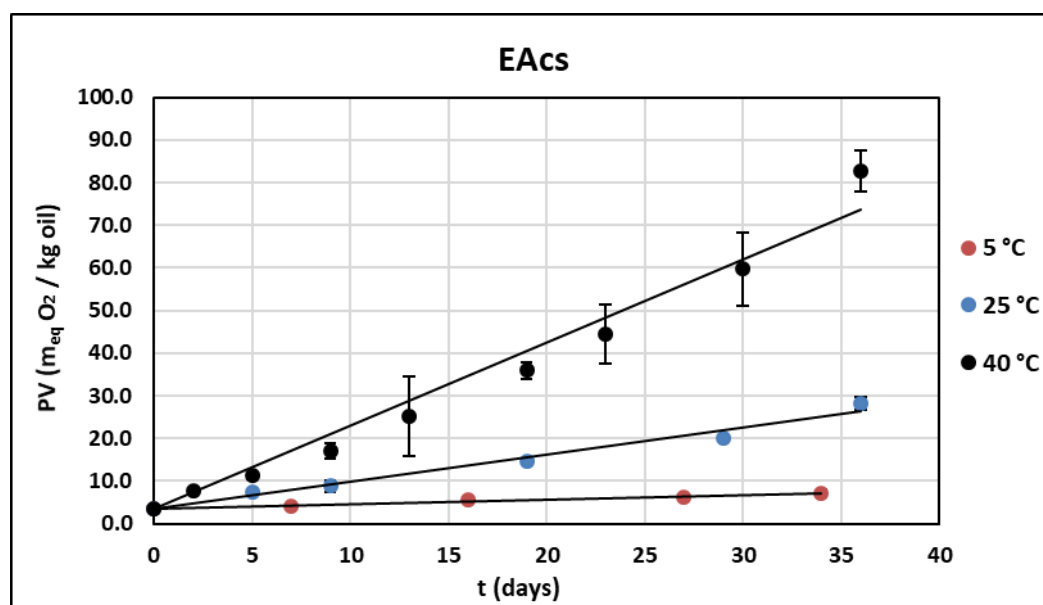
b)



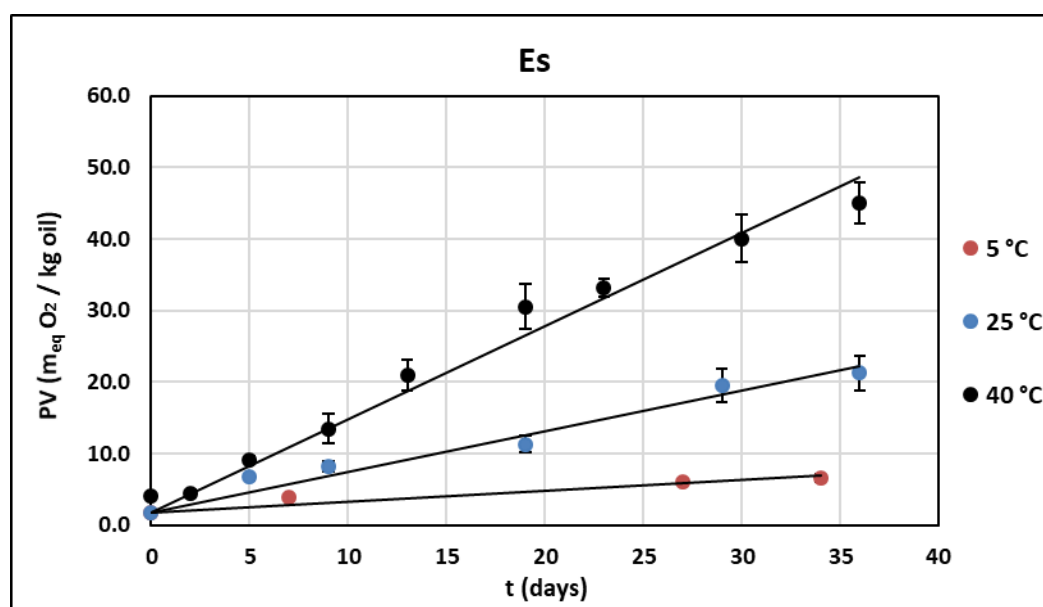
c)



d)



e)



Εικόνα 6.6 Παραγωγή υδροϋπεροξειδίων σε θερμοκρασίες των 5 °C, 25 °C και 40 °C για a) control και για γαλακτώματα στα οποία έχει προστεθεί b) κερκετίνη, c) ροσμαρινικό οξύ, d) EACs και e) Es.

Οι εξισώσεις που προέκυψαν για κάθε γαλάκτωμα και για κάθε θερμοκρασία, καθώς και οι συντελεστές συσχέτισης παρουσιάζονται στους πίνακες 6.3 και 6.4.

Πίνακας 6.3 Εξισώσεις που χαρακτηρίζουν την παραγωγή υδροϋπεροξειδίων με το χρόνο σε γαλακτώματα με κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ

t (°C)	Control		Quercetin		Rosmarinic acid	
	PV	R ²	PV	R ²	PV	R ²
5	0,5884*t+2,8	0,9762	0,1642*t+3,1	0,9635	0,1249*t+3,9	0,9653
25	1,5252*t+2,8	0,9831	0,5088*t+3,1	0,9757	0,6953*t+3,9	0,9799

40	2,9077*t+2,8	0,9787	1,4090*t+3,1	0,9608	2,2665*t+3,9	0,9699
-----------	--------------	--------	--------------	--------	--------------	--------

Πίνακας 6.4 Εξισώσεις που χαρακτηρίζουν την παραγωγή υδροϋπεροξειδίων με το χρόνο σε γαλακτώματα με εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EACs) και αιθανόλης (Es)

t (°C)	Control		EACs		Es	
	PV	R ²	PV	R ²	PV	R ²
5	0,5884*t+2,8	0,9762	0,1110*t+3,4	0,9702	0,1520*t+1,8	0,9201
25	1,5252*t+2,8	0,9831	0,6354*t+3,4	0,9812	0,5672*t+1,8	0,9642
40	2,9077*t+2,8	0,9787	1,9505*t+3,4	0,9729	1,2986*t+1,8	0,9779

Για την εύρεση της εξάρτησης της σταθεράς k από τη θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε η εμπειρική σχέση του Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (1')$$

Όπου:

k₀: συντελεστής Arrhenius

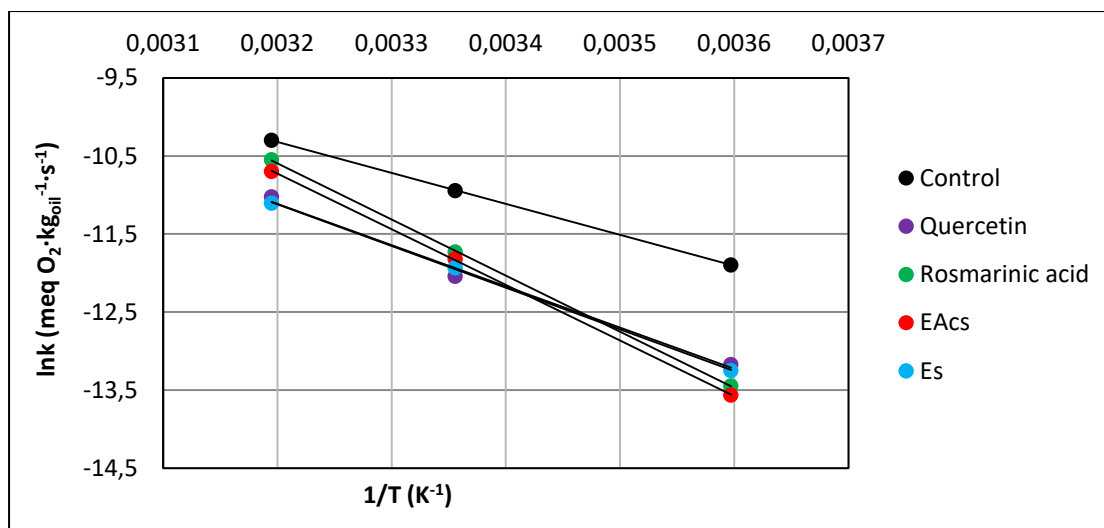
E_a: η ενέργεια ενεργοποίησης σε J/mol

R: παγκόσμια σταθερά των ιδανικών αερίων=8,314 J/(K · mol)

T: απόλυτη θερμοκρασία (K)

Λογαριθμίζοντας την εξίσωση (1') προκύπτει η εξίσωση (2'). Με βάση αυτή την εξίσωση αλλά και τα δεδομένα από τους πίνακες 6.3 και 6.4 είναι δυνατό να βρεθούν οι σταθερές k₀ και E_a για κάθε γαλάκτωμα.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2')$$



Εικόνα 6.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στις σταθερές του ρυθμού παραγωγής υδροϋπεροξειδίων στα γαλακτώματα

Στην εικόνα 6.7 απεικονίζονται οι ευθείες που προκύπτουν από τη συσχέτιση της σταθεράς ταχύτητας της παραγωγής πρωτογενών προϊόντων οξείδωσης (υπεροξειδία) και της θερμοκρασίας. Ενώ στον πίνακα 6.5 παρουσιάζονται οι εξισώσεις που προέρχονται από την παραπάνω συσχέτιση.

Πίνακας 6.5 Εξισώσεις που προκύπτουν από τη συσχέτιση της σταθεράς ταχύτητας σχηματισμού των υπεροξειδίων με τη θερμοκρασία μέσω της εμπειρικής σχέσης του Arrhenius

	Εξίσωση	R ²
Control	$\ln k = 3970 \cdot \frac{1}{T} + 2,3817$	1,0000
Quercetin	$\ln k = 5292 \cdot \frac{1}{T} + 5,8202$	0,9999
Rosmarinic acid	$\ln k = 7199 \cdot \frac{1}{T} + 12,441$	0,9999
EACs	$\ln k = 7134 \cdot \frac{1}{T} + 12,103$	0,9999
Es	$\ln k = 5343 \cdot \frac{1}{T} + 5,9755$	0,9999

Σύμφωνα με τις εξισώσεις του πίνακα 6.5 υπολογίζονται οι παράμετροι της εξίσωσης Arrhenius, δηλαδή ο συντελεστής Arrhenius και η ενέργεια ενεργοποίησης. Οι τιμές των δύο παραμέτρων για τα πέντε γαλακτώματα που μελετώνται παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6 Σταθερές που διέπουν την παραγωγή υδροϋπεροξειδίων στα γαλακτώματα

	$k_0 (\text{meq O}_2 \cdot \text{kg}_{\text{oil}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$E_a (\text{J/mol})$
Control	10,820	33007
Quercetin	337,04	43997
Rosmarinic acid	$252,96 \cdot 10^3$	59848
EACs	$180,41 \cdot 10^3$	59312
Es	393,66	44420

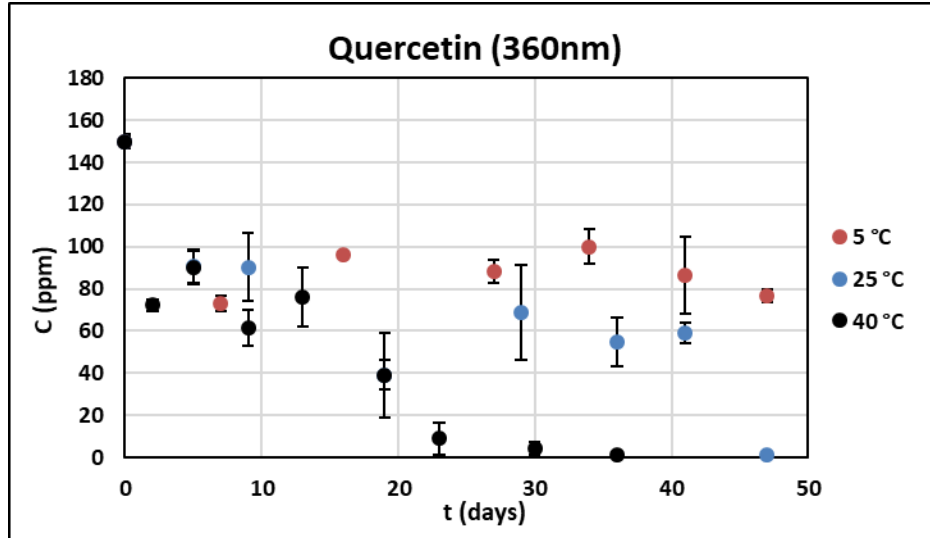
Όσον αφορά τη σταθερά k_0 οι ευρεθείσες τιμές είναι παρόμοιες στην περίπτωση των γαλακτωμάτων με τη προσθήκη κερκετίνης και E_s , το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση αυτών με ροσμαρινικό οξύ και EACs. Ωστόσο οι τιμές μεταξύ των δύο ζευγών αλλά και του control είναι αρκετά διαφορετικές και διαφέρουν ακόμα και ως προς την τάξη μεγέθους. Στην περίπτωση του control η σταθερά είναι στην μικρότερη τάξη μεγέθους (10^1), ακολουθούν η κερκετίνη με το E_s με ελαφρώς μεγαλύτερη τάξη (10^2) και έπονται τα εναπομείναντα γαλακτώματα με σημαντική διαφορά (10^6). Ο παράγοντας k_0 , ο οποίος αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος για την αντίδραση, εξαρτάται από πολλά χαρακτηριστικά του συστήματος όπως τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και τη σχετική μοριακή μάζα των ενώσεων που αντιδρούν καθώς και από στερεοχημικούς παράγοντες, όμως είναι ανεξάρτητος της θερμοκρασίας, όπως και η ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτός ο παράγοντας, ουσιαστικά, εκφράζει τη συχνότητα των πετυχημένων συγκρούσεων μεταξύ των αντιδρώντων ώστε να παραχθούν τα προϊόντα.

Όπως προκύπτει από την παραπάνω ανάλυση οι τιμές της E_a διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών γαλακτωμάτων. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα στην περίπτωση του control συναντάται η μικρότερη E_a , δηλαδή ο ρυθμός οξείδωσης επηρεάζεται λιγότερο από τη θερμοκρασία σε σύγκριση με τα γαλακτώματα με τα πρόσθετα. Ακολουθούν τα γαλακτώματα που περιέχουν κερκετίνη και E_s με παρόμοιες τιμές, και τέλος η μεγαλύτερη E_a εντοπίζεται στο ροσμαρινικό οξύ και το EACs. Πράγματι, όπως σχολιάστηκε και στο υποκεφάλαιο 6.2.1, ενώ ο ρυθμός οξείδωσης παρουσία ροσμαρινικού οξέος ή EACs στους 5 °C είναι πολύ χαμηλός, η προστασία από αυτά τα αντιοξειδωτικά μειώνεται πολύ περισσότερο με τη θερμοκρασία (και επομένως ο ρυθμός οξείδωσης αυξάνεται) σε σύγκριση με την κερκετίνη και το E_s .

6.3 Μελέτη της διατηρησιμότητας των βιοδραστικών ουσιών σε γαλακτώματα

Πέρα από τη μελέτη της προστασίας των γαλακτωμάτων από την οξείδωση με την προσθήκη των ενώσεων που αναφέρθηκαν, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετάται και η διατήρηση των ενώσεων αυτών, οι οποίες έχουν εξακριβωμένα ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρότυπων ουσιών στα γαλακτώματα έγινε φωτομετρικά στα μέγιστα απορρόφησης της κερκετίνης ($\lambda=360$ nm) και του ροσμαρινικού οξέος ($\lambda=320$ nm). Παρόλο που η ενσωμάτωση των πρότυπων ουσιών έγινε στην ελαιώδη φάση, αποδείχθηκε πειραματικά η σχεδόν πλήρης μεταφορά των ουσιών αυτών στην υδατική φάση των γαλακτωμάτων. Συνεπώς μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων επιλέχθηκε η υδατική φάση προκειμένου να προσδιορισθούν οι εναπομείνουσες ποσότητες των ουσιών αυτών.

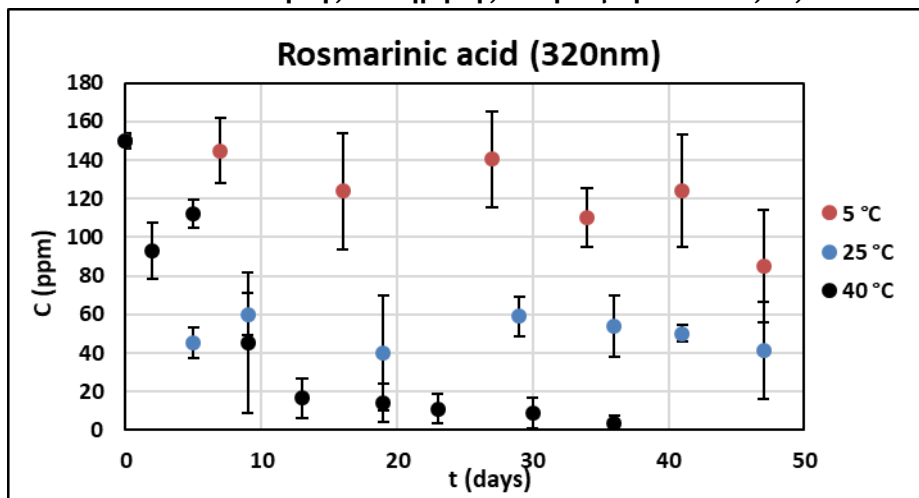
6.3.1 Μελέτη της διατήρησης της κερκετίνης



Εικόνα 6.8 Διατήρηση της κερκετίνης στην υδατική φάση των γαλακτωμάτων στα οποία είχαν προστεθεί 150 ppm

Η συγκέντρωση της κερκετίνης στην υδατική φάση του γαλακτώματος φαίνεται να μειώνεται ήδη από τις πρώτες μέρες αποθήκευσης και για τις τρεις υπό μελέτη θερμοκρασίες. Ενδιαφέρον είναι ότι στο πείραμα των 5 °C αν και αρχικά εμφανίζεται μια αξιοσμεύτη μείωση της συγκέντρωσης, που παρατηρείται την 7^η ημέρα αποθήκευσης, στη συνέχεια η ποσότητα της κερκετίνης διατηρείται σταθερή στα 2/3 περίπου της αρχικής συγκέντρωσης, μέχρι την 47^η μέρα που παρατηρείται κατανάλωση του 52% της αρχικής ποσότητας που προστέθηκε. Για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στους 25 °C αρχικά παρατηρείται μείωση της τάξεως του 40%, ενώ έπεται μία διακύμανση μεταξύ των τιμών 90 και 55 ppm. Στο τέλος του πειράματος η συγκέντρωση της κερκετίνης στους 25 °C φαίνεται να μηδενίζεται απότομα. Στους 40 °C η μείωση της συγκέντρωσης είναι εμφανής ήδη από τη 2^η μέρα αποθήκευσης, ενώ μετά από 25 ημέρες περίπου η συγκέντρωσή της θεωρείται αμελητέα.

6.3.2 Μελέτη της διατήρησης του ροσμαρινικού οξέος



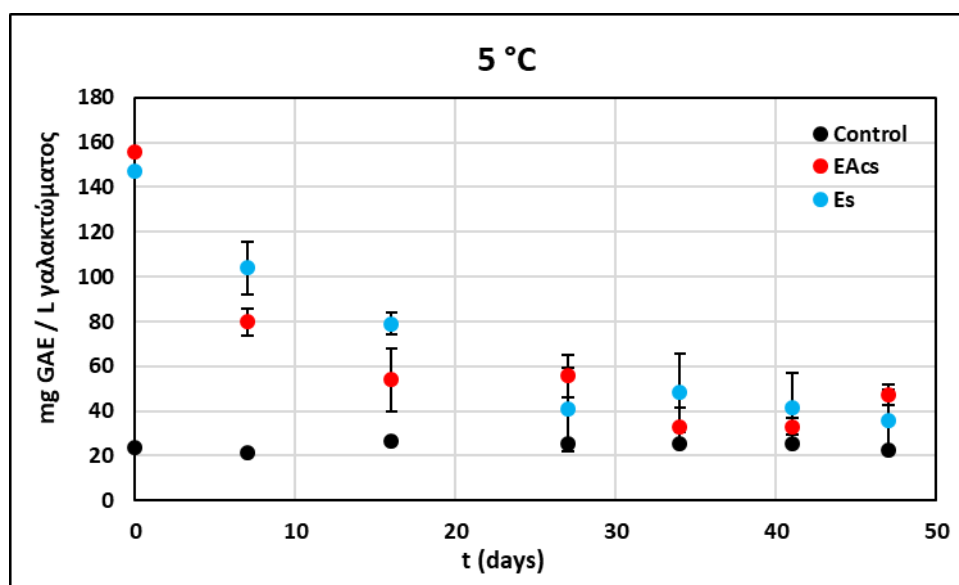
Εικόνα 6.9 Διατήρηση του ροσμαρινικού οξέος στην υδατική φάση των γαλακτωμάτων στα οποία είχαν προστεθεί 150 ppm

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος έγινε φωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση στα 320 nm. Στο πείραμα των 5 °C παρατηρείται μείωση της δραστικής ένωσης, παρόλα αυτά η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρείται πάνω από τα 80 ppm, δηλαδή παρατηρείται μια κατανάλωση της τάξεως του 46,7%. Στα γαλακτώματα που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C μετά την αρχική μείωση που παρατηρείται τις πρώτες 10 μέρες αποθήκευσης, η οποία είναι πάνω από το 50% της αρχικής συγκέντρωσης, δεν εμφανίζονται μεγάλες μεταβολές. Η ποσότητα της δραστικής ένωσης, κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, διατηρείται κοντά στο 30% της συγκέντρωσης που ενθυλακώθηκε εξαρχής στα γαλακτώματα. Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στους 40 °C η μείωση του ροσμαρινικού οξέος είναι ραγδαία από την αρχή. Μετά από τις 10 ημέρες αποθήκευσης η συγκέντρωση που εμφανίζεται στα δείγματα είναι κάτω από 20 ppm, δηλαδή ήδη από αυτό το σημείο έχει καταναλωθεί/αποσυντεθεί περίπου το 87% της αρχικής ποσότητας, ενώ μετά από τις 30 ημέρες δεν εντοπίζεται παρουσία της ένωσης.

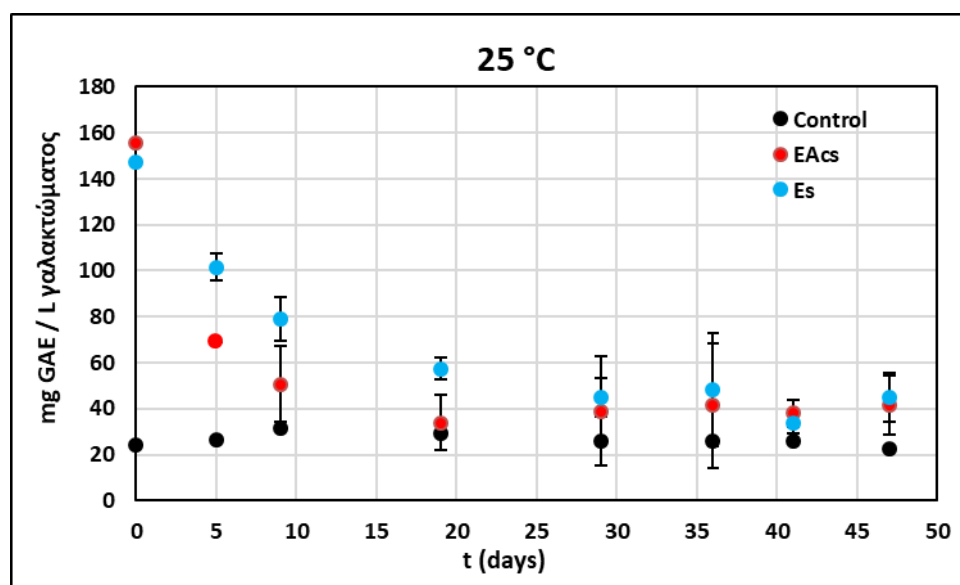
6.3.3 Μελέτη της διατήρησης των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών στα γαλακτώματα έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu στην υδατική φάση αυτών. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε τόσο στα γαλακτώματα με βιοδραστικά εκχυλίσματα ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα όσο και στο γαλάκτωμα του μάρτυρα.

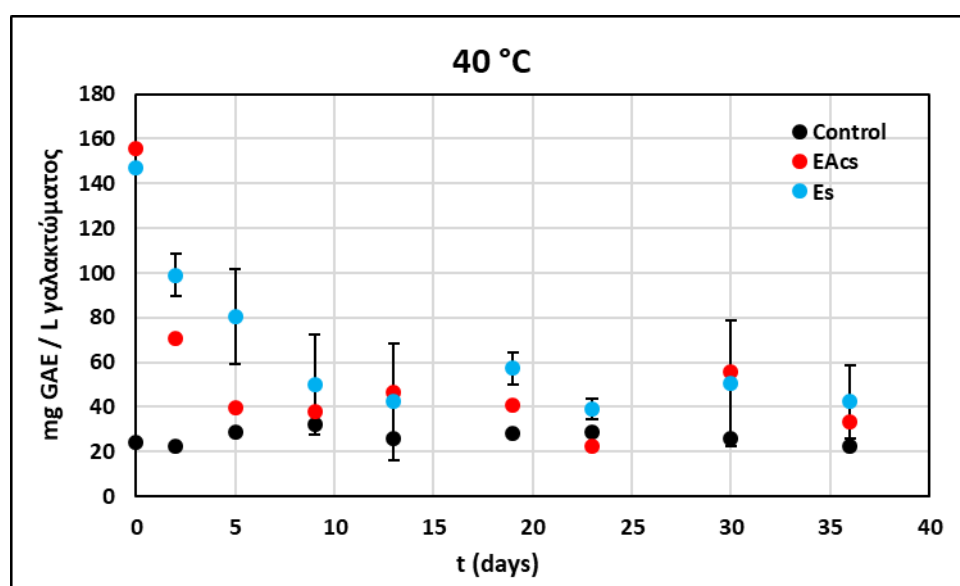
a)



b)



c)



Εικόνα 6.10 Διατήρηση των ολικών φαινολών σε γαλακτώματα σε α) 5° C, b) 25 °C και c) 40 °C στα οποία έχουν προστεθεί εκχύλισμα από θρούμπι με οξικό αιθυλεστέρα (EACs) και αιθανόλη (Es), η αρχική συγκέντρωση των ολικών φαινολών ήταν 150 ppm

Στο διάγραμμα 6.10-α φαίνεται η μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών, όπως αυτή παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος στους 5 °C για τα δύο εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Παρατηρείται σταδιακή μείωση αυτών σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μετά τις πρώτες 30 μέρες αποθήκευσης, η κατανάλωση των ολικών φαινολών είναι πάνω από το 70% της αρχικής ποσότητας.

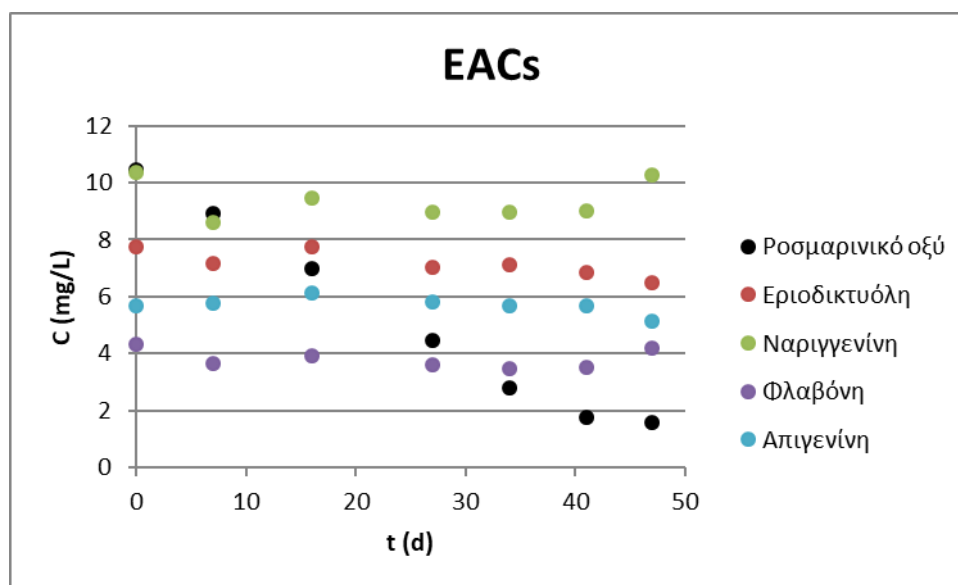
Στους 25 °C τα ολικά φαινολικά καταναλώνονται πιο σύντομα σε σχέση με τους 5 °C, ενώ παρατηρείται πιο ταχεία κατανάλωση για την περίπτωση του γαλακτώματος στο οποίο έχει προστεθεί το εκχύλισμα EACs σε σχέση με το έτερο γαλάκτωμα. Στα δείγματα που

περιέχουν EACs οι ολικές φαινόλες είναι σε πολύ μικρή συγκέντρωση ήδη από τις 19 μέρες αποθήκευσης, με την κατανάλωση να είναι σε επίπεδο πάνω από 83,33%, ενώ για την περίπτωση των γαλακτωμάτων με το Es αυτό φαίνεται να γίνεται πριν από τις 36 ημέρες.

Στη σειρά των γαλακτωμάτων με τα εκχυλίσματα τα οποία αποθηκεύτηκαν στην υψηλότερη θερμοκρασία, δηλαδή στους 40 °C, η παρουσία των ολικών φαινολών στην υδατική τους φάση μειώνεται αρκετά εντός των πρώτων δέκα ημερών. Ήδη από την 5^η μέρα αποθήκευσης δεν φαίνεται να υπάρχουν φαινόλες στα δείγματα με EACs, ενώ το ίδιο παρατηρείται και για δείγματα με Es μετά από 23 μέρες περίπου.

Σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν παρατηρείται ότι ο ρυθμός μείωσης των ολικών φαινολών στα γαλακτώματα με EACs είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί Es.

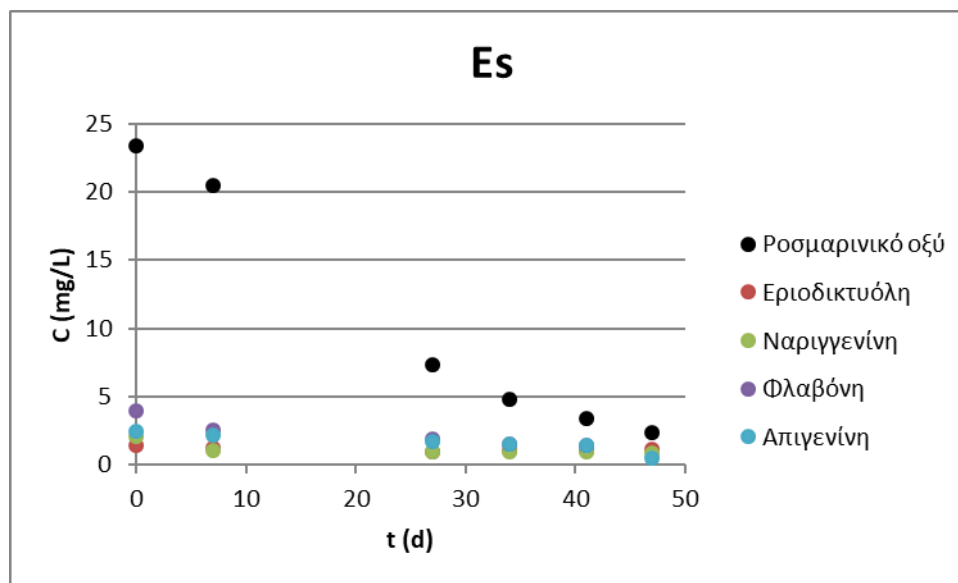
Οι κυριότερες φαινόλες που ανιχνεύτηκαν εντός των γαλακτωμάτων στα οποία προστέθηκαν τα εκχυλίσματα από το φυτό θρούμπι, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας, είναι το ροσμαρινικό οξύ, η εριοδικτυόλη, η ναριγγενίνη, μια μη ταυτοποιημένη φλαβόνη και η απιγενίνη. Στις εικόνες 6.11 και 6.12 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών, στην υδατική φάση των γαλακτωμάτων, κατά την αποθήκευση τους στους 5 °C.



Εικόνα 6.11 Κατανάλωση φαινολικών ενώσεων στα γαλακτώματα με πρόσθετη ουσία εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από θρούμπι σε θερμοκρασία 5 °C.

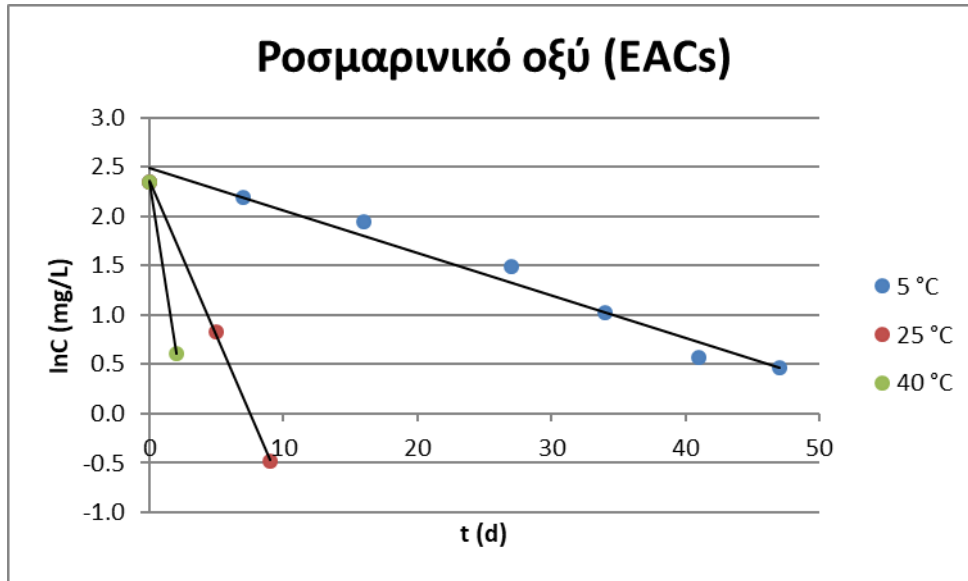
Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων στα οποία προστέθηκε εκχύλισμα EACs η συγκέντρωση των φαινολών που εντοπίζονται είναι αρκετά μικρή. Οι ενώσεις που εντοπίζονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την έναρξη της αποθήκευσης είναι το ροσμαρινικό οξύ και η ναριγγενίνη σε συγκέντρωση κοντά στα 10 mg/L. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ενώσεων είναι ότι η ναριγγενίνη διατηρείται στα ίδια ποσοστά κατά τη διάρκεια του πειράματος ενώ το ροσμαρινικό οξύ καταναλώνεται. Κατά την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση των φαινολών κατά την αποθήκευση των γαλακτωμάτων στους 5 °C, πλην του ροσμαρινικού

οξέος. Επομένως η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζει το εκχύλισμα οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στο ροσμαρινικό οξύ.

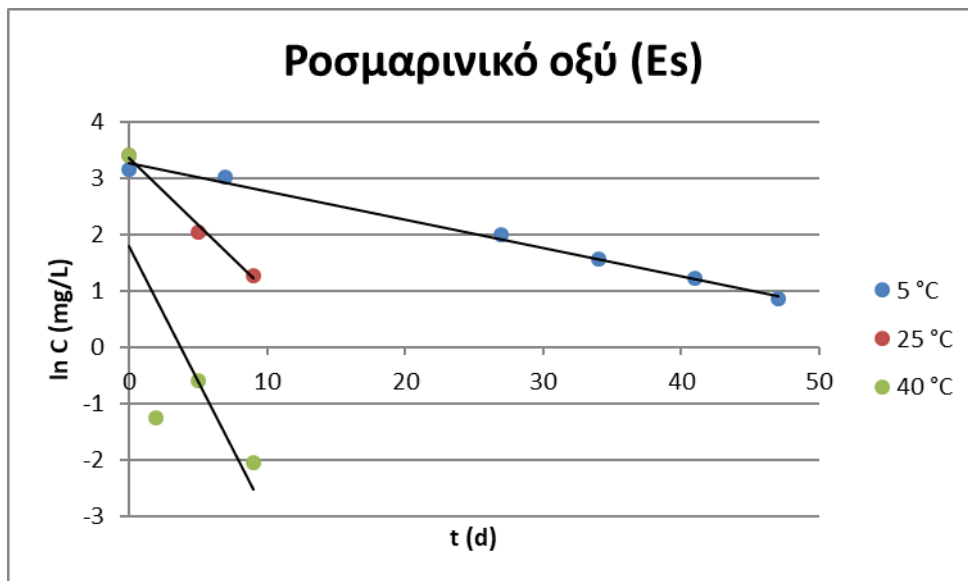


Εικόνα 6.12 Κατανάλωση φαινολικών ενώσεων στα γαλακτώματα με πρόσθετη ουσία αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι σε θερμοκρασία 5 °C

Στην περίπτωση των γαλακτωμάτων που περιείχαν Es εντοπίστηκαν, όπως ήταν αναμενόμενο και από την ανάλυση των συστατικών των εκχυλισμάτων που διενεργήθηκε, διαφορετικές συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων που μελετούνται. Η εριοδικτυόλη, η ναριγγενίνη, η μη ταυτοποιημένη φλαβόνη και η απιγενίνη εντοπίστηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το έτερο εκχύλισμα. Παρόλα αυτά η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος που εντοπίστηκε αρχικά σε αυτά τα γαλακτώματα ήταν τριπλάσια συγκριτικά με αυτά που περιείχαν EACs. Η καλύτερη δράση του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού θρούμπι στην προστασία των γαλακτωμάτων από την οξείδωση σε σχέση με αυτό του οξικού αιθυλεστέρα οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση του φαινολικού οξέος, το οποίο είναι και η ένωση που καταναλώνεται κυρίως. Στη συγκεκριμένη περίπτωση φαίνεται να καταναλώνεται και η μη ταυτοποιημένη φλαβόνη, η οποία όμως είναι σε μικρή συγκέντρωση. Αντίθετα η συγκέντρωση των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων διατηρείται.



Εικόνα 6.13 Κατανάλωση ροσμαρινικού οξέος στα γαλακτώματα με πρόσθετη ουσία εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα από θρούμπι

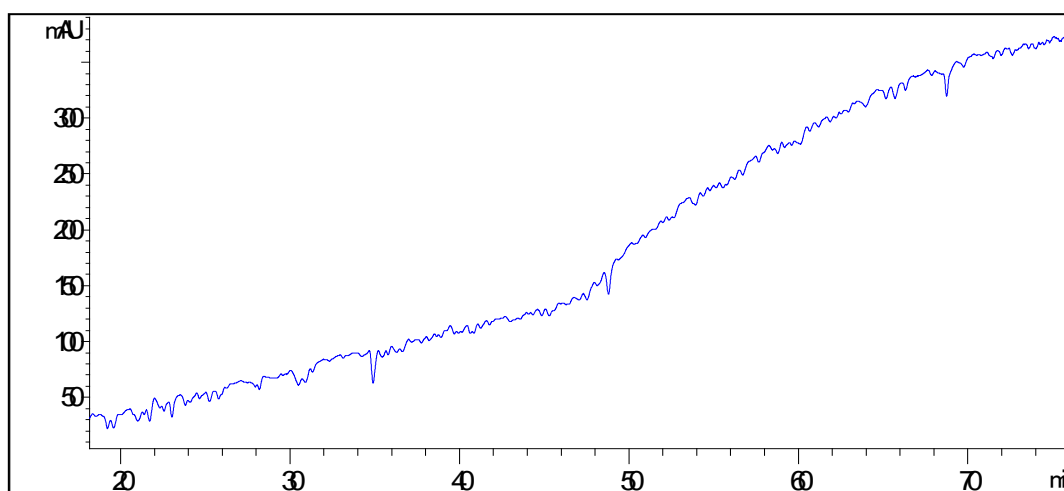


Εικόνα 6.14 Κατανάλωση ροσμαρινικού οξέος στα γαλακτώματα με πρόσθετη ουσία αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι

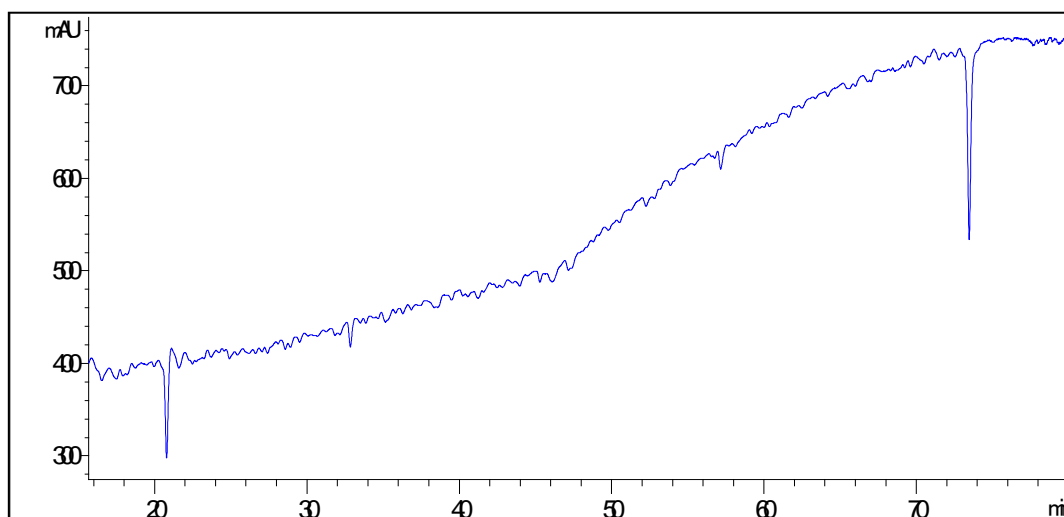
Η κατανάλωση του ροσμαρινικού οξέος στα γαλακτώματα στα οποία προστέθηκαν τα εκχυλίσματα από το φυτό θρούμπι φαίνεται να ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Στην θερμοκρασία των 5 °C, η κατανάλωση στην περίπτωση που στο γαλάκτωμα προστέθηκε EACs προκύπτει από την εξίσωση $\ln C = -0,0429t + 2,4882$, ενώ στην περίπτωση που το πρόσθετο αντιοξειδωτικό ήταν Es η αντίστοιχη εξίσωση είναι $\ln C = -0,0501t + 3,2601$. Στις υπόλοιπες θερμοκρασίες η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος μειώθηκε ταχύτατα και δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την κινητική κατανάλωσης του.

Όσον αφορά τις υπόλοιπες ενώσεις, η συγκέντρωσή τους είναι αρκετά μικρή και η κατανάλωσή τους γίνεται, εάν πραγματοποιείται, με πολύ αργό ρυθμό. Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την συμπεριφορά τους.

Τέλος, για την ανίχνευση ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική δράση, στα γαλακτώματα στα οποία προστέθηκαν εκχυλίσματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC-DAD με ταυτόχρονη είσοδο στο σύστημα του αντιδραστήριου DPPH. Οι ενώσεις που είχαν αντιοξειδωτική δράση προκαλούσαν μείωση της απορρόφησης. Τα γραφήματα που προέκυψαν παρατίθενται παρακάτω.



Εικόνα 6.15 Ανάλυση του εκχυλίσματος EACs με HPLC-DAD για την ανίχνευση των ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα



Εικόνα 6.16 Ανάλυση του εκχυλίσματος Es με HPLC-DAD για την ανίχνευση των ενώσεων που έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα

Όπως είναι αναμενόμενο στην περίπτωση του Es παρουσιάζεται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση. Παρόλα αυτά οι ενώσεις που εμφανίζουν σημαντικότερη δράση δεν αποτελούν ενώσεις που βρίσκονταν εξαρχής στο γαλακτώμα και η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι αποτελούν προϊόντα διάσπασης του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο βρίσκεται σε

μεγάλη συγκέντρωση στο αρχικό γαλάκτωμα που παρασκευασθηκε και αποτελεί το συστατικό που καταναλώνεται κατά τη διάρκεια του πειράματος.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Οι ενώσεις οι οποίες προέρχονται από φυτά μπορούν να δράσουν έτσι ώστε να περιορίσουν και να καθυστερήσουν την οξείδωση των λιπαρών υλών σε γαλακτώματα. Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η χρήση του φυτού *Satureja thymbra* καθώς και συστατικών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα του και αποδείχτηκε ότι όντως καθυστερούν την οξείδωση.

Η δράση των ενώσεων αυτών εξαρτάται από τη δομή τους, έτσι η κερκετίνη η οποία είναι φλαβονόλη αποδείχτηκε ότι είναι καλύτερο αντιοξειδωτικό σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο αποτελεί φαινολικό οξύ. Επίσης τα εκχυλίσματα του αρωματικού φυτού, τα οποία περιέχουν διαφορετικό είδος και ποσότητα φαινολικών συστατικών έδειξαν διαφορετική δράση, με το αιθανολικό εκχύλισμα να είναι πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του φυτού *Satureja thymbra*. Η κερκετίνη και το αιθανολικό εκχύλισμα έδειξαν παρεμφερή δράση, γεγονός μη αναμενόμενο δεδομένου ότι η κερκετίνη είναι αντιπροσωπευτική των συστατικών που εκχυλίζονται με τον οξικό αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν και από τις τρεις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη της πορείας της οξείδωσης, δηλαδή από τη μέτρηση πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης αλλά και της κατανάλωσης του οξυγόνου.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι από τις περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις στα γαλακτώματα τα οποία έχουν παρασκευαστεί με την προσθήκη εκχυλισμάτων, η ένωση που καταναλώνεται, κυρίως, και προσφέρει προστασία έναντι της οξείδωσης είναι το ροσμαρινικό οξύ. Το ροσμαρινικό οξύ που εντοπίζεται σε αυτά τα εκχυλίσματα είναι σε αρκετά μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στο γαλάκτωμα με την πρότυπη ένωση, ενώ η ένωση αυτή επέδειξε την χειρότερη συμπεριφορά ως προς τη προστασία των γαλακτωμάτων. Αυτή η διαφορετική δράση μπορεί να οφείλεται είτε στην συνεργιστική δράση που αναπτύσσει το ροσμαρινικό οξύ με άλλες ενώσεις των εκχυλισμάτων είτε στην παρεμπόδιση της δράσης του όταν υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σύστημα. Για να εξακριβωθεί η ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος να αντιμετωπίζει ή να καθυστερεί την οξείδωση λιπαρών υλών είναι απαραίτητες έρευνες σχετικά με τη δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων της, αλλά και σχετικά με την συνεργιστική δράση αυτής με άλλες φαινόλες.

Όσον αφορά την προστασία των ενώσεων μέσα στα γαλακτώματα αποδείχτηκε ότι η χρήση αυτών των συστημάτων γίνεται λιγότερο αποτελεσματική όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αποθήκευσης. Παρόλα αυτά στους 5 °C η χρήση του γαλακτώματος προστάτεψε τις ενώσεις για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων, καθώς υπάρχουν αρκετές δραστικές ενώσεις η μία μπορεί να επηρεάζει την άλλη. Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την χρήση γαλακτωμάτων ως προστατευτικά μέσα βιοδραστικών ενώσεων απαιτούνται περισσότερες έρευνες. Θα ήταν προτιμότερο οι συνθήκες πραγματοποίησης των μελετών αυτών να προσομοιάζουν την αποθήκευση σε ψυγείο, καθώς σε αυξημένες θερμοκρασίες, όπως αποδείχθηκε, εντείνεται το φαινόμενο της οξείδωσης και οι φαινολικές ενώσεις αποικοδομούνται στην προσπάθειά τους να προστατεύσουν τη λιπαρή φάση.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akoh, C. & Min, D., 2002. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. 2nd edition επμ. New York: Marchel Dekker.
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, J. & Decker, E., 2009. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 57, 2969-2976.
- Alia, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., L., B., & Goya, L., 2006. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, 45, 19-28.
- Alissa, E. & Ferns, G., 2012. Functional Foods and Nutraceuticals in the Primary Prevention of Cardiovascular Diseases. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 12 2012, 1-16.
- Alkam, T., Atsumi, N., Mizoguchi, H., Itoh, A., & Nabeshima, T., 2007. A natural scavenger of peroxy nitrates, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25-35. *Behavioural Brain Research*, 180, 139-145.
- Baghel, S., Shrivastava, N., Baghel, R., Agrawal, P., & Rajput, S., 2012. A Review of Quercetin: antioxidant and anticancer. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 146-160.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C., Shao, X., Pan, M., 2010. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 9(58), 5363-5367.
- Bartosz, G., 2014. *Food Oxidants and Antioxidants Chemical, Biological and Functional Properties*. Boca Raton: CRC Press.
- Bathaie, S. & Tamanoi, F., 2015. *The Enzymes: Mechanism of the Anticancer Effect of Phytochemicals*, 37. 1st edition: Academic Press.
- Becker, E., Ntouma, G. & Skibsted, L., 2007. Synergism and antagonism between quercetin and other chain-breaking antioxidants in lipid systems of increasing structural organisation. *Food Chemistry* 103, 1288-1296.
- Beker, B. Y., Bakır, T., Sönmezoglu, I., Imer, F., & Apak, R., Antioxidant protective effect of flavonoids on linoleic acid peroxidation induced by copper(II)/ascorbic acid system. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 732-739.
- Belitz, H., Grosch, W. & Schieberle, P., 2011. *Χημεία Τροφίμων*. 4η έκδοση Αθήνα: Τζιόλας.
- Berdahl, D. & McKeague, J., 2015. Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation. Στο: S. Fereidon, επμ. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. s.l.: Woodhead Publishing, 177-217.

- Biot, W., McLaughlin, J. K. & Chow, W., 1997. Cancer rates among drinkers of black tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 739-760.
- Bischoff, S., 2008. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11, 733-740.
- Boots, A., Kubben, N., Haenen, G. & Bast, A., 2003. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308, 560-565.
- Borghetti, G. & Bassani, V., 2012. Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in the solid state. *Thermochimica Acta*, 539, 109-114.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Brito, A., Ribeiro, M., Abrantes, A. & Botelho, M. F., 2015. Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics?. *Current Medicinal Chemistry*, 22, 3025-3039.
- Brummer, R., 2006. *Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions*. Hamburg: Springer.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. & Kroh, L., 2006. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229-3235.
- Burda, S. & Oleszek, W., 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
- Caballero, B., Finglas, P. & Toldra, F., 2016. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Elsevier.
- Casagrande, R., Georgetti, S., Verri Jr., W., Borin, M., Lopez, R., & Fonseca, M., 2007. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 183-190.
- Casagrande, R., Georgetti, S., Verri, W., Jabor, J., Santos, A., & Fonseca, M., 2006. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 7, 64-71.
- Casanova, F., Estevinho, B. & Santos, L., 2016. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. *Powder Technology*, 297, 44-49.
- Catauro, M., Bollino, F., Nocera, P., Piccolella, S., & Pacifico, S., 2016. Entrapping quercetin in silica/polyethylene glycol hybrid materials: Chemical characterization and biocompatibility. *Materials Science and Engineering*, C(68), 205-212.
- Chen, J. H. & Ho, C.-T., 1997. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 45, 2374-2378.

- Chen, X. & Ahn, D., 1998. Antioxidant Activities of Six Natural Phenolics Against Lipid Oxidation Induced by Fe²⁺ or Ultraviolet Light. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(12), 1717-1721.
- Chen, Z., Chan, P., Ho, K., Fung, K., & Wang, J., 1996. Antioxiidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79, 157-163.
- Choulitoudi, E. Bravou, K., Bimpilas, A., Tsironi, T., Tsimogiannis, D., Taoukis, P και συν., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of Saturejathymbra in gilthead seabream fillets edible coating. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 570-577.
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., και συν., 2005. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *European journal of immunology*, 35, 584-592.
- Cuvelier, M.-E., Bondet, V. & Berset, C., 2000. Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure—Activity relationship. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(8), 819-824.
- Das, U., 1991. Lipids, lipid peroxidation and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 44-45.
- Decker, E., Elias, R. & McClements, J., 2010. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. 1st edition επιμ. Oxford: Woodhead Publishing.
- Desai, K. & Park, H. J., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Diplock, A., 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81, 1-27.
- Dolatabadi, J. E. N. & Kashanian, S., 2010. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43, 1223-1230.
- Duthie, G., Duthie, S. & Kyle, J., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 13, 79-106.
- Embuscado, M., 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811-819.
- Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76-82.
- Espinosa, R. R., Inchingolo, R., Alencar, S. M., Rodriguez-Estrad, M. T., & Castro, I. A., 2015. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chemistry*, 182, 95-104.

- Exarchou, V. Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I., Troganis, A., & Boskou, D., 2002. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of agricultural and food chemistry*, 19(50), 5294-5299.
- Fang, Z. & Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Ferry, D., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D., Anderson, D., Baker, J., και συν., 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical cancer research*, 2, 659-668.
- Force, E., Dunford, N. & Salas, J., 2015. Sunflower Oil Minor Constituents. Στο: *Sunflower: Chemistry, Production, Processing and Utilization*. επμ. L. Velasco & V. Ruiz-Mendez. Urbana: AOCS PRESS, 297-329.
- Frankel, E., 2012. *Lipid oxidation*. 2nd edition επμ. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Frankel, E., Huang, S.-W., Aeschbach, R. & Prior, E., 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 44, 131-135.
- Frankel, E. N., Satue-Gracia, T., Meyer, A. S. & German, B. J., 2002. Oxidative Stability of Fish and Algae Oils Containing Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Bulk and in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2094-2099.
- Furtado, M. A., de Almeida, L. C., Furtado, R. A., Cunha, W. R., & Tavares, D. C., 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657(2), 150-154.
- Gao, L., Liu, G., Wang, X., Liu, F., Xu, Y., & Ma, J., 2011. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 231-237.
- Garti, N., 2008. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. επμ. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Gião, M., Pereira, C., Fonseca, S., Pintado, M., & Malcata, X., 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants Agrimonia eupatoria, Salvia sp. and Satureja montana. *Food Chemistry*, 117(3), 412-416.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., González-Paramás, A. & Santos-Buelga, C., 2010. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 443-449.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, I. & Aslan, A., 2002. Determination of antioxidant activity of lichen Cetraria islandica(L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 325-3259.
- Güllüce, M., Sökmen, M., Ağar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., et al., 2003. In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol

Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3958-3965.

Gunstone, F., 2003. *Lipids for functional foods and nutraceuticals*. επιμ.: Cambridge: Woodhead Publishing.

Gunstone, F. D., 2002. *Vegetable oils and food technology: Composition, Properties and Uses*. επιμ.: Oxford: Blackwell Publishing.

Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Padley, F. B., 1994. *The Lipid Handbook*. επιμ.: London: Chapman & Hall.

Hafiz, A. & Eissa, A., 2012. *Trends in Vital Food and Control Engineering*. επιμ.: Rijeka: InTeck.

Hasenhuettl, G. & Hartel, R., 2008. *Food Emulsifiers and their Applications*. 2nd edition επιμ. New York: Springer Science+ Business Media Dordrecht.

Huber, G., Rupasinghe, V. & Shahidi, F., 2009. Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, 117, 290-295.

Hu, M. & Jacobsen, C., 2016. *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. 1st edition επιμ. London: Aocs Press.

Hu, Y.-T., Ting, Y., Hu, J.-Y. & Hsieh, S.-C., 2017. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 16-26.

IUPAC, 1987. In: Paquot, C., Hautfenne, A. (Eds.), *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* 2.501 ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (UK), 138-139.

Jafari, F., Ghavidel, F. & Zarshenas, M., 2016. A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular *Satureja* Species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3), 118-127.

Jain, S., Jain, A., Pohekar, M. & Thanki, K., 2013. Novel self-emulsifying formulation of quercetin for improved in vivo antioxidant potential: Implications for drug-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 117-130.

Jaisinghani, R. N. & Mansukhani, C. H., 2017. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology Research*, 8, 6877-6878.

Ju, Z. & Bramlage, W., 1999. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Postharvest Biology and Technology*, 16, 107-118.

Kahkonen, M. & Heinonen, M., 2003. Antioxidant Activity of Anthocyanins and their Aglycons. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51, 628-633.

Kerwin, B., 2008. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of pharmaceutical sciences*, 8(97), 2924-2935.

- Kruma, Z., Andjelkovic, M., Verhe, R. & Kreicbergs, V., 2008. Phenolic Compounds in Basil, Oregano and Thyme. *Foodbalt*, 99-103.
- Lakkis, J., 2007. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. 1st edition επιμ. Oxford: Blackwell Publishing.
- Let, M., Jacobsen, C. & Meyer, A., 2007. Ascorbyl palmitate, gamma-tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(55), 2369-2375.
- Linkeviciute, A., Misiunas, A., Naujalis, E. & Barauskas, J., 2015. Preparation and characterization of quercetin-loaded lipid liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces, B(128)*, 296-303.
- Li, S., Chen, G., Zhang, C., Wu, M., Wu, S., & Liu, Q., 2014. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 110-116.
- Lucas-Abellan, C., Fortea, I., Gabaldon, J. A. & Nunez-Delicado, E., 2008. Encapsulation of Quercetin and Myricetin in Cyclodextrins at Acidic pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 255-259.
- Madsen, H., Moller Andersen, C., Viborg Jorgensen, L. & Skibsted, L., 2000. Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *European Food Research and Technology*, 211, 240-246.
- Márquez, A., Medrano, A., Panizzolo, L. & Wagner, J., 2010. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 101-108.
- Materska, M. & Perucka, I., 2005. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 53, 1750-1756.
- Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D. & Pittia, P., 2009. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*, 42, 1163-1170.
- Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D., & Pittia, P., 2010. Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 24, 652-658.
- McMurry, J., 2012. *Οργανική Χημεία*. επιμ.: Ηράκλειο: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
- Merrill, L., Pike, O., Ogden, L. & Dunn, M., 2008. Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, August, 771-776.

- Mullen, W., Rouanet, J., Auger, C., Teissèdre, P., Caldwell, S., Hartley, R., et al., 2008. Bioavailability of [2-14C]Quercetin-4'-glucoside in. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12127-12137.
- Nabavi, S. F., Russo, G. L., Daglia, M. & Nabavi, S. M., 2015. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat!. *Food Chemistry*, 179, 305-310.
- Narita, Y. & Inouye, K., 2013. Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and Effects of Ascorbic Acid and Epigallocatechin Gallate on Its Stability under Alkaline Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(61), 966-972.
- Nogala-Kalucka, M., Dwiecki, K., Siger, A., Gornas, P., Polewski, K., & Ciosek, S., 2013. Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols quercetin and rutin in model system. *Acta Alimentaria*, 42(3), 360-370.
- Nogala-Kalucka, M., Kupczyk, B., Polewski, K., Siger, A., & Dwiecki, K., 2007. Influence of native antioxidants on the formation of fatty acid hydroperoxides in model systems. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1028-1037.
- Oroian, M. & Escriche, I., 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Osborn, H. & Akoh, C., 2003. Effects of Natural Antioxidants on Iron-Catalyzed Lipid Oxidation of Structured Lipid-Based Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(9), 847-852.
- Ou, J., Huang, J., Wang, M. & Ou, S., 2017. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. *Food Chemistry*, 221, 1057-1061.
- Öztürk, M., 2012. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134, 48-54.
- Panche, A., Diwan, A. & Chandra, S., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1-15.
- Panya, A. και συν., 2012. Interactions between α -tocopherol and rosmarinic acid and its alkyl esters in emulsions: synergistic, additive or antagonistic effect?. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 60(41), 10320-10330.
- Petersen, M. & Simmonds, M., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 2(62), 121-125.
- Pokorný, J. & Pánek, J., 2012. The effect of natural antioxidants in herbs and spices on food shelf-life. Στο: *Handbook of Herbs and Spices (2nd edition)*. επιμ.: K. Peter, Cambridge: Woodhead Publishing, 51-71.
- Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W., & Muchimapura, S., 2008. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4, 70-78.

- Rahman, I., Biswas, S. & Kirkham, P., 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1439-1452.
- Roedig-Penman, A. & Gordon, M., 1999. Antioxidant Properties of Myricetin and Quercetin in Oil and Emulsions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 97(1), 79-85.
- Roig, R. & Josepa Salvadó, M., 2002. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572, 25-30.
- Ruzic, I., Skerget, M. & Knez, Z., 2010. Potential of Phenolic Antioxidants. *Acta Chimica Slovenica*, 57, 263-271.
- Sanchez-Muniz & Cuesta, 2003. Sunflower oil. Στο *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd edition)*. επιμ.: B. Caballero, L. Trugo & P. Finglas, Baltimore: Academic Press, 5672-5680.
- Shahidi, F., 2015. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. 1st edition επιμ. Woodhead Publishing.
- Shahidi, F. & Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, B(18), 820-897.
- Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R., & Hamedani, M. P., 2012. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Network Worldwide*, 29(8), 37-41.
- Skoula, M., Grayer, R. & Kite, G., 2005. Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 541-544.
- Sørensen, A.-D., Haahr, A.-M., Becker, E. M., Skibsted, L., Bergenståhl, B., Nilsson, L., et al., 2008. Interactions between Iron, Phenolic Compounds, Emulsifiers, and pH in Omega-3-Enriched Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(56), 1740-1750.
- Symonowicz, M. & Kolanek, M., 2012. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, 76, 35-41.
- Tadros, T., 2013. *Emulsion Formation and Stability*. επιμ.: Weinheim: Wiley-VCH.
- Teo, A., Goh, K., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H.-S., et al., 2016. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food Chemistry*, A(197), 297-306.
- Terpinc, P. & Abramovic, H., 2010. A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121, 366-371.

- Ting, Y., Jiang, Y., Ho, C.-T. & Huang, Q., 2014. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. *Journal of Functional Foods*, 7, 112-128.
- Tokle, T. & McClements, D. J., 2011. Physicochemical properties of lactoferrin stabilized oil-in-water emulsions: Effects of pH, salt and heating. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 976-982.
- 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.
- Walle, T., 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 829-837.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., et al., 2016. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38.
- Waterhouse, A.L., 2005. Determination of total phenolics. In: Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., Sporns, P. (Eds.), *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Hoboken, 463–471.
- Wiczowski, W. & Piskula, M., 2004. Food Flavonoids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13, 101-114.
- Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K. & Faubion, J., 2016. *Encyclopedia of Food Grains*. 2nd edition. Academic Press.
- Wu, W., Li, R., He, J., Jianq, S., Liu, S., & Yang, J., 2015. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*, 8, 6-12.
- Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., & Gao, Y., 2012. Impact of whey protein – Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 258-266.
- Zaveri, N., 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, 78, 2073-2080.
- Zhou, L. & Elias, R., 2013. Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chemistry*, 138, 1503-1509.
- Zhu, Y., Lng, Q.-z., Zhou, B., Prenzler, P., & Zhong, H.-y., 2013. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Bulk Camellia Oil and Corresponding Oil in Water (O/W) Emulsions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(9), 1238-1243.

Γαδ, Ε., 2015. *Εμπλουτισμός μικρογαλακτωμάτων με αιθέρια έλαια και νισίνη. Έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των μικρογαλακτωμάτων*, Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Δημάκου, Χ., 2010. *Διδακτορική διατριβή: Μελέτη της επίδρασης ενδογενών και εξωγενών παραμέτρων στην οξείδωση λιπαρών σε γαλακτώματα*, Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

ΕΕ, 2011. Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1129/2011. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, 11 11.

Ιωάννου-Κακούρη, Ε., Μιχαήλ, Κ., Προκοπίου, Ε., Κρασιά, Α., & Νεοφύτου, Α., 2008. *Οδηγός για Πρόσθετα Τροφίμων (Αριθμοί Ε)*. Αθήνα: Υπουργείο Υγείας Γενικό Χημείο του Κράτους.

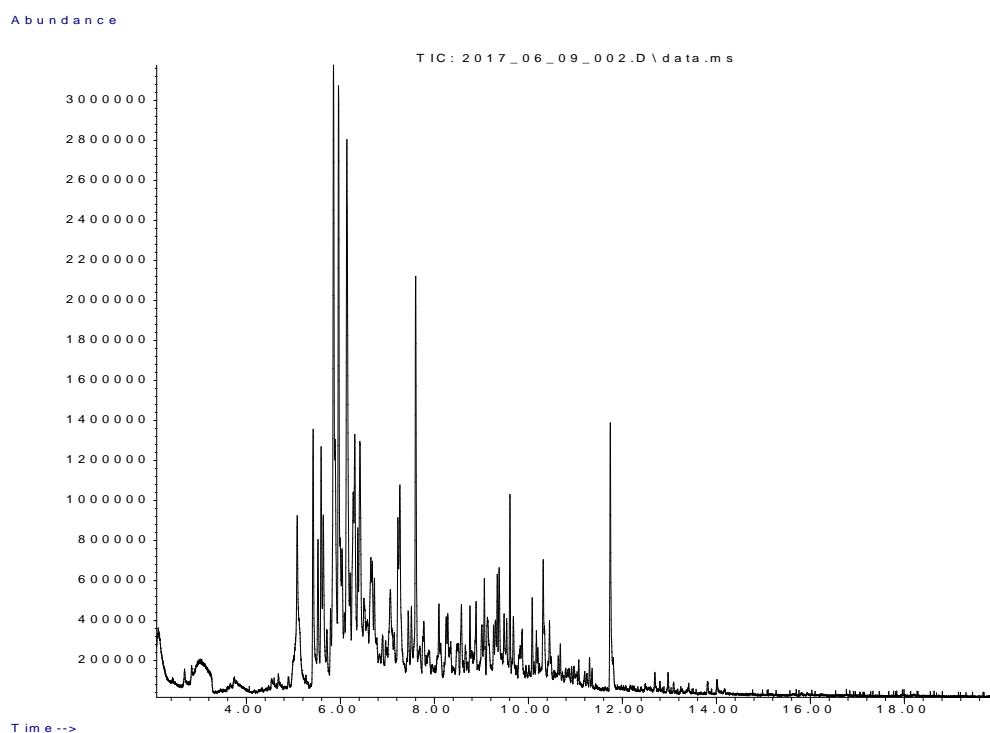
Μπόσκος, Δ., 1997. *Χημεία Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γαργατάνη.

Πανταζοπούλου, Χ. Κ. (2012). *Μεταπτυχιακή διατριβή: Μελέτη της προσαρμοστικότητας αυτοφυών βιοτύπων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών χημειότυπου καρβακρόλης σε συνθήκες εκτακτικής καλλιέργειας*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

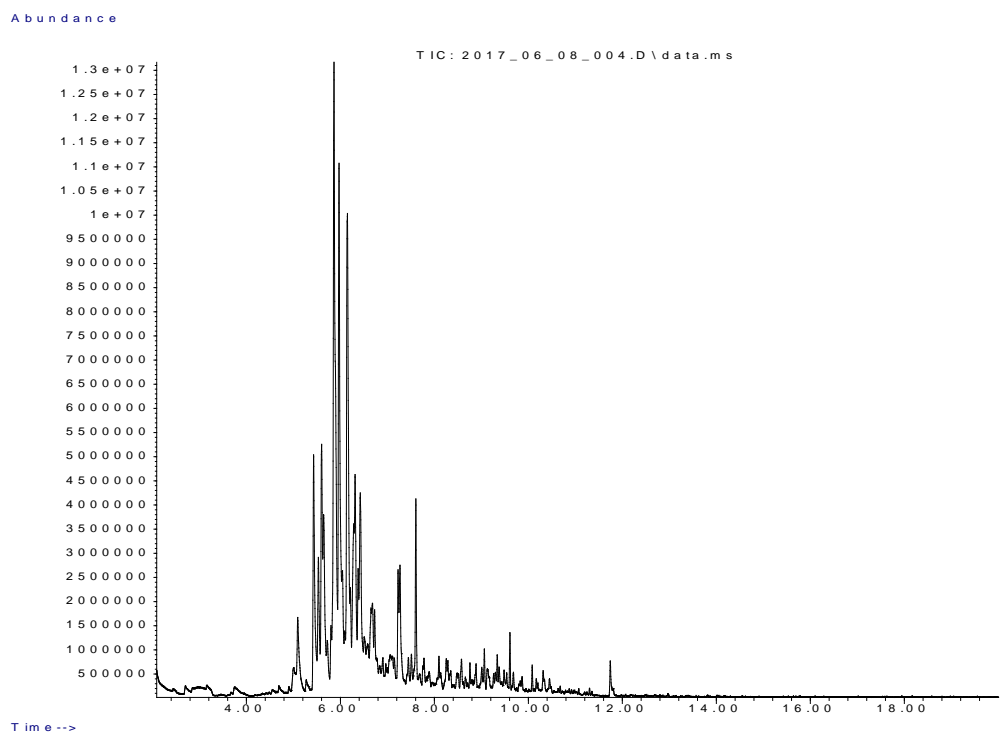
Σπηλιοπούλου, Ν., 2014. *Μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία: Μελέτη σταθερότητας και οξείδωσης μακρο και νανο-γαλακτωμάτων με προσθήκη κρόκου Κοζάνης (Crocus Sativus L.)*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Τζιά, Κ., Ωραιοπούλου, Β. & Ταούκης, Π., 2009. *ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΡΕΟΛΟΓΙΑ-ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ*. Αθήνα: ΕΜΠ.

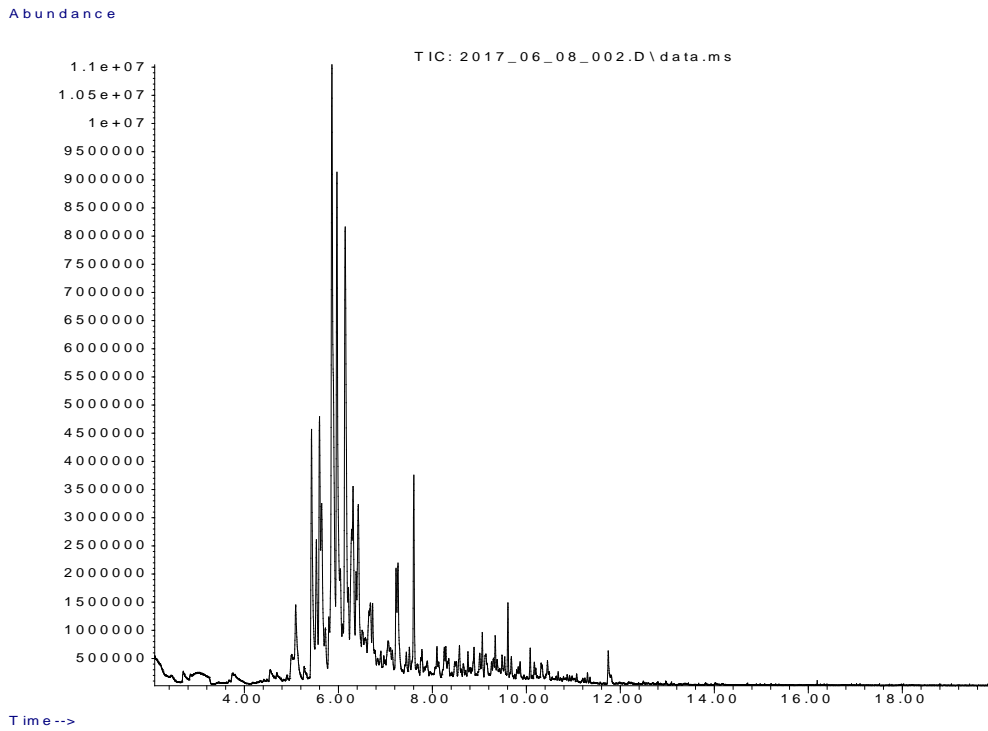
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



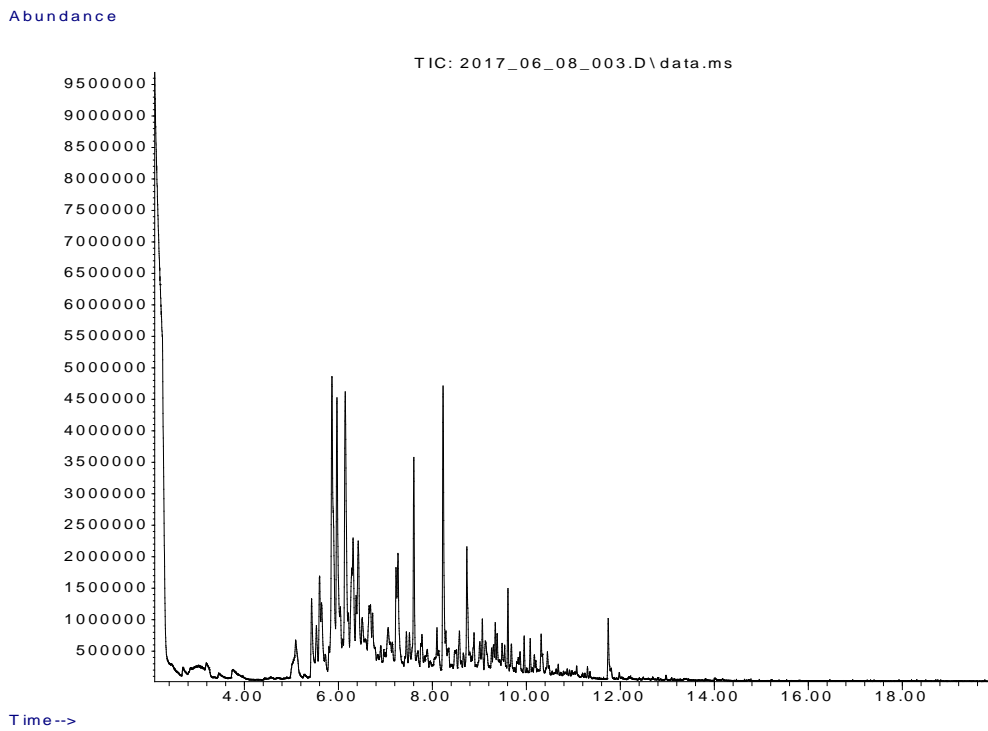
Εικόνα 9.1 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για control γαλάκτωμα χρόνου t=0



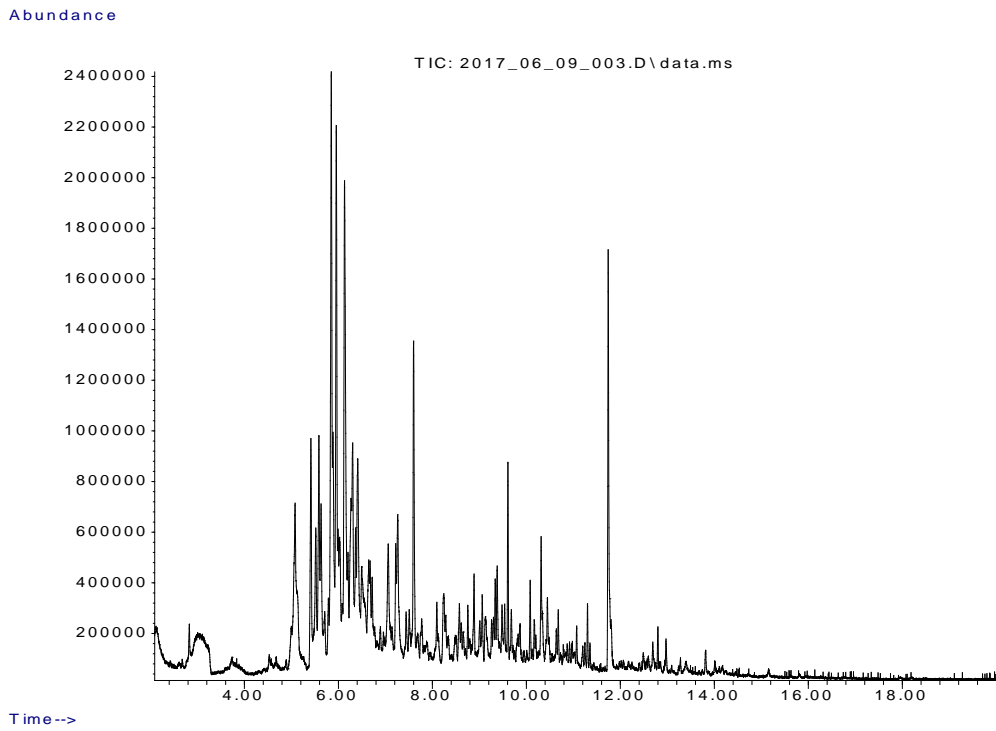
Εικόνα 9.2 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με κερκετίνη χρόνου t=0



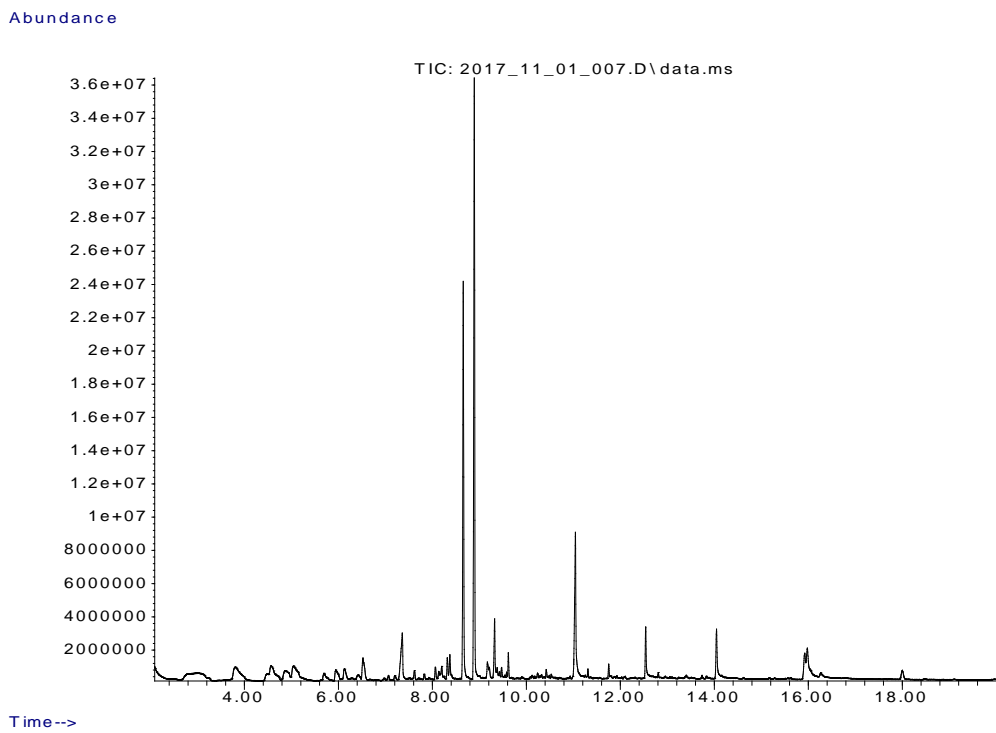
Εικόνα 9.3 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με ροσμαρινικό οξύ χρόνου t=0



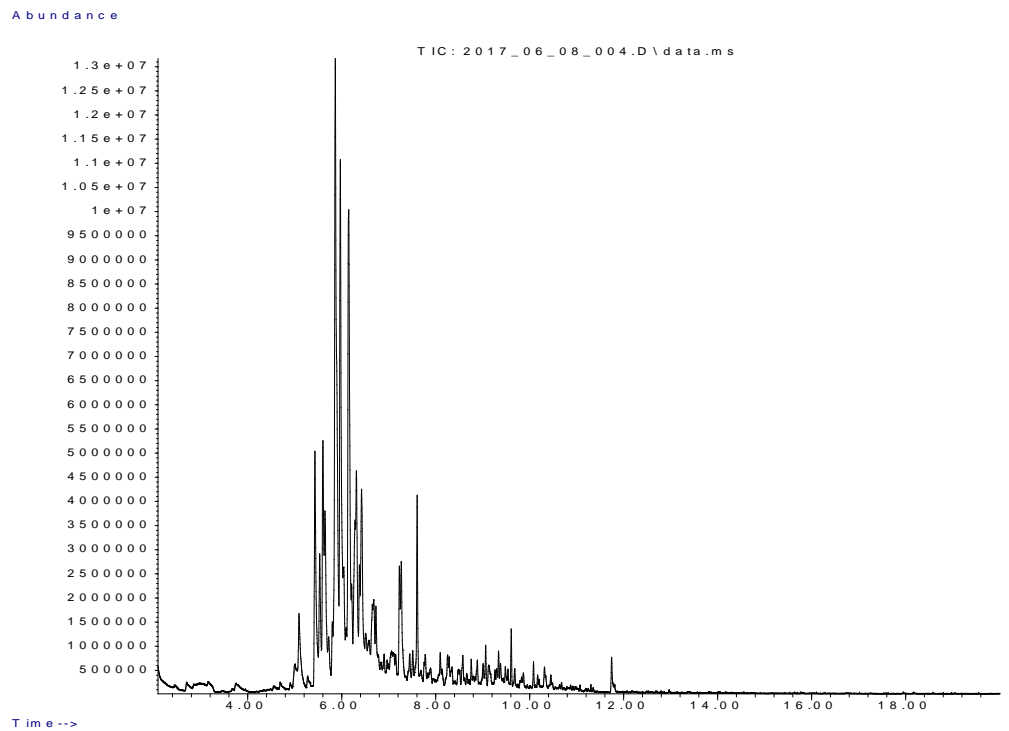
Εικόνα 9.4 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με EACs χρόνου t=0



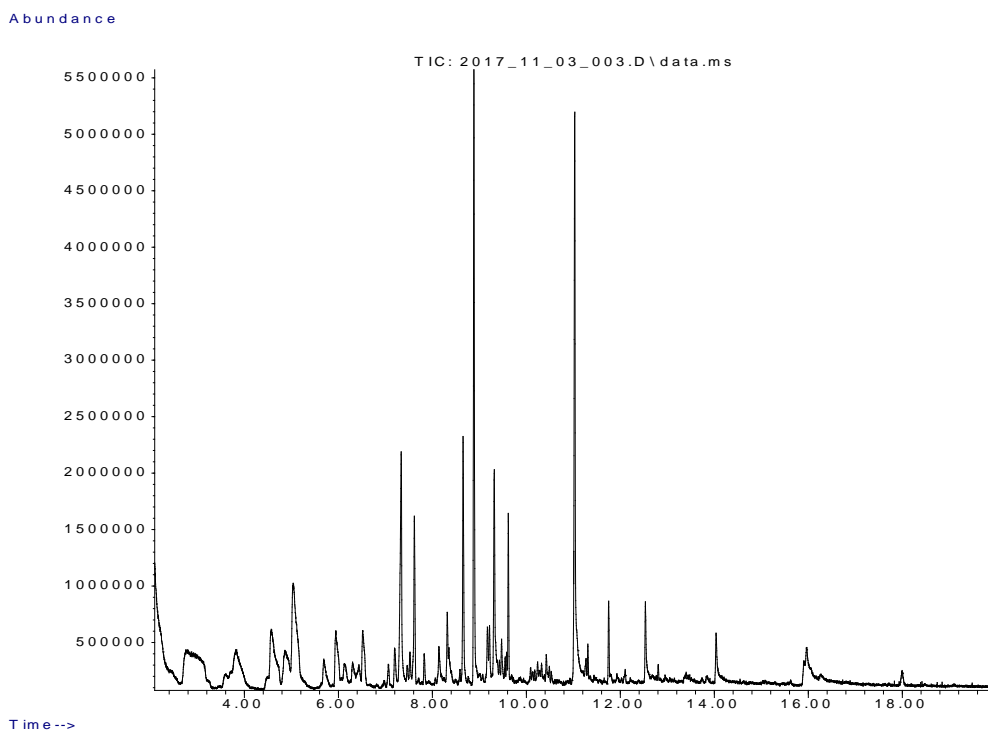
Εικόνα 9.5 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με Es χρόνου t=0



Εικόνα 9.6 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για control γαλάκτωμα για t=36 d και T=40 °C

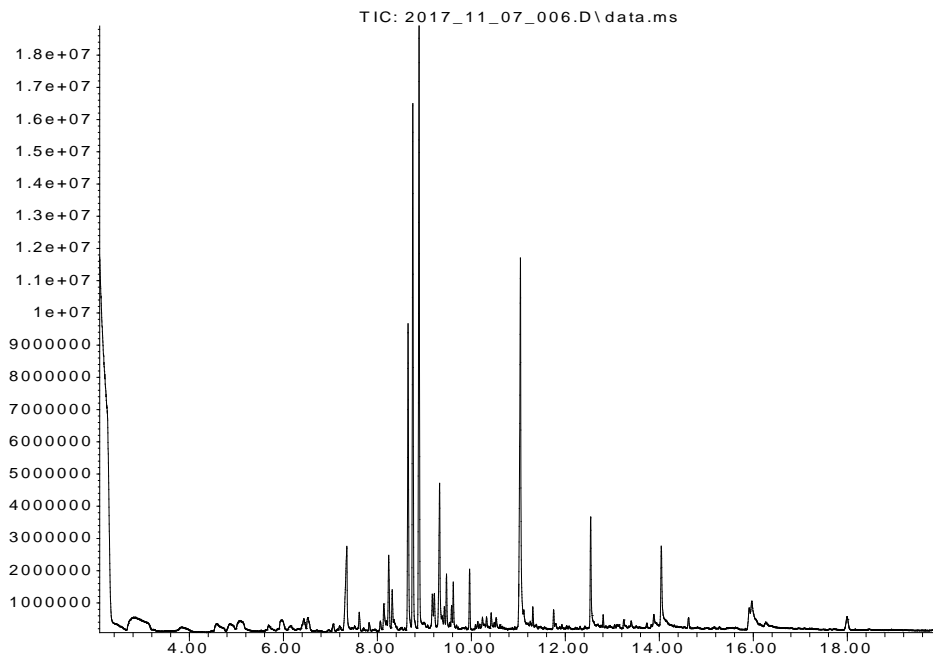


Εικόνα 9.7 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με κερκετίνη για $t=36$ d και $T=40$ °C



Εικόνα 9.8 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με ροσμαρινικό οξύ για $t=36$ d και $T=40$ °C

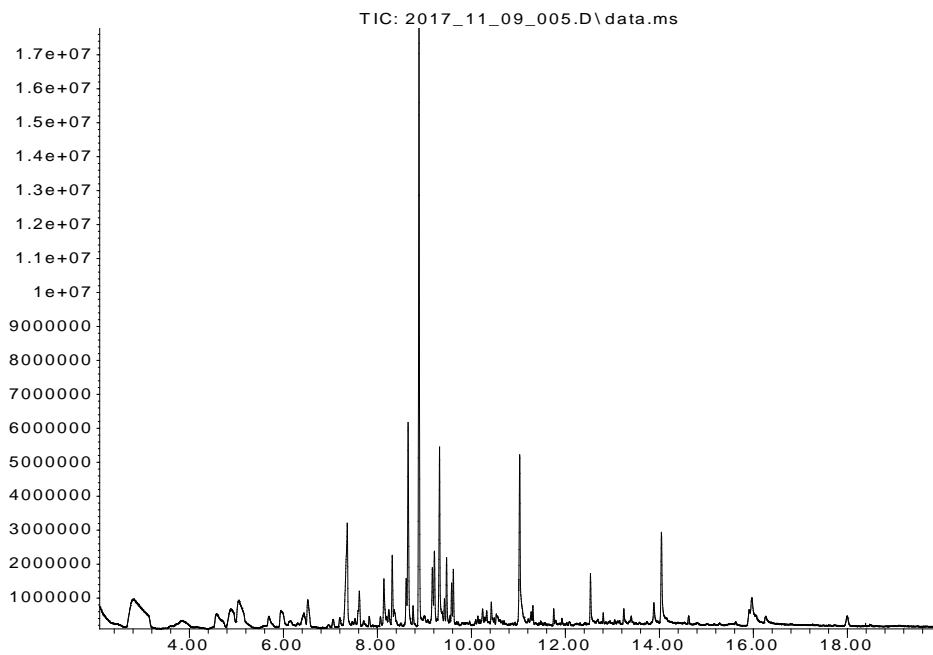
Abundance



Time-->

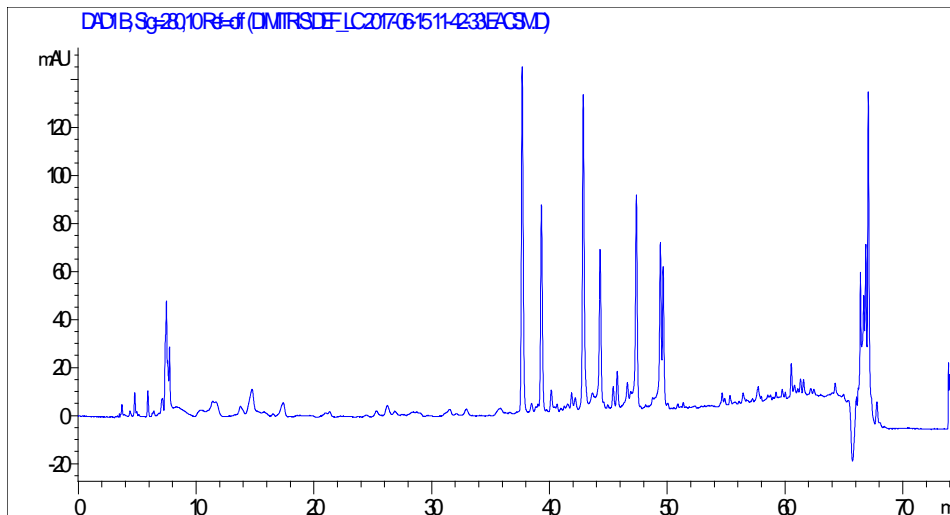
Εικόνα 9.9 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με EACs για t=36 d και T=40 °C

Abundance

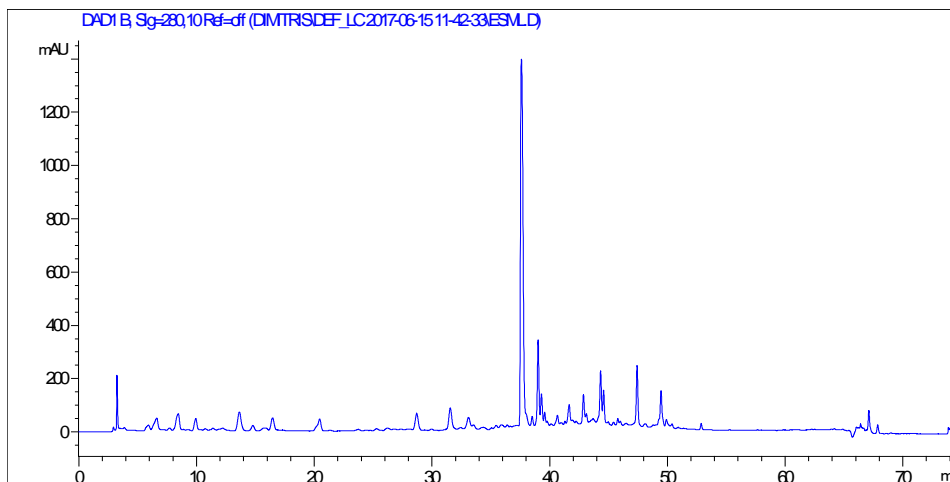


Time-->

Εικόνα 9.10 Γράφημα από την ανάλυση πτητικών αερίων για γαλάκτωμα με Es χρόνου t=36 d και T=40 °C



Εικόνα 9.11 Ανάλυση του εκχυλίσματος EACs με HPLC-DAD



Εικόνα 9.12 Ανάλυση του εκχυλίσματος Es με HPLC-DAD

Πίνακας 9.1 Ανονα για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for PV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2559,101	1	2559,101	199,0893	0,000000
Χρόνος	320,232	6	53,372	4,1522	0,005325
Ουσία	613,891	4	153,473	11,9397	0,000018
Error	308,497	24	12,854		

Πίνακας 9.2 Ανονα για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=25 °C

Univariate Tests of Significance for PV (Spreadsheet4) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	18674,50	1	18674,50	316,4701	0,000000
Χρόνος	6829,48	7	975,64	16,5338	0,000000
Ουσία	3479,25	4	869,81	14,7404	0,000001
Error	1652,24	28	59,01		

Πίνακας 9.3 Ανονα για τον αριθμό υπεροξειδίων ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=40 °C

Univariate Tests of Significance for PV (Spreadsheet7) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	47819,64	1	47819,64	613,0634	0,000000
Χρόνος	25821,51	8	3227,69	41,3800	0,000000
Ουσία	4099,31	4	1024,83	13,1386	0,000002
Error	2496,04	32	78,00		

Πίνακας 9.4 Ανονα για τις περιεχόμενες ολικές φαινόλες των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Follin (Spreadsheet10) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	65185,58	1	65185,58	451,1745	0,000001
Χρόνος	20648,65	6	3441,44	23,8195	0,000615
Ουσία	100,45	1	100,45	0,6952	0,436321
Error	866,88	6	144,48		

Πίνακας 9.5 Ανονα για τις περιεχόμενες ολικές φαινόλες των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=25 °C

Univariate Tests of Significance for Follin (Spreadsheet1 Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	65856,39	1	65856,39	567,4527	0,000000
Χρόνος	21026,55	7	3003,79	25,8822	0,000172
Ουσία	476,33	1	476,33	4,1043	0,082409
Error	812,39	7	116,06		

Πίνακας 9.6 Ανονα για τις περιεχόμενες ολικές φαινόλες των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=40 °C

Univariate Tests of Significance for Follin (Spreadsheet1 Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	68602,20	1	68602,20	517,8732	0,000000
Χρόνος	21970,16	8	2746,27	20,7314	0,000140
Ουσία	619,91	1	619,91	4,6797	0,062472
Error	1059,75	8	132,47		

Πίνακας 9.7 Ανονα για το περιεχόμενο ροσμαρινικό οξύ των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Ροσμαρινικό οξύ (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	699,4940	1	699,4940	47,36437	0,000991
Χρόνος	422,0064	5	84,4013	5,71501	0,039294
Ουσία	83,5541	1	83,5541	5,65764	0,063276
Error	73,8418	5	14,7684		

Πίνακας 9.8 Ανονα για τη περιεχόμενη εριοδικτυόλη των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Εριοδικτυόλη (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	202,4849	1	202,4849	3809,320	0,000000
Χρόνος	0,6673	5	0,1335	2,511	0,167572
Ουσία	105,6596	1	105,6596	1987,759	0,000000
Error	0,2658	5	0,0532		

Πίνακας 9.9 Ανονα για τη περιεχόμενη ναριγγενίνη των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Ναριγγενίνη (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	331,0196	1	331,0196	1714,326	0,000000
Χρόνος	3,0353	5	0,6071	3,144	0,117180
Ουσία	202,1137	1	202,1137	1046,732	0,000001
Error	0,9655	5	0,1931		

Πίνακας 9.10 Ανονα για τη περιεχόμενη απιγενίνη των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Απιγενίνη (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	158,7146	1	158,7146	1253,219	0,000000
Χρόνος	2,0488	5	0,4098	3,236	0,111688
Ουσία	47,7303	1	47,7303	376,881	0,000007
Error	0,6332	5	0,1266		

Πίνακας 9.11 Ανονα για τη περιεχόμενη φλαβόνη των γαλακτωμάτων που περιείχαν εκχυλίσματα ως προς δύο παραμέτρους (εκχύλισμα που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Φλαβόνη (Spreadsheet Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	90,26585	1	90,26585	341,0199	0,000051
Χρόνος	3,91350	4	0,97838	3,6963	0,116715
Ουσία	5,13842	1	5,13842	19,4127	0,011637
Error	1,05878	4	0,26469		

Πίνακας 9.12 Ανονα για την παραγόμενη εξανάλη ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Hexanal (Spreadsheet32) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,028803E+12	1	3,028803E+12	3427,036	0,000000
Χρόνος	9,980215E+11	3	3,326738E+11	376,414	0,000000
Ουσία	4,647905E+10	4	1,161976E+10	13,148	0,000242
Error	1,060556E+10	12	8,837969E+08		

Πίνακας 9.13 Ανονα για την παραγόμενη εξανάλη ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=25 °C

Univariate Tests of Significance for Hexanal (Spreadsheet35) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2,324054E+13	1	2,324054E+13	203,2349	0,000000
Χρόνος	1,005333E+13	5	2,010665E+12	17,5830	0,000001
Ουσία	3,062933E+12	4	7,657333E+11	6,6962	0,001371
Error	2,287062E+12	20	1,143531E+11		

Πίνακας 9.14 Ανονα για την παραγόμενη εξανάλη ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=40 °C

Univariate Tests of Significance for Hexanal (Spreadsheet39) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,237779E+13	1	3,237779E+13	80,1160E	0,000000
Χρόνος	1,532082E+13	8	1,915103E+12	4,73876	0,000668
Ουσία	2,580428E+12	4	6,451069E+11	1,59626	0,199279
Error	1,293236E+13	32	4,041361E+11		

Πίνακας 9.15 Ανονα για την κατανάλωση του οξυγόνου ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=5 °C

Univariate Tests of Significance for Οξυγόνο (Spreadsheet42) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	13291,21	1	13291,21	34780,18	0,000000
Χρόνος	23,33	6	3,89	10,17	0,000013
Ουσία	7,00	4	1,75	4,58	0,006848
Error	9,17	24	0,38		

Πίνακας 9.16 Ανονα για την κατανάλωση του οξυγόνου ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=25 °C

Univariate Tests of Significance for Οξυγόνο (Spreadsheet45) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	14254,40	1	14254,40	31968,54	0,000000
Χρόνος	93,47	7	13,35	29,95	0,000000
Ουσία	17,35	4	4,34	9,73	0,000046
Error	12,48	28	0,45		

Πίνακας 9.17 Ανονα για την κατανάλωση του οξυγόνου ως προς δύο παραμέτρους (ουσία που προστέθηκε και χρόνος αποθήκευσης) για τα γαλακτώματα σε θερμοκρασία T=40 °C

Effect	Univariate Tests of Significance for Οξυγόνο (Spreadsheet48): Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	15075,54	1	15075,54	35030,54	0,000000
Χρόνος	130,54	8	16,32	37,92	0,000000
Ουσία	55,17	4	13,79	32,05	0,000000
Error	13,77	32	0,43		